



UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

IZTAPALAPA

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Doctorado en Biología Experimental

T E S I S

para obtener el grado de
Doctora en Biología Experimental
presentada por

Verónica Pérez de la Cruz

Dra. Mina Königsberg Fainstein - Codirectora
Dr. Abel Santamaría Del Ángel - Codirector
Dr. Julio Eduardo Roque Morán Andrade - Asesor

México, D.F., Diciembre 2008

Comité Tutorial de la Tesis

**“CARACTERIZACIÓN DE LOS PATRONES DE DÉFICIT ENERGÉTICO Y
ESTRÉS OXIDATIVO/NITROSATIVO INDUCIDOS POR EL
PEROXINITRITO EN MODELOS EXPERIMENTALES DE LA
ENFERMEDAD DE HUNTINGTON”**

Realizada por

Verónica Pérez de la Cruz

el día 12 de diciembre del 2008 en las instalaciones de la Universidad Autónoma
Metropolitana, Unidad Iztapalapa

Dra. Mina Königsberg Fainstein

Laboratorio de Bioenergética y Envejecimiento Celular
Ciencias Biológicas y de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa
mkf@xanum.uam.mx

Dr. Abel Santamaría Del Angel

Laboratorio de Aminoácidos Excitadores
Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía
absada@yahoo.com

Dr. Julio Morán Andrade

Departamento de Neurociencias
Instituto de Fisiología Celular, UNAM
jmoran@ifisiol.unam.mx

Los miembros del jurado de examen designados por el Posgrado en Biología Experimental abajo firmantes aprobaron la tesis “ **CARACTERIZACIÓN DE LOS PATRONES DE DÉFICIT ENERGÉTICO Y ESTRÉS OXIDATIVO/NITROSATIVO INDUCIDOS POR EL PEROXINITRITO EN MODELOS EXPERIMENTALES DE LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON**” realizada por la alumna **Verónica Pérez de la Cruz** y se realizo la disertación publica el día 12 de diciembre del 2008 en las instalaciones de la Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa.

PRESIDENTE

Dra. Anabel Jiménez Anguiano
Departamento Biología de la Reproducción,
División de Ciencias Biológicas y de la Salud,
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

SECRETARIO

Dr. Julio Morán Andrade
Departamento de Neurociencias
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

VOCAL

Dr. José Pedraza Chaverri
Departamento de Biología,
Facultad de Química, UNAM

VOCAL

Dra. Perla D. Maldonado Jiménez
Laboratorio de Patología Vasculat Cerebral, INNN

El programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa (UAM-I: 0904-0) recibe apoyo por parte del CONACYT mediante el programa PNP-CONACyT-SEP clave C/PFPN-2002-35-32. Verónica Pérez de la Cruz agradece el apoyo recibido por CONACYT (Registro No. 200241).

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Aminoácidos Excitadores del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”, en colaboración con el Laboratorio de Bioenergética y Envejecimiento Celular de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud en la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Abel Santamaría por su apoyo y dirección en este trabajo.

A la Dra. Mina por creer, confiar y apoyarme en la realización de esta tesis.

Al Dr. Julio Morán por sus valiosos comentarios y guía a lo largo de este proyecto.

A la Dra. Anabel, al Dr. José Pedraza y a la Dra. Perla por sus atinados comentarios en la escritura de este trabajo.

DEDICATORIAS

A mi madre por apoyarme incondicionalmente y motivarme a cumplir mis sueños.

A mi padre por enseñarme que todo se puede lograr.

A Hugo por estar y vivir conmigo todas mis aventuras y sobre todo por darme todo su amor y fortaleza.

A mis hermanos por alentarme a seguir adelante sin miedos.

A mi amado Mango, junto con Luna, Gorda y Gordo por darme momentos de alegría inigualables.

CARACTERIZACIÓN DE LOS PATRONES DE DÉFICIT ENERGÉTICO Y ESTRÉS OXIDATIVO/NITROSATIVO INDUCIDOS POR PEROXINITRITO EN MODELOS EXPERIMENTALES DE LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

Alteraciones conductuales evocadas por la lesión intraestriatal de ácido quinolínico y 3-nitropropiónico. Posible participación del peroxinitrito.

1. Enfermedad de Huntington.....	1
1.1 Antecedentes históricos.....	1
1.2 Epidemiología.....	1
1.3 Genética.....	1
1.4 Manifestaciones clínicas.....	2
1.5 Patogenia.....	3
1.6 Alteraciones neuroquímicas.....	4
1.7 Huntingtina y sus interacciones.....	5
2. Modelos Experimentales de la EH.....	6
2.1 Modelos genéticos.....	6
2.1.1 Ratones R6.....	9
2.1.2 Ratones Knock-in.....	11
2.2 Modelos fenotípicos.....	11
2.2.1 Modelos Excitotóxicos.....	12
2.2.1.1 Ácido quinolínico (QUIN).....	13
2.2.1.1.1 Vía de la kinurenina.....	13
2.2.1.1.1.1 Metabolismo de la vía de la kinurenina	15
2.2.1.1.1.2 Metabolitos neuroactivos de la VK.....	16
2.2.1.1.2 QUIN y daño excitotóxico.....	17
2.2.1.1.3 QUIN y daño oxidativo.....	18
2.2.1.1.4 QUIN y alteraciones energéticas.....	20

2.2.1.1.5 QUIN y alteraciones conductuales.....	21
2.2.1.1.6 QUIN y alteraciones morfológicas.....	22
2.2.1.1.7 QUIN y muerte neuronal.....	23
2.2.1.1.8 QUIN en la EH.....	25
2.2.2 Alteraciones en el metabolismo energético.....	26
2.2.2.1 Acido 3-nitropropiónico.....	27
2.2.2.1.1 Antecedentes.....	27
2.2.2.1.2 3-NP, déficit energético y daño oxidativo.....	27
2.2.2.1.3 3-NP y excitotoxicidad.....	28
2.2.2.1.4 3-NP y alteraciones conductuales.....	29
2.2.2.1.5 3-NP y muerte celular.....	30
3. Cadena de transporte de electrones.....	31
3.1 Potencial de membrana en células neuronales.....	32
4. Estrés oxidativo y nitrosativo.....	32
4.1 Especies reactivas de oxígeno (ERO).....	32
4.2 Daño oxidativo.....	34
4.2.1 Peroxidación de lípidos.....	34
4.3 Sistemas antioxidantes.....	36
4.4 Especies reactivas de nitrógeno.....	37
4.4.1 Peroxinitrito.....	38
4.4.1.1 Formación.....	38
4.4.1.2 Toxicidad.....	39
4.4.1.3 Metaloporfirinas.....	42
4.4.1.3.1 Generalidades.....	42
4.4.1.3.2 Mecanismo de acción.....	43
4.4.1.3.3 Fe(TPPS).....	44
5. Planteamiento y Justificación del problema.....	46
6. Hipótesis.....	47

7. Objetivos.....	48
7.1 Objetivo General.....	48
7.2 Objetivos Particulares.....	48
8. Metodología.....	49
8.1 Reactivos.....	49
8.2 Animales.....	49
8.3 Diseño experimental.....	49
8.4 Determinación conductual.....	50
8.5 Obtención de sinaptosomas.....	50
8.6 Determinación de la peroxidación de lípidos en sinaptosomas.....	50
8.7 Estimación de la viabilidad mitocondrial.....	50
8.8 Análisis estadístico.....	51
8.9 Diagrama de flujo.....	51
9. Resultados.....	52
9.1 Efecto de la lesión intraestriatal con QUIN y 3-NP en la distancia total recorrida.....	5
2	
9.2 Efecto de la inyección bilateral intraestriatal con QUIN y 3-NP en la actividad horizontal de la rata.....	54
9.3 Efecto de la lesión con QUIN y 3-NP en la actividad vertical. Posible efecto protector del Fe(TPPS).....	56
9.4 Efecto del Fe(TPPS) en la lipoperoxidación evocada por QUIN y el 3-NP.....	58
9.5 El Fe(TPPS) atenuó la disfunción mitocondrial evocada por el QUIN y el 3-NP.....	60
10. Discusión.....	62
11. Conclusiones.....	64

**Participación del calcio intracelular en el daño oxidativo evocado por un modelo sinérgico
(QUIN + 3-NP)**

12. Excitotoxicidad y déficit energético.....	65
13. Potenciación de la excitotoxicidad por alteraciones en el metabolismo.....	65
14. Hipótesis.....	68
15. Objetivos.....	69
15.1 Objetivo general.....	69
15.2 Objetivos particulares.....	69
16. Metodología.....	70
16.1 Materiales y animales.....	70
16.2 Preparación de sinaptosomas.....	70
16.3 Determinación de la peroxidación de lípidos en sinaptosomas.....	70
16.4 Estimación de la participación del calcio intracelular.....	71
16.5 Análisis estadístico.....	70
17. Resultados.....	72
17.1 Efecto sinérgico de la co-administración de 3-NP (166.6µM) + QUIN (21 µM) en la peroxidación de lípidos. Atenuación parcial por el MK-801.....	72
17.2 ALCAR atenuó la PL inducida por QUIN + 3-NP de manera concentración dependiente, en presencia y ausencia de calcio extracelular	74
17.3 El FeTPPS disminuyó el daño oxidativo evocado por la co-administración de QUIN+3-NP.....	76
17.4 Efecto de la SAC sobre la PL inducida por QUIN + 3-NP.....	78
17.5 Efecto del BAPTA-AM sobre la PL inducida por QUIN + 3-NP.....	80
18. Discusión.....	81
19. Conclusiones.....	84

Participación de proteasas en el daño oxidativo, energético, y la muerte celular evocados por un modelo sinérgico de daño por la condición QUIN + 3-NP

20. Muerte celular.....	85
20.1 Vía intrínseca.....	87
20.2 Vía extrínseca.....	88
21. Caspasas y calpaínas.....	90
21.1 Lenguaje entrecruzado entre caspasas y calpaínas.....	91
22. Participación de proteasas en el daño neurotóxico evocado por el 3-NP.....	92
23. Planteamiento del Problema.....	94
24. Hipótesis.....	95
25. Objetivos.....	96
25.1 Objetivo general.....	96
25.2 Objetivos Particulares.....	96
26. Metodología.....	97
26.1 Animales.....	97
26.2 Reactivos.....	97
26.3 Preparación e incubación de rebanadas estriatales.....	97
26.4 Evaluación funcional de las rebanadas estriatales a través de la reducción de MTT.....	97
26.5 Peroxidación de Lípidos.....	98
26.6 Actividad de lactato deshidrogenada.....	98
26.7 Fragmentación del DNA.....	98
26.8 Análisis estadístico.....	99
26.9 Diagrama de Flujo.....	99
27. Resultados.....	100
27.1 Efecto de los inhibidores de proteasas en el aumento de la actividad de LDH por el efecto sinérgico de QUIN + 3-NP.....	100
27.2 Efecto protector de z-VAD e IC1 en la PL evocada por QUIN y 3-NP a concentraciones tóxicas, y en un modelo de co-administración evocado por las mismas toxinas a concentraciones subtóxicas.....	102

27.3 Disfunción mitocondrial evocada por QUIN + 3-NP y por concentraciones tóxicas de estos agentes. Efecto atenuador de los inhibidores de proteasas.....	104
27.4 Correlación para el modelo de 3-NP + QUIN.....	106
27.5 Correlación para el modelo de QUIN _{tóxico}	108
27.6 Correlación para el modelo de 3-NP _{tóxico}	110
27.7 Efecto protector de los inhibidores de proteasas sobre la degradación de DNA inducida por la co-administración de QUIN + 3-NP.....	112
28. Discusión.....	113
29. Conclusiones.....	120
30. Bibliografía.....	121
31. Artículos publicados.	

ABREVIATURAS

❖ ADN	Acido desoxirribonucleico
❖ ALCAR	Acetil L-Carnitina
❖ AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionato
❖ BH ₄	(6R)-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina
❖ Ca ²⁺ _c	Calcio citosolico
❖ Ca ²⁺ _m	Calcio mitocondrial
❖ CAG	Citocina Adenina Guanina
❖ CaM	Calmodulina
❖ EH	Enfermedad de Huntington
❖ ERO	Especies reactivas de oxigeno
❖ ERN	Especies Reactivas del nitrogeno
❖ FeTPPS	5,10,15,20-tetrakis(4-fenilsulfonato)porfirinato de Fe(III)
❖ FIA	Factor inductor de apoptosis
❖ GABA	Acido γ -amino butirico
❖ GluR	Receptor glutamatérgico
❖ iGluR	Receptor glutamatérgico ionotrópico
❖ mGluR	Receptor glutamatérgico metabotrópico
❖ GADPH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
❖ GPx	Glutación peroxidasa
❖ 3-HAO	3-Hidroxiantranilico dioxigenasa
❖ 3-HK	3-Hidroxikinurenina
❖ H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
❖ Htt	Huntingtina
❖ IAP	Proteína inhibidora de apoptosis
❖ IBO	Acido iboténico
❖ IC1	Inhibidor de calpaínas 1
❖ JNK	c-jun N-terminal cinasa
❖ KAT	Kinurenina aminotransferasa
❖ KA	Acido kaínico
❖ KYNA	Acido kinurénico
❖ LDH	Lactato deshidrogenasa
❖ L-KYN	L-Kinurenina

❖ MnTBAP	Tetrakis-(4-ácido benzoico)porfirinato de Mn(III)
❖ MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
❖ NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido
❖ NBT	Nitroazul de tetrazolio
❖ NFκB	Factor Nuclear Kappa B
❖ NMDA	N-metil-D-aspartato
❖ NMDAr	Receptor para NMDA
❖ 3-NP	Acido nitropropiónico
❖ NO	Óxido nítrico
❖ O ₂ ^{•-}	Anión superóxido
❖ •OH	Radical hidroxilo
❖ ONOO ⁻	Peroxinitrito
❖ ONOOH	Ácido peroxinitroso
❖ PARP	poli(ADP) polimerasa
❖ PL	Peroxidación de lípidos
❖ PPSE	Potencial postsináptico excitatorio
❖ QUIN	Ácido quinolínico
❖ RL	Radicales libres
❖ SAC	S-alil-cisteína
❖ SDH	Succinato deshidrogenasa
❖ Smac/DIABLO	Segundo activador de caspasas derivado de mitocondria con unión directa a IAP
❖ SNC	Sistema Nervioso Central
❖ SOD	Superóxido dismutasa
❖ SON	Sintasa de óxido nítrico
❖ SONc	Sintasa de óxido nítrico constitutiva
❖ SONi	Sintasa de óxido nítrico inducible
❖ SONt	Sintasa de óxido nítrico total
❖ TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
❖ TDO	Triptofano dioxigenasa
❖ YAC	Cromosoma artificial de levadura
❖ Z-VAD	Inhibidor de caspasas

RESUMEN

En diferentes desordenes neurodegenerativos coexisten dos factores predominantes: el daño excitotóxico y el déficit energético, cada uno de estos eventos puede ser consecuencia del otro y pueden estar ocurriendo a la vez; en este patrón de daño el Ca^{2+} juega un papel importante debido a que este puede encender diferentes vías metabólicas que pueden concluir en la muerte celular. En este trabajo nosotros evaluamos en un principio el efecto del ácido quinolínico (QUIN) y el ácido 3-nitropropiónico (3-NP) en la actividad motora, la lipoperoxidación (PL) y la funcionalidad mitocondrial de ratas lesionadas con estas toxinas, así como la posible participación del ONOO^- a través del catalizador de su descomposición (Fe(TPPS)). Los datos obtenidos muestran que tanto el QUIN como el 3-NP disminuyen la actividad motora de las ratas 24 h y 7 días post lesión, y que el Fe(TPPS) parece aumentar la actividad vertical únicamente a las 24 h post-lesión para el caso del QUIN, y a los 7 días post-lesión para el 3-NP. Adicionalmente, el QUIN y el 3-NP aumentaron la PL y disminuyeron la funcionalidad mitocondrial a los dos tiempos evaluados y estos marcadores fueron totalmente atenuados por el Fe(TPPS) para ambos casos. Estos datos nos muestran que el QUIN y el 3-NP disminuyen la actividad motora de las ratas y sugieren la participación del ONOO^- en el daño evocado por estas toxinas.

Por otra parte, evaluamos el papel del calcio en la PL evocada por la co-administración de 3-NP+QUIN en presencia de concentraciones subtóxicas (166 y 21 μM , respectivamente), en sinaptosomas de rata. Simultáneamente, y con la finalidad de caracterizar posibles mecanismos involucrados en la generación de daño oxidativo, se exploraron los efectos de fármacos con diferentes actividades, tales como el antagonista de receptores para NMDA, el MK-801; el precursor energético y agente antioxidante, acetil L-carnitina; el catalizador de la descomposición de peroxinitrito, Fe(TPPS) ; y el atrapador de radicales libres, la S-Alilcisteína, todos ellos en concentraciones crecientes (10-1000 μM). Grupos adicionales fueron incubados en paralelo en presencia de un quelante de calcio intracelular (BAPTA-AM) bajo las mismas condiciones experimentales. Los sinaptosomas expuestos a 3-NP + QUIN en un medio con calcio extracelular mostraron un incremento del 76% en la PL por arriba del control, y dicho efecto fue parcialmente atenuado por los agentes probados en el siguiente orden de potencia: Dizocilpina = Fe(TPPS) > acetil-L-carnitina > S-alilcisteína. Bajo la condición de privación de calcio extracelular, el porcentaje de PL producido por ambas toxinas fue de 49%. Por su parte, el BAPTA-AM disminuyó más intensamente la PL inducida por ambas toxinas llegando hasta niveles basales. Nuestros resultados sugieren que el calcio intracelular juega un papel predominante en el daño oxidativo en este nuevo paradigma, soportando el concepto del sinergismo entre los mecanismos tóxicos de estas dos toxinas en el estrés oxidativo.

Finalmente evaluamos la participación de proteasas en este modelo de co-administración en rebanadas estriatales de ratas a través de sus inhibidores (ICI, para calpaínas y z-VAD para caspasas) sobre la actividad de lactato deshidrogenasa (LDH), PL, funcionalidad mitocondrial y daño al DNA. La co-administración de QUIN+3-NP después de la primera hora de incubación produjo un aumento significativo de la PL, así como de la actividad de LDH, dicho efecto fue totalmente atenuado tanto por el z-VAD como por el ICI; sin embargo, en el caso de la funcionalidad mitocondrial, la cual se vió reducida por el empleo de estas toxinas, los inhibidores no tuvieron efecto significativo. A las tres horas de incubación observamos un efecto más pronunciado en los marcadores de daño producidos por el QUIN+3-NP, en este caso el ICI redujo por debajo del control los niveles de PL, al igual que la actividad de LDH, sin embargo no tuvo efecto en alguno en la reducción de la funcionalidad mitocondrial; por su parte de z-VAD redujo significativamente los niveles de PL y de la actividad LDH, y los niveles de funcionalidad mitocondrial fueron parcialmente recuperados. La PL y la actividad de LDH a las 6 horas de incubación disminuyeron con respecto a las 3 h de incubación con las toxinas, pero aun así eran significativamente diferentes al control y estos parámetros fueron parcialmente atenuados por ambos inhibidores de proteasas; la funcionalidad mitocondrial se mantuvo reducida al 50% y únicamente fue atenuada por el inhibidor de caspasas. En cuanto a la fragmentación de DNA se observa una degradación más que una fragmentación al co-incubar con las toxinas; sin embargo, el empleo de los inhibidores de proteasas disminuyó este patrón de degradación. Estos hallazgos sugieren la participación temprana de ambas proteasas en este modelo de daño neuronal, aunque aún falta caracterizar el tipo de muerte celular que ocurre en este paradigma.

Los modelos de daño neuronal evaluados en este trabajo reflejaron la importancia del calcio, de las ERO y la participación de las diferentes proteasas, lo cual puede conllevar a la muerte celular, sin embargo es importante resaltar que los tres modelos evaluados en este trabajo actúan de manera diferencial, y por lo cual es necesario caracterizar los mecanismos que ocurren en estos paradigmas.

1. Enfermedad de Huntington

1.1 Antecedentes históricos

En 1872, George Huntington hizo la primera descripción clínica completa y clara de una enfermedad familiar, cuyos pacientes había estudiado junto a su abuelo y su padre en Long Island, Nueva York. El seguimiento familiar de los afectados condujo posteriormente hasta dos hermanos, que en 1630 partieron con sus familias desde Essex (SE de Inglaterra) hacia Boston. En los tres siglos siguientes, unos 1000 descendientes de estos ancestros padecieron la enfermedad; muchos de ellos fueron acusados de brujería al ser interpretados sus movimientos anormales como burla a Jesucristo en la cruz (Arbor & DeJong, 1970). En este grupo de pacientes se destacaban principalmente cuatro signos: herencia, corea, demencia y muerte después de 15-20 años de haber presentado los síntomas. El trastorno que este médico definió pasó a ser conocido como la enfermedad de Huntington (EH), la cual fue caracterizada clínicamente por alteraciones del movimiento, de la capacidad intelectual y de la conducta.

1.2 Epidemiología

La EH afecta a todas las razas, con una incidencia de 4-7 afectados por cada 100 000 personas, sin distinción de sexo (Harper, 1992). Los grupos con mayor incidencia se encuentran en la región de Zulia ubicada junto al lago de Maracaibo, Venezuela, en la isla de Tasmania, Australia, y en Moray Firth, al noroeste de Escocia (Lowe et al., 1997; Azzarelli, 2000).

1.3 Genética de la EH

La EH es un desorden autosómico dominante, causado por la mutación genética en el gen IT15. La EH ocurre cuando el gen de la proteína huntingtina (htt), localizado en la región 4p16.3 del brazo corto del cromosoma 4, muestra una expansión del trinucleotido citosina-adenina-guanina (CAG) en el exón 1 del gen de la htt, llevando así a la producción de la proteína htt mutante con repeticiones largas de poliglutamina (Gusella et al., 1983; The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993). Esta enfermedad se caracteriza por la degeneración de la corteza cerebral y el estriado. Existe una correlación inversa entre el número de tripletes CAG y la edad de aparición de la enfermedad (Persichetti et al., 1995): a mayor número de tripletes, la edad de aparición de los síntomas es menor y éstos son más severos. Cuando la expansión de poliglutaminas es ≥ 40 , la enfermedad se expresa en la edad adulta. La forma juvenil de la patología se observa cuando las repeticiones del triplete exceden las 60 repeticiones, y éstos se presentan en individuos de 15-20 años de edad mostrando una rápida progresión de la enfermedad, la presencia de rigidez, convulsiones y la acentuada pérdida de la funciones cognitivas; la muerte de los pacientes ocurre 7-10 años más tarde (Rasmussen, 2000).

1.4 Manifestaciones clínicas

La EH en adultos se caracteriza por disturbios psiquiátricos tales como irritabilidad, agresividad y depresión, lo cual precede a las alteraciones motoras involuntarias. La progresión en las alteraciones motoras, también conocidas como movimientos coreicos - debido a su parecido con las posturas de danza - se presentan en tres etapas: 1) Inicialmente los movimientos involuntarios son acompañados por temblor; 2) Progresivamente, durante la segunda fase o fase hiperkinética, los pacientes pierden la coordinación del cuerpo debido a la presencia de movimientos involuntarios abruptos (coreicos), incluyendo los músculos de las extremidades, cabeza y tronco, limitando las capacidades del paciente para sus tareas diarias (Fig. 1). Un decline progresivo en las funciones cognoscitivas y una pérdida de la masa corporal son característicos de esta fase; 3) En la fase final, aproximadamente 20 años más tarde después de su inicio, los movimientos coreiformes son substituidos por rigidez y bradicinesia (Harper, 1992).



Figura 1. Movimientos coreicos generalizados en un paciente con EH.

1.5 Patogenia

El núcleo estriado es el área cerebral más afectada en la EH, la cual se caracteriza por la degeneración selectiva de las neuronas estriatales, aunque en etapas más avanzadas también se encuentra afectada la corteza cerebral, caracterizándose estas lesiones por la atrofia de las neuronas piramidales de la capa III, V y VI de la corteza motora y asociativa (Cudkowicz & Kowall, 1990; Difiglia et al., 1997; MacDonald & Halliday, 2002). Es evidente la abundante formación de inclusiones y la pérdida celular de neuronas espinosas medianas del estriado que expresan ácido gamma aminobutírico (GABA) como neurotransmisor y las neuronas piramidales glutamatérgicas largas de la corteza. Muchas de las alteraciones fenotípicas de la EH son consecuencia de la pérdida de neuronas espinosas medianas del neostriado, el cual incluye al putamen y al globo pálido (Graveland et al., 1985; Vonsattel et al., 1985). Las neuronas espinosas medianas constituyen el 95% del total de la población neuronal en el neostriado y reciben proyecciones corticales glutamatérgicas. Hay dos grandes poblaciones de neuronas estriatales GABAérgicas cuya muerte no ocurre simultáneamente (Reiner et al., 1988). En estadios tempranos de la enfermedad (Fig. 2A), las neuronas que co-expresan encefalina y que proyectan al segmento externo del globo pálido a través de la vía indirecta son preferentemente vulnerables. Normalmente en el circuito de los ganglios basales, la vía indirecta está involucrada en la inhibición de neuronas de la corteza motora, y por lo tanto en la inhibición de movimientos voluntarios (Albin et al., 1989; Alexander & Crutcher, 1990; Ramaswamy et al., 2004). La muerte de estas neuronas que contienen encefalina causa una marcada hipercinesia y los movimientos coreiformes típicos de la EH. En los estadios tardíos de la enfermedad la muerte ocurre selectivamente en neuronas espinosas medianas que co-expresan sustancia P y proyectan al globo pálido a través de la vía directa (Fig. 2B). Esta vía está normalmente involucrada en la iniciación de movimientos voluntarios (Albin et al., 1989; Alexander & Crutcher, 1990), y por lo tanto, la muerte de esta subpoblación produce hipocinesia y síntomas parkinsonianos. Durante la progresión de la enfermedad las neuronas del caudado mueren más tempranamente y más extensamente que las que están en el putamen (Vonsattel et al., 1985). Adicionalmente, se sabe que la degeneración de neuronas en el estriado no ocurre uniformemente ya que hay una selectiva preservación de interneuronas. Las interneuronas espinosas largas y medianas que expresan acetilcolina (Ferrante et al., 1987a), NADPH diaforasa (Ferrante et al., 1987b), y somatostatina (Dawbarn et al., 1985) permanecen preservadas. Las interneuronas estriatales que co-expresan neuropeptido Y son sobrerreguladas en algunos cerebros de pacientes con EH (Dawbarn et al., 1985). La degeneración cortical es también una característica prominente de la EH y contribuye en gran parte al déficit de la función cognoscitiva. La pérdida celular ocurre en diversas capas de la corteza pero es más prominente en las capas V y VI (Hedreen et al., 1991). A este respecto, Hedreen y colaboradores han reportado hasta un 71% de pérdida neuronal en la capa V y 57% de pérdida en la capa VI de la corteza dorsal frontal. También se ha reportado un 25% de disminución en el espesor de la corteza prefrontal dorso-lateral, con un incremento en la densidad de células gliales en la capa VI (Selemon et al., 2004). Dado que la capa VI de la corteza proyecta para el tálamo, claustró y otras áreas corticales, pero no para el cuerpo estriado, es probable que la pérdida

de células corticales sea un proceso primario y no secundario a la degeneración valeriana de axones terminales debida a la pérdida de células estriatales.

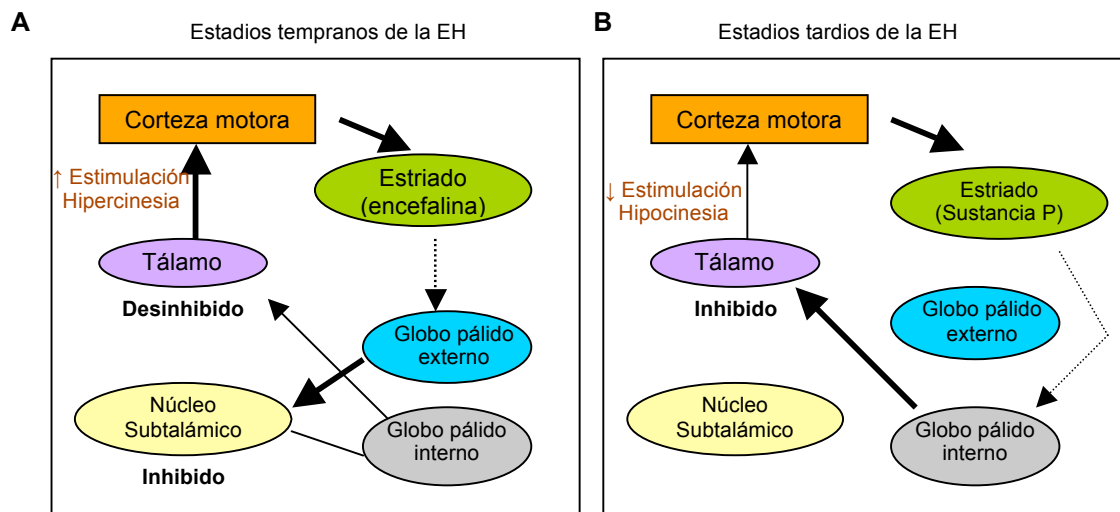


Figura 2. Alteraciones del circuito motor en la fase temprana (A) y tardía (B) de la EH, (Tomada de Ramaswamy et al., 2007).

1.6 Alteraciones neuroquímicas

Estudios con resonancia magnética funcional han revelado que pacientes presintomáticos con la EH muestran reducción en la recaptura de glucosa en las áreas más afectadas (Kuhl et al., 1982). De la misma forma, la tomografía de emisión de positrones de pacientes sintomáticos sugiere la reducción en el metabolismo de glucosa en el estriado y la corteza cerebral (Kuwert et al., 1990). También se ha encontrado un incremento en las concentraciones de lactato en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con la enfermedad (Jenkins et al., 1998). Por otra parte, alteraciones en la maquinaria enzimática que involucra la producción de ATP han sido descritas en tejido de cerebros *post mortem* de estos pacientes. A este respecto, se ha reportado la reducción en la actividad de los complejos mitocondriales II, III y IV durante el avance de las etapas de la enfermedad (Browne et al., 1997). Más recientemente, una disminución en radio metabólico cerebral de glucosa ha sido observado en el estriado de pacientes en fase temprana con EH, sugiriendo así la alteración en el metabolismo glucolítico (Powers et al., 2007). Todas estas alteraciones son restringidas a los ganglios basales, la región del cerebro más afectada en este padecimiento. Un estudio relevante a este respecto reveló una modesta pero significativa reducción en la actividad de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) en tejido *post mortem* de caudado (Kish et al., 1998), y bajo condiciones de estrés se observa una reducción de GAPDH en fibroblastos de pacientes con la EH (Cooper et al., 1998). Estas observaciones son relevantes debido a que la GAPDH es una proteína citoplasmática que interactúa con la htt mutante (Burke et al., 1996), aunque se ignora si esta interacción contribuye a la patogénesis de la enfermedad.

Alteraciones en otras enzimas mitocondriales del ciclo de Krebs tales como la piruvato deshidrogenasa y la aconitasa, han sido detectadas (Tabrizi et al., 1999; Butterworth et al., 1985). Estos hallazgos indican que las alteraciones en el metabolismo energético están presentes en pacientes con EH incluso antes de las manifestaciones iniciales, lo cual puede facilitar el daño excitotóxico neuronal. En cerebros *post mortem* también se ha observado que la proteína htt mutada se agrega en neuronas estriatales, así como en otras regiones de neurotaxis, como la corteza, el tálamo, el hipotálamo y la sustancia nigra pars compacta.

Notablemente, algunos de los defectos metabólicos descritos en tejido *post mortem* de la EH también están presentes en los modelos de ratones transgénicos; por ejemplo, una actividad deficiente del complejo II mitocondrial y de la aconitasa han sido identificados en ratones transgénicos R6/2 (Browne et al., 2004). Más recientemente, la disfunción mitocondrial en la EH ha sido relacionada con una función alterada de PGC-1 α , un co-activador transcripcional asociado con la expresión de genes mitocondriales (Nelly et al., 2004). Se ha observado también en pacientes presintomáticos una reducción en los niveles de RNAm de PGC-1 α .

1.7 Huntingtina y sus interacciones

El gen de la htt tiene una amplia expresión, no solo en sistema nervioso, sino también en una gran variedad de tejidos (Strong et al., 1993). De la misma forma, las longitudes de expansión de CGA varía en diferentes tejidos, incluso en diferentes estructuras del sistema nervioso: las expansiones son más cortas en el cerebelo que en la corteza frontal y el estriado, predominando siempre la expresión neuronal sobre la glial (Strong et al., 1993; Furtado et al., 1996). En el cerebro normal la htt se localiza sobre todo en el citoplasma del soma, mientras que la distribución subcelular en el cerebro de pacientes con la EH es diferente a la normal; en la corteza cerebral y el estriado a veces se detectan cúmulos perinucleares densos de la proteína. Una propiedad importante de las expansiones de poliglutaminas es la capacidad de reclutar e interactuar con otras proteínas y su efecto sobre la transcripción génica, pudiendo simular la acción de ciertos factores de transcripción con dominios ricos en glutaminas.

Dentro de las proteínas con las que interactúa la htt mutante se encuentran la GADPH, la proteína asociada a la htt (HAP1), y proteínas de interacción con la htt conocidas como HIP1 (proteína pro-apoptótica) y HPI2 (se conjuga con la ubiquitina) (Li et al., 1995). La htt también activa factores de transcripción tales como CA150, un péptido que contiene una repetición glutamina-alanina, y el cual se encuentra aumentado en el cerebro de pacientes con la EH (Holbert et al., 2001).

Tanto la htt normal como la mutada son degradadas por el proteasoma, pero la velocidad de degradación es inversamente proporcional a la longitud de las expansiones de poliglutaminas (Jana et al., 2001). Se ha demostrado que la inhibición de actividad del sistema ubiquitina/proteasoma duplica la cantidad de agregados ubiquitinados, indicando que las inclusiones intracelulares se forman cuando se agota la capacidad de dicho sistema para degradar la htt mutada propensa a agregación (Waelter, 2001). El efecto de la degradación de la htt puede ocurrir por sobrecarga de la proteína anormal, que podría sobrepasar la capacidad de degradación del proteasoma, o por su disminución como

consecuencia de la enfermedad, hecho que ya ha sido probado (Gray, 2001). La presencia de ubiquitina en los agregados debe representar una deficiencia celular para remover proteínas anormales, una falla que permite su agregación. Por otra parte, evidencia reciente en estudios *in vitro* demuestra que la expresión de htt en glía lleva a la formación de inclusiones astrocíticas e inhabilita de esta manera el secuestro de glutamato sináptico, el mayor contribuyente a la excitotoxicidad neuronal (Shin et al., 2005).

2. Modelos experimentales de la HD

Diversos grupos han empleado modelos experimentales de la EH para estudiar la patogénesis de la enfermedad, y elucidar así las áreas del cerebro involucradas en el decline estructural y funcional, así como la evaluación de intervenciones potencialmente terapéuticas. Dentro de los modelos fenotípicos experimentales (aquellos que mimetizan las alteraciones bioquímicas, morfológicas y conductuales de la enfermedad) se encuentran los de disfunción mitocondrial y los que inducen muerte neuronal por excitotoxicidad. Estos modelos se realizan mayoritariamente por infusión de ácido 3-nitropropiónico o ácido quinolinico, respectivamente. El descubrimiento en 1993 de la mutación del gen de la htt llevó a la creación de modelos que incorporan el mismo defecto genético. Estos modelos incluyen roedores transgénicos y knock-in, los cuales son representativos de la progresión y de la patología de la EH.

2.1 Modelos genéticos

El gen de la htt está constituido por 67 exones, y el polimorfismo inestable de la secuencia de repeticiones de CAG está localizado en el primer exón (Ambrose et al., 1994). El producto de este gen es una proteína de 348 kDa expresada a través de todo el cuerpo. El papel fisiológico de la htt es aún desconocido, pero se ha establecido que puede estar relacionado con el transporte vesicular y la transcripción celular (Cattaneo et al., 2005). La tecnología molecular ha permitido el desarrollo de modelos genéticos murinos que capturan la naturaleza hereditaria de la EH. Estos modelos introducen genes en la línea germinal que expresan la proteína mutada htt y han sido empleados como herramientas para el estudio bioquímico, morfológico y funcional de los cambios asociados con la expresión de la htt mutante. Las líneas de expresión creadas en ratones y ratas, ya sea de manera trucada o de cadena larga (full-length) de la forma mutante del gen para htt, son insertadas al azar en el genoma (modelos transgénico) (Tabla 1), o específicamente en el locus del gen htt en roedores (modelos knock-in) (Tabla 2). Los modelos en ratones transgénicos R6/1 y R6/2 fueron primeramente caracterizados por Mangiarini y colaboradores (1996) y son ampliamente utilizados en la actualidad. Estos ratones expresan el exón 1 mutante del gen htt humano y exhiben tanto síntomas conductuales como anatómicos. Los ratones R6/1 expresan aproximadamente 114 repeticiones de CAG, mientras que los R6/2 expresan alrededor de 150 repeticiones. Los ratones transgénicos N171-82Q expresan los primeros 171 aminoácidos de la proteína htt, teniendo 82 repeticiones de CAG (Schilling et al., 1999). Los síntomas conductuales y anatómicos de este modelo se desarrollan más tardíamente que en los ratones R6. Por su parte, la creación del ratón transgénico con el cromosoma artificial de

levadura (YAC) involucra la clonación de un vector artificial de levadura que contiene la repetición expandida de la poliglutamina en el genoma del ratón (Hodgson et al., 1999).

Los modelos invertebrados como *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster* han permitido pruebas rápidas y de alto rendimiento para hipótesis específicas y estrategias terapéuticas novedosas. El modelo de *C. elegans* expresa la expansión de repeticiones de poliglutamina en el sistema nervioso del gusano (Brignull et al., 2006). Las largas repeticiones de CAG resultan en la formación de agregados de poliglutamina en células musculares y disminuye la motilidad total. El modelo en *Drosophila* de la EH expresa la expansión en las repeticiones de poliglutamina en el ojo de la mosca (Jackson et al., 1998). En este modelo, aunque el desarrollo del ojo es normal, el progresivo desarrollo de inclusiones en los fotorreceptores hace que subsecuentemente éstos degeneren.

Modelo Animal	Especie	Construcción	Promotor	Numero de repeticiones de CAG	Células afectadas	Síntomas motores	Síntomas cognoscitivos
R6/2	Ratón transgénico	Primeros 90 aminoácidos de la htt humana insertados aleatoriamente en el genoma del ratón (Mangiarini et al., 1996)	Huntingtina humana	144	90 días: Pérdida y atrofia neuronal en el estriado (Snack et al., 2005). 12 semanas: Pérdida de neuronas positivas a encefalina en el estriado (Sun et al., 2002). Inclusiones en todo el cerebro.	40 días: Decline en la prueba del rotarod. 9 semanas: Movimientos estereotipados tipo corea, temblor en reposo, conducta de agarre, convulsiones, narcolepsia, pérdida de peso, estremecimiento espontáneo (Mangiarini et al., 1996; Snack et al., 2005; Luesse et al., 2001).	20 días: Incremento de la actividad exploratoria en la prueba de campo abierto. 60 días: Disminución en la conducta exploratoria de campo abierto. 3.5 semanas: Déficit en el laberinto de Morris (Liote et al., 1999)
R6/1	Ratón transgénico	Primeros 90 aminoácidos de la htt humana insertados aleatoriamente en el genoma del ratón (Mangiarini et al., 1996)	Huntingtina humana	116	5 meses: Disminución de DARP-32 en el estriado. Disminución del volumen estriatal y presencia de inclusiones celulares (van Dellen et al., 2000).	22 semanas: Se alcanza el máximo peso corporal y después desciende. Anormalidades locomotoras, determinado a través de un análisis de huellas y la conducta de agarre de las extremidades posteriores (Naver et al., 2003).	Disminución de la ansiedad en la prueba de campo abierto.
N171-820	Ratón transgénico	Primeros 171 aminoácidos YAC de la htt humana insertados aleatoriamente en el genoma del ratón (Schilling et al., 1999).	Prion	62	16 semanas: 25% de pérdida neuronal en estriado, 20% de encogimiento celular. Inclusiones en estriado, hipocampo y corteza (McBride et al., 2006)	11 semanas: Déficit en el rotarod, conducta de agarre, pérdida de peso (McBride et al., 2003)	14 semanas: Déficit en el laberinto radial y el trabajo de memoria (Ramaswamy et al., 2004).
YAC	Ratón transgénico	Cromosoma artificial de levadura que expresa la proteína htt humana completa (Hodgson et al., 1999)	Promotor de la htt humana	72, 128	12 meses: 18-40% pérdida celular, incremento en el marcaje nuclear de htt. 18 meses: Inclusiones en la cepa YAC 128 (Hodgson et al., 1999; Show et al., 2003)	3 meses: Hipercinesia en la prueba de campo abierto. 6 meses: hipocinesia en la prueba de campo abierto. 12 meses: 50% de pérdida de peso. Pronunciada conducta de rotación, anormalidades en el andar, ataxia y conducta de agarre de las extremidades posteriores. Decline progresivo en la prueba del rotarod.	Déficit en el laberinto T (Van Raamsdonk et al., 2005).
Rata transgénica	Rata	1962 pares de bases de la región N-terminal del gen de htt de rata (von Horsten et al., 2003).	Promotor de la htt endógeno de rata	512 repeticiones derivadas humanas	8 meses: alargamiento de ventrículos laterales. 12 meses: Inclusiones en todo el cerebro.	1-2 meses: las ratas transgénicas muestran una mejor conducta en el rotarod que las ratas wild-type pero disminuye progresivamente. 10-15 meses: Muestran anormalidades locomotoras y discinesia de cabeza. 12 meses: Recorren más lentamente la viga. 24 meses: 20% de pérdida de peso (Nguyen et al., 2006).	12 meses: déficit en el laberinto radial.

Tabla 1. Características de los modelos transgénicos de la EH (Tomada de Ramaswamy et al., 2007)

Especie	Construcción	Promotor	Numero de repeticiones de CAG	Células afectadas	Síntomas motores	Síntomas cognitivos
Raton HdhQ92 (Wheeler et al., 1999, 2000)	Sustitución del exón 1 del gen de la htt de ratón por el exón 1 mutante humano.	Promotor htt de ratón	92	Degeneración no estriatal. 4.5 meses: Translocación de la proteína htt mutante a núcleo.	No se observan síntomas.	No hay síntomas.
Raton HdhQ111 (Wheeler et al., 1999, 2000)	Sustitución del exón 1 del gen de la htt de ratón por el exón 1 mutante humano.	Promotor de ratón htt	111	Degeneración no estriatal. 4.5 meses: La htt se transloca al núcleo. 24 meses: Gliosis estriatal.	24 meses: Alteraciones locomotoras.	No hay síntomas
Raton CAG140 (Menalled et al., 2003)	Inserción de las repeticiones de CAG en el gen de la htt de ratón.	Promotor de ratón htt	140	2 meses: Inclusiones nucleares y neuropilo en estriado, corteza, hipocampo y cerebelo.	1 mes: Incremento en la actividad locomotora la cual disminuye al cuarto mes. 12 meses: Disminución en la longitud de la zancada.	No hay síntomas
Raton CAG150 (Lin et al., 2001; Yu et al., 2003)	Inserción de las repeticiones de CAG en el gen de la htt de ratón.	Promotor de ratón htt	150	14 meses: Incremento en la gliosis estriatal. El estriado muestra un incremento en EM48 positivo en agregados nucleares. Desglose de mielina.	4 meses: Déficit progresivo en el rotarod, alteraciones en el modo de agarre, hipoactividad, disturbios locomotores. 25 meses: Son significativamente más pequeños que los wild-type.	No hay síntomas

Tabla 2. Características de los modelos knock-in (Tomada y modificada de Ramaswamy et al., 2007)

2.1.1 Ratones transgénicos R6

Los R6/2 son los ratones transgénicos que comúnmente se utilizan en el laboratorio. Este ratón presenta aproximadamente 144 repeticiones del trinucleótido de CAG que se expresan en todas las células del ratón y en el 75% del gen silvestre (Mangiarini et al., 1996). Notablemente, el largo número de repeticiones presentes en el ratón R6/2 corresponde a los síntomas del Huntington juvenil, presentando este modelo un fenotipo conductual agresivo. Algunos ratones R6/2 incluso muestran síntomas tempranos a partir de las 4 semanas, aunque la edad promedio de aparición de los síntomas es entre 9 y 11 semanas. Por su parte, la edad promedio de muerte es de 10 a 13 semanas y raramente logran pasar las 14 semanas. En estos ratones se ha observado una notable reducción del peso y el volumen cerebral dependiente del tiempo, comenzando aproximadamente a los 30 y 60 días postnatal, respectivamente (Stack et al., 2005). La atrofia y la pérdida neuronal estriatal ocurre a los 90 días de edad. Los cambios patológicos observados son asociados a los cambios en el peso corporal, fuerza de agarre, conducta en rotarod (evaluación del aprendizaje motor) y distonia. Adicionalmente,

los ratones desarrollan inclusiones positivas a la htt mutante en el estriado alrededor de las 8 semanas de edad. El mecanismo exacto de muerte celular de los R6/2 es desconocido, pero en un estudio se reportó la presencia de neuronas “oscuras” semejantes a las encontradas en los cerebros de humanos con la EH (Turmaine et al., 2000). Este tipo de muerte parece no corresponder a apoptosis ni a necrosis, y se ha caracterizado en el estriado, corteza y cerebelo. El número de repeticiones del trinucleótido asemeja los casos de la EH juvenil, mientras que los cambios estructurales mimetizan el inicio de la enfermedad adulta. El RNAm para encefalina se presenta significativamente reducido en el estriado comparado con el RNAm para sustancia P. Adicionalmente, las proyecciones de encefalina al globo pálido exhiben degeneración, mientras que las proyecciones de sustancia P a la sustancia nigra y globo pálido permanecen relativamente preservadas. Antes del inicio de los síntomas, hay pérdida de diferentes receptores a neurotransmisores que resulta parecida a la observada en la EH adulta; por ejemplo, se pierden el receptor metabotrópico a glutamato tipo 1, receptores dopaminérgicos D1 y D2, y receptores colinérgicos muscarínicos (Cha et al., 1998). Estos ratones también muestran déficit en la función motora y cognitiva. Los síntomas motores incluyen temblor en reposo, movimientos tipo coreiforme y distonia de las extremidades cuando el animal es suspendido de la cola (clamping behavior) (Mangarini et al., 1996; Snack et al., 2005). Adicionalmente, muestran un decline en la prueba de rotarod (evaluación del aprendizaje motor), empezando a los 40 días de edad y hasta las 12 semanas son incapaces de mantener su equilibrio por cortos períodos (10 segundos) (Luesse et al., 2001). En la prueba de campo abierto, la locomoción y la conducta exploratoria, los R6/2 muestran un incremento en estos criterios a los 20 días de edad en comparación con los ratones silvestres. Esta hiperactividad disminuye progresivamente, y alrededor de los 60 días de edad los animales tienden a la hipoactividad. También presentan convulsiones tipo epiléptico y movimientos espontáneos de sacudida.

El método de creación de los R6/1 es similar al de los ratones R6/2, excepto por el hecho de que los primeros contienen solo 116 repeticiones, haciendo su fenotipo conductual relativamente más moderado (Mangiarini et al., 1996). Los R6/1 muestran una disminución en los niveles de dopamina y de la adenosina monofosfato cíclico (cAMP) regulada por fosfoproteínas, empezando a los 5 meses de edad (van Dellen et al., 2000) indicando así la disfunción celular. Estos animales muestran déficits tales como anomalías en el andar, disminución de la ansiedad y conducta de agarre de las extremidades superiores.

Algunos grupos creen que los ratones transgénicos, al contener múltiples copias del gen para htt (dos copias normales del ratón y una copia mutada correspondiente a la humana), no los hace representativos genéticamente de la enfermedad, dado que en los humanos sólo se presenta una copia normal del gen de la htt y una copia mutada. De igual manera, la inserción aleatoria del gen de la htt humana en el genoma del ratón puede interferir con la función normal de otros genes que no están relacionados con la EH. Además, la expresión de la htt es llevada a cabo por un promotor artificial, cuyo control espacial y temporal de la expresión es diferente del promotor endógeno de la htt del ratón. Por estas razones, modelos de ratones knock-in han tomado relevancia recientemente.

2.1.2 Ratones knock-in

Los modelos en ratones knock-in son considerados los más ajustados a la EH desde el punto de vista genético. La creación de estos ratones involucra el remplazo de la porción del gen de la htt del ratón con la copia mutante humana que contiene la región de expansión de CAG. Entre éstos, el CAG140, el cual expresa 140 repeticiones de CAG, muestra a los doce meses disfunción motora aparente, mientras que a los 9 meses muestra déficit en el rotarod, y se observan agregados tanto en el núcleo como en el neuropilo. Sin embargo, el ratón más empleado de los knock-in hasta ahora es el CAG150 (Lin et al., 2001), este ratón muestra déficit progresivo en el rotarod, hipoactividad y disturbios en la postura desde los 4 meses. A los 14 meses hay un incremento significativo en la gliosis estriatal (Yu et al., 2003) y el estriado muestra un aumento en agregados nucleares. La microscopia electrónica revela “cuerpos oscuros” alrededor de vacuolas citoplasmáticas, la cual es evidencia de disfunción celular; también se observan axones degenerando.

2.2 Modelos fenotípicos

Los modelos animales para EH también se catalogan en dos grandes categorías: los genéticos y los fenotípicos. Históricamente, los modelos fenotípicos han dominado el campo de la investigación en la EH. Aunque George Huntington fue el primero en describir la EH en 1972, los investigadores no habían podido identificar la mutación genética actual responsable de la enfermedad y no fue sino hasta 1993 cuando ésta fue formalmente identificada; por esto se dió el retraso en el desarrollo de modelos genéticos apropiados hasta la década pasada. Los modelos fenotípicos inducen también muerte celular pero por mecanismos excitotóxicos (QUIN) o por afectación de la maquinaria mitocondrial (3-NP) (Tabla 3).

Modelo animal	Especie	Modo de administración	Células afectadas	Mecanismo de muerte celular	Síntomas motores	Síntomas cognitivos
Acido Quinolinico (QUIN)	Rata (Sprague-Dawley y Fisher) (Bordelon et al., 1997; Ribeiro et al., 2006), ratón (McLin et al., 2006), y primates no humanos (Emerich et al., 2006; Kendall et al., 2000)	Inyecciones intraestriatales (Foster et al., 1984)	Encefalina, Sustancia P, calbindina, Parvalbumina, sobrerregulación de interneuronas (Beal et al., 1986; 1991; Albin et al., 1990).	Excitotoxicidad (Beal et al., 1991; Ferrante et al., 1993; Roberts et al., 1993).	Hipercinesia, Discinesia y distonia inducida por apomorfina (Vazey et al., 2006), Discinesia espontánea a altas dosis (Borlongan et al., 1995).	Déficit visuoespacial, déficit en la memoria procedimental, pobre memoria de recuerdo (Furtado & Mazurek, 1996; Shear et al., 2002).
Acido 3-Nitropropionico (3-NP)	Ratas (Todas excepto Fischer) (Ouay et al., 2000), ratón (Yang et al., 2005), primates no humanos (Palfi et al., 2000; Ludolph et al., 1991; Bead et al., 1993).	Inyecciones sistémicas e intraestriatales.	Neuronas espinosas medianas (Beal et al., 1993), interneuronas espinosas (Blum et al., 2001).	Disfunción mitocondrial (Alston et al., 1977; Coles et al., 1979).	Hipercinesia (a bajas dosis) (Borlongan et al., 1997; Palfi et al., 1996); hipocinesia (a altas dosis), discinesia y distonia inducida por apomorfina, discinesia espontánea con la administración a largo tiempo (Brouillet et al., 1995).	Déficit en la habituación en la prueba de campo abierto, déficit en el trabajo de memoria y memoria de retención en el laberinto radial.

Tabla 3. Características de los modelos experimentales de la EH.

2.2.1 Modelos excitotóxicos

Regularmente, la excitotoxicidad neuronal involucra una elevación fisiológica de las concentraciones de calcio intracelular en respuesta a una sobre-exposición a aminoácidos excitadores tales como el glutamato y el aspartato. Después de su liberación de las terminales sinápticas, el glutamato activa tres subtipos de receptores diferentes en las neuronas postsinápticas: receptores para N-metil-D-aspartato (NMDA), receptores no-NMDA (sensibles al ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole propiónico (AMPA) y al ácido kaínico) y receptores metabotrópicos. La activación de los receptores no-NMDA induce el influjo de iones sodio y la subsecuente despolarización de la membrana plasmática, removiendo al ión magnesio que normalmente bloquea el canal asociado al receptor para NMDA. Los receptores metabotrópicos son acoplados a proteínas G e inducen la activación de sistemas de segundos mensajeros tales como el inositol-3-fosfato (IP-3), el cual lleva a la liberación de calcio del retículo endoplásmico.

Por su parte, el receptor para NMDA, cuyo canal es permeable a calcio, juega un papel relevante en la neurotoxicidad inducida por los aminoácidos excitadores. Un disturbio en el influjo de calcio puede potenciar vías bioquímicas letales que involucran enzimas degradativas (proteasas y endonucleasas) y/o incrementar la formación de radicales libres (Rami et al., 1997); además, la entrada de calcio en las

terminales podría aumentar la liberación de aminoácidos excitadores endógenos y propagar así el daño celular por una retroalimentación positiva, llevando a la célula a una muerte apoptótica o necrótica. Estos mecanismos están implicados tanto en desórdenes neurodegenerativos agudos (trauma) como crónicos (Alzheimer y Huntington) (Siesjo, 1981; Choi, 1988; Saito et al., 1993).

Diversas toxinas han sido empleadas para producir un modelo excitotóxico de la EH, entre las cuales se encuentran el N-metil-D-aspartato (NMDA), el ácido kaínico, el ácido iboténico, y el ácido quinolínico. Estas toxinas inducen muerte celular por unión a su receptor, ya sea en receptores no-NMDA o NMDA. En un estudio comparativo se inyectaron intraestriatalmente las toxinas antes mencionadas en una concentración conocida para la producción de daño neuronal y al evaluar las alteraciones morfológicas y perfiles bioquímicos sobre el cuerpo estriado este grupo encontró que todas estas toxinas disminuían la inmunoreactividad a la sustancia P, a la Ach y al GABA, tal como ocurre en la EH. Sin embargo el QUIN fue la única toxina que no modificó los niveles de somatostatina y neuropéptido Y, estableciéndose así una selectividad fundamental con respecto a los otros agentes excitotóxicos que si los afectan de manera contraria a la EH (Beal et al., 1986).

2.2.1.1 Acido quinolínico

El ácido 2,3-piridín-dicarboxílico (QUIN) (Fig. 3), es un metabolito endógeno del L-triptófano que se forma en la vía de la kinurenina (Vender, 1975), además de ser un conocido agonista de los receptores NMDA.

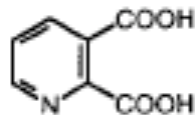


Figura 3. Estructura del QUIN

El QUIN es uno de los metabolitos formados en la vía de la kinurenina y se determina en la orina de ratas que reciben una dieta rica en triptofano (Singal et al., 1946; Henderson & Hirsch, 1949).

2.2.1.1.1 Vía de la kinurenina

Esta vía de la kinurenina es la mayor ruta de catabolismo del L-triptófano en mamíferos y fue reconocida como tal en 1947. La mayor función de esta vía es la biosíntesis de la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) (Fig. 4), y se ha reportado tanto en hígado como en cerebro de primates no-humanos, roedores y otros mamíferos (Vender et al., 1975; Moroni et al., 1984; Wolfensberger et al., 1983). Se sabe que la vía de la kinurenina juega un papel importante en funciones fisiológicas tales como la conducta, la termorregulación y el embarazo (Stone, 1993; Curzon, 1996; Munn et al., 1998; Guillemin et al., 2001).

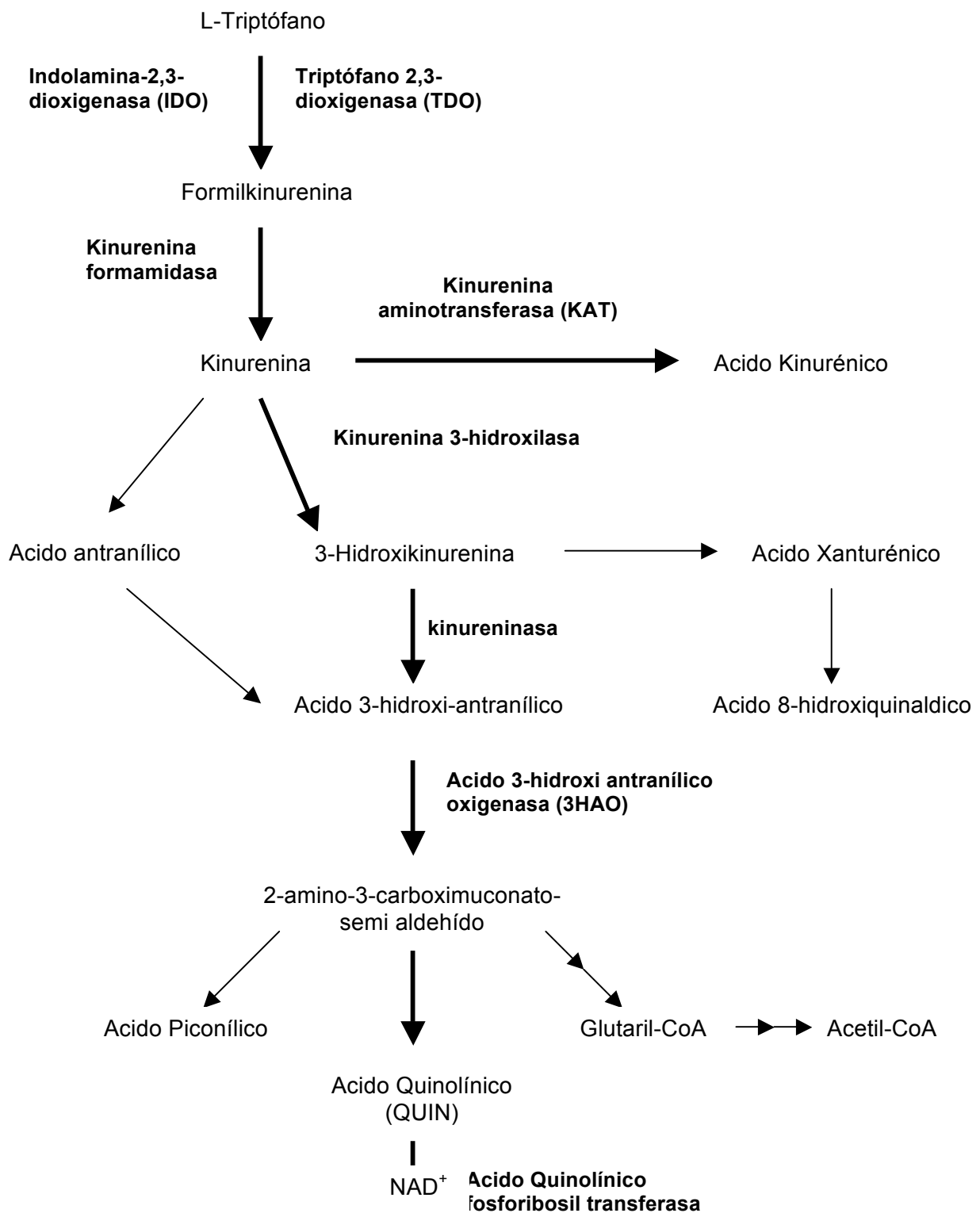


Figura 4. Vía de la kinurenina.
 la Cruz et al., 2008).

(Tomada de Pérez-De

2.2.1.1.1.1 Metabolismo en la vía de la kinurenina

En el hígado, el anillo indólico del L-triptofano es cortado oxidativamente por la enzima triptofano dioxigenasa (TDO), produciendo N-formil kinurenina. En el cerebro y otros tejidos periféricos, la enzima responsable de esta reacción es la indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO). Esta enzima es dependiente de superóxido, por lo cual requiere de la presencia de sistemas generadores de este radical tales como el ascorbato y la xantina-xantina oxidasa. Esta misma enzima es inhibida por la superóxido dismutasa (Hirata & Hayaishi, 1971) y por el óxido nítrico (ON) (Thomas et al., 1994). El siguiente paso en la vía es la degradación de N-formil kinurenina a L-kinurenina (L-KYN) por la formamidasa. La L-KYN sirve como sustrato para distintas enzimas: la kinureninasa (generando ácido antranílico), la kinurenina 3-hidroxilasa (generando 3-hidroxicinurenina (3-HK)), y las kinureninas aminotransferasas (KAT's), las cuales catalizan la transaminación irreversible de L-KYN a ácido kinurénico (KYNA). Es importante mencionar que la formación de KYNA en humanos es muy compleja e involucra dos isoformas de KAT (KAT I y KAT II). Estas enzimas difieren en su pH óptimo y se ha sugerido que la KAT II, la cual tiene un pH óptimo en el rango fisiológico puede ser la responsable de la mayor síntesis de KYNA en el cerebro humano (Gramsbergen et al., 1997).

Posteriormente la vía nos lleva a la formación de QUIN a través de la hidroxilación de la L-KYN a 3-HK. Esta reacción es llevada a cabo por la kinurenina hidroxilasa, una enzima localizada en la membrana externa mitocondrial (Okamoto et al., 1967) y la cual requiere de la presencia de NADPH como donador de un electrón. La kinureninasa, una enzima pirridoxal dependiente de fosfato y que se encuentra en el citosol, convierte la 3-HK en ácido 3-hidroxi-antranílico (3-HA). Tanto la kinureninasa como la kinurenina hidroxilasa están presentes en el Sistema Nervioso Central (SNC) pero tienen muy baja actividad. Existe otra alternativa en la vía de la kinurenina para la formación del 3-HA, y es a través del ácido antranílico, el cual puede ser hidroxilado por enzimas de hidroxilación microsomal no específicas y producir de esta manera el 3-HA.

La ácido 3-hidroxi-antranílico dioxigenasa (3-HAO) inicia abriendo el anillo de 3-HA para convertirlo en 2-amino-3-carboximuconato semialdehído, un intermediario inestable, el cual es instantáneamente ciclizado a ácido quinolínico (QUIN). En el cerebro, la 3-HAO tiene una actividad mayor que otras enzimas de la vía de la kinurenina (Okuno et al., 1987; Okuno & Kido, 1991; Saito et al., 1991b). Inmunohistoquímicamente se ha demostrado que la 3-HAO y la KAT están localizadas en astrocitos que están alrededor de sinapsis glutamatergicas en el SNC (Roberts et al., 1992; 1995). Posteriormente, el QUIN es metabolizado a ácido nicotínico mononucleótido (NAD) por la enzima ácido quinolínico fosforibosil transferasa, la cual está localizada en astrocitos (Stone, 1993). Interesantemente, la ácido quinolínico fosforibosil transferasa no se encuentra en astrocitos que rodean sinapsis glutamatergicas, y estudios inmunohistoquímicos revelan que la relación de 3-HAO y ácido quinolínico fosforibosil transferasa difiere a lo largo de todo el cerebro y presenta mayor distribución en la neocorteza frontal, el estriado y el hipocampo (Kohler et al., 1987; Kohler 1988).

La vía de la kinurenina ha sido implicada en diversos desórdenes del SNC, tales como las enfermedades de Huntington, Alzheimer y Parkinson, así como el complejo demencial del síndrome de inmunodeficiencia adquirida, entre otros (Stone, 2001; Stone & Darlington, 2002).

2.2.1.1.1.2 Metabolitos neuroactivos de la vía de la kinurenina

En los últimos años, a algunos de los metabolitos de la vía de la kinurenina se les ha encontrado propiedades neuroactivas (Stone, 1993). Esto es de particular interés ya que el 95% del triptofano de la dieta es metabolizado a través de esta vía y muy poco de éste es convertido a serotonina (Wolf, 1974). El triptofano cruza la barrera hematoencefalica a través de transportadores compartidos por los aminoácidos neutros (Hargreaves & Pardridge, 1988). En el cerebro, el triptofano es captado por los astrocitos, macrófagos, microglia y células dendríticas, y es convertido a L-KYN (Ruddick et al., 2006). La primera indicación de que las kinureninas podrían jugar un papel relevante en el Sistema Nervioso Central fue provista por Lapin (1978), quien describió convulsiones después de una inyección intracerebroventricular de QUIN en ratones, posteriormente se mostró que estas inyecciones de QUIN causaban lesiones excitotóxicas en el cerebro (Schwarcz et al., 1983). Tanto la excitación como la neurotoxicidad inducidas por el QUIN son mediadas por los receptores para NMDA, lo cual sugiere que el QUIN endógeno puede participar en procesos fisiológicos y patológicos asociados con la activación de dichos receptores. Otro de los metabolitos neuroactivos de la vía de la kinurenina es la 3-HK, precursora del QUIN, y que está presente en el cerebro en concentraciones nanomolares. A este metabolito se le han atribuido propiedades neurodegenerativas a través de la generación directa de radicales libres (Eastman & Guilarte, 1989), iniciando con esto una cascada de eventos intracelulares que resultan en la desintegración celular (Okuda et al., 1998). Estos eventos, en turno, son responsables de la potenciación sustancial de episodios de excitotoxicidad que se observan en neuronas expuestas tanto a la 3-HK como al QUIN (Guidetti & Schwarcz, 1999). Adicionalmente, la 3-HK y su producto de degradación, el 3-HA (inmediato bioprecursor del QUIN), generan superóxido y peróxido de hidrógeno de manera cobre-dependiente, lo cual promueve el daño oxidativo a proteínas (Goldstein et al., 2000). Otro de los metabolitos neuroactivos de la vía de kinurenina es el KYNA, el cual primero fue descrito como un compuesto inhibitorio, ya que en concentraciones altas (no fisiológicas) es un antagonista de amplio espectro de los receptores para aminoácidos excitadores (Perkins & Stone, 1982). En concordancia con esto, se sabe que el KYNA ejerce acciones anticonvulsivas y antiexcitotóxicas (Foster et al., 1984). Sin embargo, a bajas concentraciones, el KYNA actúa como un bloqueador competitivo del sitio co-agonista para glicina del receptor para NMDA (Kessler et al., 1989) y como un inhibidor no competitivo del receptor $\alpha 7$ nicotínico de acetilcolina (Hilmas et al., 2001). El hecho de que el KYNA tenga afinidad por estos dos receptores permeables a calcio en el rango en el que se encuentra en los cerebros humanos y en los cerebros de roedores, sugiere una función fisiológica real en la neurotransmisión glutamatérgica y colinérgica. Esto ha sido apoyado por estudios en los que se ha observado que la reducción en los niveles de KYNA en el estriado aumenta la vulnerabilidad al insulto excitotóxico (Poeggeler et al., 1998), mientras que al elevar las concentraciones de KYNA se inhibe la liberación de glutamato (Carpenedo et al., 2001).

2.2.1.1.2 QUIN y daño excitotóxico

Hasta 1981 se creía que el QUIN era un metabolito fisiológico inactivo del triptofano. Su potencial fisiológico y farmacológico fue reconocido con el descubrimiento de que el QUIN era capaz de activar selectivamente la subpoblación de receptores glutamatérgicos sensibles a NMDA (Stone & Perkins, 1981). El flujo masivo de glutamato ocurre en neuronas y glia seguido de hipoxia e isquemia, llegando a concentraciones neurotóxicas y reforzando la hipótesis de excitotoxicidad, en la cual la sobreestimulación de receptores glutamatérgicos contribuye al daño neuronal (Olney, 1969). La población de receptores a NMDA atrajo su máxima atención cuando se descubrió que su activación estaba asociada con un incremento sustancial en el flujo de calcio en neuronas blanco. Este ión está íntimamente ligado a la excitotoxicidad dado que su entrada conduce a una serie de eventos de daño neuronal. Así, el QUIN, un compuesto endógeno capaz de activar selectivamente a los receptores para NMDA, es de gran interés debido a su posible involucramiento en diferentes estadios patológicos en el cerebro humano. Se sabe que este agente interactúa específicamente con los subtipos NR2A y NR2B de los receptores para NMDA (de Carvalho et al., 1996), los cuales se encuentran ampliamente distribuidos en hipocampo, estriado y la capa externa de la corteza cerebral (Nakanishi, 1992). Además, el QUIN está involucrado en diferentes procesos fisiológicos y patológicos durante el desarrollo cerebral (Hunt et al., 1990). Se sabe que a bajas concentraciones, el QUIN puede proteger a las neuronas contra la toxicidad del glutamato (Sei et al., 1998); sin embargo, exposiciones prolongadas de estructuras corticoestriatales a concentraciones submicromolares de QUIN conducen invariablemente a la muerte neuronal (Whetsell & Schwarcz., 1989).

El QUIN es capaz de causar muerte neuronal después de su administración intracerebral directa (Schwarcz et al., 1983; Stone et al., 1987) o cuando es aplicado en cultivos neuronales (Kim & Choi, 1987). Las implicaciones de la secreción de QUIN por la activación de células del sistema inmune son considerables dado que hay evidencia de la potenciación entre citocinas y la activación de receptores para glutamato por dicho agente. Dicha potenciación puede ser mediada por el óxido nítrico. La interleucina 1 es conocida como una de las inductoras de los efectos excitatorios sobre los receptores para NMDA y del efecto neurotóxico correspondiente al activar dichos receptores (Stone, 2001). Adicionalmente, los efectos neurotóxicos de la activación de macrófagos son reducidos por antagonistas de receptores para NMDA (Ma et al, 1997).

2.2.1.1.3 QUIN y daño oxidativo

La neurotoxicidad producida por el QUIN puede depender parcialmente de la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO). Esta idea se generó desde que se observó que su actividad neurotóxica puede ser prevenida por agentes como la α -fenil-t-butilnitrona (Nakao & Brundin, 1997) y atrapadores de radicales libres (Nakai et al., 1999). Recientemente, se ha reportado evidencia que involucra al estrés oxidativo como una parte integral del modelo de toxicidad inducido por QUIN (Rodríguez-Martínez et al., 2000; Behan et al., 1999; ya que se ha demostrado la capacidad del QUIN de modificar los perfiles de algunos antioxidantes endógenos en el cerebro de ratas - tales como el contenido de glutatión reducido, el glutatión oxidado y la actividad de la superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc (Cu,Zn-SOD) - (Rodríguez-Martínez et al., 2000), así como su habilidad para generar radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) durante estadios tempranos de toxicidad (Santamaría et al., 2001). En este punto, es importante mencionar que una pequeña fracción de este daño corresponde a componentes independientes de la activación de receptores para NMDA (Santamaría et al., 2001; Behan et al., 1999; Stone et al., 2000). En apoyo directo a esta hipótesis, la formación de $\cdot\text{OH}$ inducida por QUIN resulta mayoritariamente, pero no completamente, sensible al MK-801, un potente antagonista de receptores para NMDA, sugiriendo de esta manera que una pequeña fracción del daño oxidativo evocado por el QUIN es independiente de la activación de dichos receptores. La evidencia de un papel activo del estrés oxidativo y nitrosativo en el modelo de toxicidad inducido por el QUIN está basada en la habilidad de la toxina de formar complejos QUIN-Fe(II), los cuales regulan la formación de $\cdot\text{OH}$, mismo que es responsable del daño a DNA *in vitro* y la peroxidación de lípidos (Goda et al., 1996). Adicionalmente, el QUIN y otros compuestos relacionados, han mostrado su capacidad de aumentar la reacción de Fenton en soluciones amortiguadoras de fosfatos, lo cual ha conducido a la subsecuente formación de $\cdot\text{OH}$ (Iwahashi et al., 1999). En apoyo adicional a estos datos, se ha reportado que el QUIN y otros compuestos con anillo piridínico son capaces de inhibir la auto-oxidación de iones hierro (Murakami et al., 1998). Además, otros dos hallazgos refuerzan estas consideraciones: 1) se sabe que la peroxidación de lípidos inducida por el QUIN *in vitro* en tejido nervioso es dependiente de la formación de los complejos QUIN-Fe(II) (Stipek et al., 1997), y 2) parece ser que el hierro ferroso puede estar modulando negativamente la potenciación de la unión del [^3H]MK-801 al receptor para NMDA en presencia de QUIN en membranas sinápticas de cerebro de rata (Stastny et al., 1999). Estas evidencias sugieren una capacidad intrínseca del QUIN de actuar como un quelante de metales, soportando de esta manera su naturaleza pro-oxidante.

Otros estudios han descrito la potencia oxidativa del QUIN por el incremento en la peroxidación lipídica y el daño oxidativo en diferentes preparaciones de tejido nervioso tanto *in vivo* como *in vitro* (Santamaría & Ríos, 1993; Stastny et al., 1991; Santamaría et al., 2001), enfatizando así la relevancia de las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (ERO/ERN) durante la generación de episodios excitotóxicos. Sobre este punto, otros hallazgos importantes son los reportados por Schwartz y colaboradores (1998), quienes evaluaron los efectos de la expresión diferencial de la Cu,Zn-SOD en la toxicidad inducida por QUIN en ratones transgénicos con sobre- y baja-regulación de la enzima. En dicho estudio se observó que la primera condición resultó en neuroprotección del estriado, mientras que la segunda produjo un intenso daño estriatal. A su vez, estos hallazgos han sido reforzados por una correlación entre los eventos excitotóxicos y los procesos oxidativos. En particular, las ERN, tales

como el ON y el peroxinitrito (ONOO^-), han sido involucradas en la neurotoxicidad y el daño oxidativo inducidos por el QUIN (Nakamura et al., 1995; Santamaría et al., 1997; Noak et al., 1998; Ryu et al., 2004; Santiago-López et al., 2004, Pérez-de la Cruz et al., 2005).

Diferentes atrapadores de ERO e inductores de la actividad de enzimas antioxidantes, tales como la melatonina (Lapin et al., 1998; Southgate et al., 1998) y el deprenil (Behan et al., 1999), protegen al tejido nervioso del daño oxidativo y de la neurotoxicidad inducidos por el QUIN tanto en condiciones *in vivo* como *in vitro*. Otros importantes agentes antioxidantes han sido probados con éxito contra la toxicidad del QUIN, incluyendo la alfa-fenil-t-butil nitrona (Nakao et al., 1996), poliaminas como la espermina y la espermidina (Belle et al., 2004), el quelante de hierro desferoxamina (Stipek et al., 1997), el glutatión reducido (Santamaría et al., 2001), y algunos seleno-compuestos que mimetizan la actividad de la GPx, tales como el ebselen (Rossato et al., 2002; Rossato et al., 2002b). Notablemente, el atrapador sintético de radicales libres, el OPC-14117, ha mostrado reducir la activación del factor nuclear kappa B ($\text{NF}\kappa\text{B}$) – un factor de transcripción comunmente relacionado con cascadas de muerte celular apoptótica - en el estriado de la rata (Nakai et al., 1999). Estos hallazgos son particularmente relevantes dado que algunos de estos compuestos son agentes antioxidantes bien descritos en la literatura (tales como el selenio), los cuales pueden inhibir vías de transcripción pro-apoptóticas, incluyendo al factor nuclear de translocación del $\text{NF}\kappa\text{B}$ y su consecuente activación (Makropoulos et al., 1996) al controlar la vida media de su proteína de unión citoplasmática, la I-kappa-B-alpha ($\text{I}\kappa\text{B}-\alpha$) (Kretz-Remy & Arrigo, 2001). A este respecto, Santamaría y colaboradores (2005) recientemente demostraron que el selenio tiene acciones protectoras sobre la neurotoxicidad inducida por QUIN, y esta protección está relacionada con la estimulación estriatal de la actividad de la GPx, la preservación de $\text{I}\kappa\text{B}-\alpha$, la reducción en la expresión de $\text{NF}\kappa\text{B}$ y la inhibición de la actividad de la caspasa-3, resultando en una preservación de DNA internucleosomal. Todas estas evidencias sugieren que el selenio, al estar estimulando la actividad de la GPx, puede ser responsable de la remoción de ERO, y de esta manera prevenir las señales apoptogénicas.

Por otra parte, en preparaciones de cerebro de rata, se ha visto que el QUIN (100 μM) puede aumentar la peroxidación de lípidos hasta en un 256% (Rios & Santamaría, 1991). Estos resultados fueron reproducidos por otros grupos, con la demostración adicional de que el daño inducido por QUIN puede ser prevenido por antioxidantes como la melatonina y el deprenil (Southgate et al., 1998; Behan et al., 1999). La peroxidación de lípidos inducida por QUIN también puede ser prevenida por nitro-arginina y potenciada por L-arginina, sugiriendo que el ON – un radical y precursor de potentes especies reactivas como el ONOO^- - puede contribuir al daño evocado por QUIN (Santamaría et al., 1997). Ahora se sabe que la inhibición de la sintasa del óxido nítrico (SON) es un evento que puede prevenir la neurotoxicidad evocada por el QUIN (Pérez-Severiano et al., 1998; Kalosch et al., 1999). Teniendo evidencias de la activa participación del ON, y sabiendo que existen las condiciones necesarias para la formación de ONOO^- en el modelo de toxicidad evocado por el QUIN, recientemente se exploraron estrategias experimentales que consisten en probar los efectos de agentes capaces de catalizar la descomposición de ONOO^- . Algunos de estos agentes son las porfirinas de hierro, tales como el tetrakis(pentafluorofenil porfirinato de hierro), el cual mostró la reducción de 3-nitrotirosina

(biomarcador de la presencia de ONOO^-), así como una disminución en la neurotoxicidad y el daño oxidativo asociados con la toxicidad inducida por el QUIN (Pérez-De La Cruz et al., 2005).

2.2.1.1.4 QUIN y alteraciones energéticas

Desde los 80's ya se sabía que la inyección de QUIN en el hipocampo de las ratas causaba disminución en los niveles de ATP (Vezzani et al., 1987), pero fue hasta los 90's que Bordelon y colaboradores (1997) evaluaron las alteraciones energéticas como parte de la cascada de daño excitotóxico evocado por el QUIN, a través de la actividad de la cadena respiratoria como la vía responsable de la disminución de ATP. Sus resultados mostraron una reducción en el consumo de oxígeno desde las 6 h después de la inyección de QUIN. Por ello, tanto la alteración en la función mitocondrial observada después de la administración de dicha toxina, como la disminución en los niveles de ATP y NAD, se sugirieron como eventos secundarios a la carga excesiva de calcio en organelos celulares, apoyando así la hipótesis de que la disfunción mitocondrial puede ser un evento crítico en la cascada de muerte celular en los modelos excitotóxicos de enfermedades neurodegenerativas. Estas evidencias se sugieren que los efectos tempranos del QUIN en la actividad estriatal y en el flujo de iones pueden contribuir a las subsecuentes anomalías en el metabolismo energético, las cuales a su vez constituyen un factor para la neurodegeneración y la eventual muerte celular excitotóxica.

Recientemente se ha reportado que un aumento en el metabolismo celular podría constituirse como un factor neuroprotector (Maus et al., 1999; Sheline et al., 2000). En el caso particular del piruvato, el cual puede ser utilizado por las células como un sustrato energético, éste precursor metabólico produce efectos protectores contra el daño tóxico evocado por el QUIN, sugiriendo que el piruvato puede ser efectivo reduciendo el daño neuronal en la enfermedad de Huntington (Ryu et al., 2003). Adicionalmente, hay evidencia de que las lesiones producidas por el QUIN pueden ser consecuencia del daño oxidativo, y que el piruvato, pero no el lactato, exhibe un espectro de actividad que bloquea este daño. Estos resultados son acompañados por evidencia que sugiere que la microglia y los astrocitos contribuyen activamente a la neurodegeneración, aumentando la producción de ERO en respuesta al QUIN. Por otra parte, Maksimovic y colaboradores (2001) determinaron que la actividad de la citocromo C oxidasa, un componente de la cadena respiratoria, esta incrementada en el estriado y el hipocampo de animales tratados con QUIN (150 nM), reforzando así la idea de que el QUIN produce disfunción en el metabolismo energético.

Un estudio reciente *in vitro* muestra el efecto del QUIN sobre el metabolismo energético en cerebro de ratas jóvenes, encontrándose que la toxina aumenta la recaptura de glucosa en un 55%, mientras que la actividad del complejo II de la cadena de transporte mitocondrial es inhibida en un 35% (Schuck et al, 2007). La inhibición del complejo II fue prevenida por la pre-incubación de los homogenados corticales con superóxido dismutasa más catalasa, indicando que este efecto es mediado por ERO. Estos datos proveen evidencia de que el QUIN provoca una alteración en el metabolismo energético cerebral *in vitro*.

2.2.1.1.5 QUIN y alteraciones conductuales

El QUIN no es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica con facilidad, por lo que debe ser administrado directamente en el estriado para causar degeneración en ratas, ratones y primates no humanos (Bordelon et al., 1997; McLin et al., 2006; Emerich et al., 2006; Kendall et al., 2000) en un patrón similar al observado en humanos con la EH. Las lesiones con QUIN causan síntomas que mimetizan las alteraciones en estadios tempranos de la enfermedad. Por ejemplo, las lesiones a nivel experimental producen hiperactividad en modelos animales, pero la hipoactividad que es presentada en estadios tardíos de la EH no es modelada por ninguna dosis empleada de esta toxina. En roedores, la lesión unilateral con QUIN produce conducta de rotación asimétrica estimulada por apomorfina, un agonista dopaminérgico ampliamente conocido (Vazey et al., 2006). La conducta de rotación resulta de un desbalance de la señalización dopaminérgica entre el hemisferio lesionado y el intacto. Las lesiones con QUIN en roedores también producen déficits en las pruebas cognitivas, tales como el laberinto acuático de Morris, el laberinto radial y el laberinto en T (Furtado & Mazurel, 1996; Isacson et al., 1984; Shear et al., 1998).

En cuanto al aspecto conductual, Sanberg y colaboradores (1989) estudiaron las anomalías locomotoras en animales administrados con diferentes dosis de QUIN y observaron que la inyección bilateral de la toxina (75 nmoles) no tenía efectos significativos en la locomoción. En contraste, 150 y 225 nmoles de la toxina indujeron hiperactividad y pérdida de peso, mientras que 300 nmoles son letales para el animal. Schwarcz y colaboradores (1983) demostraron que después de la lesión estriatal con QUIN (150 nmol) hay una marcada disminución en la actividad de la colina acetiltransferasa y en la glutamato descarboxilasa, y que la inmunoreactividad a GABA sólo es disminuida después de la dosis de 75 nmoles de QUIN (Beal et al., 1986), estableciendo así la compleja relación entre la dosis de la toxina, el tiempo post-lesión y la respuesta conductual.

Scattoni y colaboradores (2004) evaluaron las alteraciones conductuales en el tiempo después de la administración con QUIN. La toxina fue administrada intraestriatalmente y de manera bilateral (300 nmoles/ μ L) y posteriormente se realizaron pruebas espaciales de campo abierto y se determinó la actividad exploratoria. Los parámetros fueron determinados 2 semanas, 2 y 6 meses después de la lesión, y se encontró que las ratas lesionadas presentaban alteraciones progresivas en la ejecución de tareas, además mostraban ser más activas que los controles a los 2 y 6 meses post-lesión.

Recientemente Shear y colaboradores (1998) compararon los efectos de las inyecciones intraestriatales de QUIN y del ácido 3-nitropropiónico (3-NP) en ratas. Los resultados mostraron que ambas toxinas causan un incremento en los niveles de la actividad a las 2 semanas post-lesión, pero sólo el QUIN es capaz de mostrar hiperactividad a las 4 semanas post-lesión. Las ratas tratadas con 3-NP, pero no con QUIN, mostraron rigidez progresiva, aunque ambas toxinas son capaces de afectar el aprendizaje. Por otra parte, un estudio en primates no humanos reveló que los animales tratados con QUIN muestran hiperactividad nocturna, así como una postura anormal, además de que en la prueba de recuperación de objetos éstos animales mostraron deterioro en las respuestas de éxito (Roitberg et al., 2002). Adicionalmente, la infusión crónica de QUIN en el estriado de rata induce déficit de

aprendizaje espacial en el laberinto acuático radial, llevando a los autores a proponer que el aumento crónico de QUIN puede inducir déficit conductual y motor similar al observado en la EH (Susel et al., 1991; Shear et al., 1998). Todos estos datos sugieren que el QUIN mimetiza los estadios tempranos de alteraciones motoras de la EH, mientras que la inyección intraestriatal de 3-NP mimetiza los estadios tempranos y tardíos de dicha enfermedad.

2.2.1.1.6 QUIN y alteraciones morfológicas

La infusión de QUIN en el estriado de las ratas resulta en lesiones de “axón preservado”, con un marcado hinchamiento de dendritas, vacuolización y pérdida de la estructura celular en sitios post-sinápticos, pero con preservación de axones y terminales pre-sinápticas (Schwarcz et al., 1983; McGreer & Singh, 1984). Adicionalmente, Portera-Cailliau y colaboradores (1997) estudiaron la morfología ultraestructural que conlleva a la activación de los receptores para NMDA y receptores no-NMDA, a través de las inyecciones intraestriatales de QUIN y ácido kaínico (AK), respectivamente. Estos autores encontraron que la neurotoxicidad aguda del QUIN es bloqueada por el pretratamiento con MK-801 (potente antagonista selectivo de los receptores para NMDA), mientras que la neurotoxicidad del AK no es alterada por este pretratamiento. También encontraron que las neuronas dañadas con el AK tienden a encogerse y a formar círculos de cromatina que son característicos de la morfología apoptótica; en contraste, las neuronas dañadas con QUIN se hinchan y se lisan, lo cual es característico de los procesos necróticos. Más aún, el QUIN inyectado a una dosis de 60 nmoles, mostró dos tipos distintos de morfologías neuronales 6 h posteriores a la lesión: algunas neuronas tienen cuerpos celulares oscuros y de forma delgada con numerosas vacualizaciones citoplasmáticas, mientras que otras se ven hinchadas, con pocas pero largas vacuolas citoplasmáticas y un núcleo rodeado con grupos extensivos de cromatina. A las 12 h después de la inyección del QUIN, la lesión progresa a una fase de desintegración de la membrana y completa disolución de la matriz citoplasmática. Las neuronas medianas del estriado que son afectadas por el QUIN revelan la secuencia temporal de cambios citoplasmáticos, nucleares y neurofibrilares. En dicho estudio también se observó que el QUIN muestra acumulación de vacuolas desde los primeros 15 min post-inyección, y que estas llegan a la cumbre a las 6 h. En tiempos cortos, el retículo endoplásmico rugoso fue dispersado y la mitocondria mostró evidencia de hinchamiento, vacuolización y lisis. En las neuronas espinosas medianas la desintegración de las membranas plasmáticas y nucleares resultó en la dispersión de los contenidos neuronales. Las vacuolas largas de neuronas circundantes se manifestaron de 2 a 6 h post-lesión, así como también el correspondiente hinchamiento de astrocitos. Con la destrucción de las membranas plasmáticas neuronales y astrogliales, se fusionaron las vacuolas y formaron largos espacios alrededor de los remanentes nucleares, llevando a la conclusión de que el QUIN genera muerte de neuronas en un patrón no apoptótico de condensación de cromatina y destrucción temprana de organelos citoplasmáticos.

2.2.1.1.7 QUIN y muerte neuronal

La asociación entre las células cerebrales apoptóticas y el incremento de los niveles de QUIN han sido encontrados en diferentes desórdenes neurodegenerativos. Guillemín y colaboradores (2005) demostraron que el tratamiento con QUIN a concentraciones tóxicas, induce cambios morfológicos y bioquímicos propios de la apoptosis en un subgrupo de astrocitos humanos de manera dosis dependiente. En pacientes con el complejo SIDA-demencia, los altos niveles de QUIN son asociados con la alta relación de apoptosis de astrocitos adultos (Thompson et al., 2001). A pesar de esto, los receptores y las vías de señalización que inician la apoptosis astrogliar aún no han sido identificados. No obstante, dos grandes mecanismos pueden estar potencialmente involucrados: El primero es la activación de los receptores para NMDA por el QUIN, el cual se conoce ampliamente que puede mediar la apoptosis neuronal por la activación de caspasa-3 (Yu et al., 1999; Tenneneti & Lipton, 2000; Kerr et al., 1995; Stone, 2001); sin embargo, la presencia de los receptores para NMDA en astrocitos es aún controversial (Schipke et al., 2001; Conti et al., 1997), por lo cual la posibilidad de que una vía similar esté involucrada en neuronas y astrocitos es aún especulativa. La segunda posibilidad representa un importante aspecto de la toxicidad del QUIN, la peroxidación de lípidos (Ríos & Santamaría, 1991), ya que el QUIN a concentraciones bajas (120 nM) induce peroxidación y formación de radicales libres, llevando a la muerte neuronal (Behan et al., 1999). Este segundo mecanismo es el más fuertemente involucrado en la apoptosis de astrocitos inducida por QUIN. En apoyo a lo anterior, se sabe que después de la inyección de QUIN en el cerebro de rata hay una reducción en la densidad de la inmunoreactividad contra GFAP en astrocitos, esto ocurriendo tempranamente (6 h después de la lesión) y sugiriendo muerte astrocítica, la cual puede estar asociada con necrosis y apoptosis (Bjorklund et al., 1986; Dihne et al., 2001). Además, el QUIN incrementa la liberación neuronal de glutamato e inhibe su recaptura por astrocitos, llevando así a una excesiva concentración de glutamato en el micro-ambiente neuronal, y secundariamente a la neurotoxicidad (Tavares et al., 2002).

Por otra parte, se ha reportado que los agonistas para receptores glutamatérgicos activan al factor de transcripción NF- κ B vía la degradación de I κ B- α (Nakai et al., 1999; Qin et al., 1999). Diversos estudios han sugerido que el QUIN activa a la caspasa-3, lo cual lleva a la translocación nuclear del factor NF- κ B por la aceleración de la degradación de su proteína de unión citoplasmática, la I κ B- α (Qin et al., 1999). Nakai y colaboradores (2000) demostraron que la degradación de I κ B- α inducida por la estimulación de receptores para NMDA a través del QUIN es totalmente mediada por un mecanismo dependiente de caspasa-3 (Qin et al., 2000); además de que el empleo del OPC-14117, un atrapador sintético de radicales libres, atenúa este efecto de degradación inducido por la toxina, sugiriendo que el estrés oxidativo es el factor más importante para la degradación de I κ B- α . A este respecto, se ha demostrado que la activación de NF- κ B sobre-regula a p53, indicando que NF κ B contribuye a la apoptosis inducida por excitotoxinas vía la inducción de reguladores del ciclo celular (Qin et al., 1999; Aleyasin et al., 2004; Grilli et al., 1999). La proteína p53 juega un papel crítico en la muerte celular y la sobrevivencia, ya que recientes estudios muestran que los niveles de p53 pueden ser regulados por NF- κ B (Qin et al., 1999; Aleyasin et al., 2004; Wu et al., 1994). Cao y colaboradores (2005) mostraron que un inhibidor sintético de la caspasa-1 (Ac-YVAD-CHO), no tiene efecto en la degradación de I κ B- α ni la activación de NF- κ B inducida por QUIN; en contraste, este inhibidor atenúa el incremento en los niveles de la proteína p53 y de la fragmentación del ADN internucleosomal, sugiriendo así que la

caspasa-1 juega un papel importante en la inducción de p53 y puede contribuir a la apoptosis inducida por el QUIN.

En contraste, otros autores han sugerido que la muerte celular excitotóxica seguida de la inyección intracerebral de QUIN no es mediada por apoptosis, debido a que no se ha encontrado fragmentación de ADN internucleosomal (Ignatowicz et al., 1991). Contrario a esto, Portera-Cailliau y colaboradores (1995) demostraron que el patrón de escalera del ADN ocurre *in vivo* en las primeras horas después de haberse inyectado la toxina, y que tiempo después éste se pierde, convirtiéndose en una mancha, lo que sugiere componentes necróticos de muerte celular. A nivel ultraestructural, las neuronas lesionadas por QUIN muestran morfología necrótica, y a diferentes tiempos post-lesión no se encuentran indicios de apoptosis, por lo que la posible explicación a esto es que la fragmentación del ADN internucleosomal es un paso común temprano en todos los tipos de muerte celular, y dependiendo de que proteasas sean liberadas, resultará en muerte apoptótica o necrótica.

En otro reporte reciente se evaluaron los procesos de muerte activados por la 3-HK y el QUIN (Chiarugi et al., 2001), encontrándose que la potencia neurotóxica de ambos agentes fueron cuantitativamente similares, aunque las vías de muerte activadas por estas toxinas fueron considerablemente diferentes. La 3-HK activa primordialmente procesos apoptóticos de muerte neuronal, mientras que las neuronas expuestas a QUIN principalmente mueren por necrosis. En este mismo contexto, los antagonistas del receptor para NMDA, inhibidores de la SON neuronal (SONn) y los inhibidores de la poli ADP ribosa polimerasa (PARP) previenen la toxicidad inducida por QUIN, pero no la de 3-HK. Estas observaciones sugieren que la vía de muerte responsable de la toxicidad del QUIN involucra la activación de SONn mediada por receptores para NMDA y la activación de la PARP, lo cual resulta en un colapso energético y finalmente en la muerte celular de tipo necrótico, primordialmente (Zhang et al., 1994; Ha & Zinder 1999; Pieper et al., 1999).

En general se puede decir que es posible que mecanismos de muerte necrótica y apoptótica puedan coexistir simultáneamente dentro de células que se están degenerando por acción del QUIN, pero es importante mencionar que ultraestructuralmente la morfología apoptótica es ocultada por la rápida lisis necrótica de las células.

2.2.1.1.8 QUIN en la EH

Los niveles basales de QUIN no causan daño alguno al organismo; sin embargo, un pequeño aumento en las concentraciones normales constituye un riesgo tóxico. En cerebros *post mortem* de pacientes con EH se ha encontrado un aumento en los niveles de la enzima 3-hidroxi-antranilato oxigenasa en el estriado (Schwarcz et al., 1988), sugiriendo que en algún momento hubo un aumento en la activación de esta vía que pudiera estar facilitando la muerte neuronal. Interesantemente, diversos estudios han mostrado que la sobre-expresión de la forma silvestre de la proteína htt puede proteger a los cultivos celulares contra la toxicidad del QUIN (Leavitt et al., 2006).

Recientemente Guidetti y colaboradores (2004) mostraron que los niveles de QUIN y 3-HK son incrementados 3 o 4 veces en la neocorteza y el neocortecio de pacientes con la EH en grado 1. En contraste, los niveles de 3-HK y QUIN no mostraron ningún cambio o tendencia a disminuir en grados más avanzados de la enfermedad. Estos resultados revitalizan la hipótesis del QUIN en la EH, propuesta desde hace más de 20 años (Schwarz et al., 1983) y la cual sugiere específicamente que la 3-HK y el QUIN pueden participar en fases iniciales de los procesos neurodegenerativos en la EH. Particularmente se propone que el incremento en estos metabolitos acelera la muerte neuronal a través de la activación de los receptores para NMDA y la generación de radicales libres.

Hay diversas similitudes entre la patología observada en la EH y el modelo de QUIN: como en la EH, el QUIN induce la muerte de células GABAérgicas que involucra la degeneración de neuronas espinosas medianas positivas a encefalina y sustancia P (Beal et al., 1986). Otro punto importante de mencionar es el hecho de que en la EH no se conoce el mecanismo de muerte celular preciso, aunque una de las hipótesis es la muerte celular por excitotoxicidad inducida por glutamato. En el cerebro de pacientes con la EH hay una reducción en la producción de ATP, llevando esto a un desbalance secundario de la bomba ATPasa Na^+K^+ , la cual funciona normalmente para mantener los gradientes electrónicos a través de las membranas celulares durante los potenciales de acción. En el cerebro de pacientes con la EH, la membrana de células neuronales es crónicamente despolarizada tras el disparo de potenciales de acción, lo que permite la expulsión del tapón de Mg^+ que normalmente bloquea el receptor para NMDA. Cuando los receptores para NMDA permanecen abiertos por largos períodos de tiempo, hay un influjo masivo de calcio al interior de la célula, llevando al daño oxidativo (Beal, 1992). La población de neuronas que mueren en la EH, son las neuronas espinosas medianas del estriado que son ricas en receptores para NMDA, y son, por lo tanto, más vulnerables a la muerte celular excitotóxica que otros tipos celulares (Gardian & Vecsei, 2004). En la EH también ocurre la muerte celular tanto de neuronas como de células gliales en el estriado, y el marcaje con TUNEL también aparece en neuronas del estriado, pero es detectable hasta los 7 días post-lesión.

2.2.2 Alteraciones en el metabolismo energético

El metabolismo energético es la base de las funciones celulares. Una adecuada transferencia de electrones a través de una serie de reacciones redox garantiza la obtención de sustratos energéticos necesarios para el óptimo funcionamiento de las células. Se sabe que el SNC es especialmente vulnerable a las variaciones energéticas, debido al elevado metabolismo que desarrollan las neuronas, así como a la baja capacidad de almacenar sustratos ricos en energía; por lo tanto, alteraciones en la capacidad de las neuronas para mantener los niveles normales de energía o simplemente, la necesidad de responder rápidamente a un requerimiento mayor de la misma, pueden disminuir la viabilidad neuronal (Less, 1993). Las alteraciones en el suministro de sustratos ricos en energía provocan paralelamente cambios en la concentración intracelular y extracelular de iones, y con ellos en el potencial de membrana. Estos cambios provocan primordialmente la despolarización de la membrana (Martín et al, 1994). En estos procesos es de especial interés el ión Ca^{2+} ya que un incremento en este ión a nivel citosólico puede deberse a la liberación del mismo desde sus almacenes intracelulares. En los últimos años se han descrito numerosas enfermedades asociadas al metabolismo energético deficiente de la mitocondria, tal es el caso de la EH, en la cual se ha observado disminución del metabolismo para la glucosa y el oxígeno en los ganglios basales y la corteza cerebral (Beal, 1992). Esta disminución en el metabolismo energético mitocondrial parece deberse a su vez a la disminución en la actividad de los complejos I y IV de la cadena de transporte de electrones (Borlongan et al., 1997; Brenuan et al., 1985). Estos hallazgos se ven apoyados por los estudios ultraestructurales en los que se observan mitocondrias anormales en pacientes tanto jóvenes como adultos mayores de esta enfermedad (Stryz-Ponsar et al., 1994).

Las toxinas mitocondriales ácido 3-nitropropiónico (3-NP) y malonato han sido ampliamente utilizadas, tanto en roedores como en primates no humanos, para inducir la muerte celular en neuronas estriatales vía la inhibición del complejo II (succinato deshidrogenasa) del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y la cadena de transporte de electrones en la mitocondria, reduciendo así la producción de ATP. Sin embargo, el 3-NP ha sido más utilizado para estos propósitos debido a su selectividad por las neuronas el estriado.

2.2.2.1 Acido 3-nitropropiónico (3-NP)

2.2.2.1.1 Antecedentes

La historia del 3-NP ha sido ampliamente revisada por Ludolph (1991); esta toxina fue inicialmente caracterizada como un agente responsable de encefalopatía aguda en el ganado de las regiones del oeste de Norte América. Los animales accidentalmente ingerían *Astragalus*, una especie que contenía altas cantidades de 3-nitropropanol, el cual *per se* no es tóxico para los mamíferos, pero puede convertirse en 3-NP por acción de la alcohol deshidrogenasa hepática. Es importante mencionar que las nitrotoxinas pueden ser metabolizadas por los microorganismos del estómago, lo cual puede constituir un importante mecanismo de detoxificación (Anderson et al., 2005). Posteriormente, se demostró que el 3-NP es un inhibidor de la enzima succinato deshidrogenasa, la cual es parte del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y de la cadena de transporte de electrones (Alston et al., 1977; Coles et al., 1979). Tiempo después, cerca de 1000 casos de envenenamiento por 3-NP fueron reportados en China cuando estas personas ingirieron caña de azúcar infestada con el hongo *Artrinium* (Ming 1995; Liu et al., 1992) durante la celebración del año nuevo chino. Esta intoxicación produjo encefalopatía en niños y adultos, seguido en la mayoría de los casos por una retrasada distonia y discinesia asociadas a la degeneración del caudado y del putamen, lo cual fue observado a través de una tomografía computarizada (He et al., 1995; Ludolph et al., 1991). El modelo de 3-NP es pues, confiable para estudiar la EH debido a que el desbalance en el metabolismo de la glucosa en células del cerebro como resultado de las deficiencias enzimáticas descritas causa la disminución de la producción de ATP.

El 3-NP cruza la barrera hematoencefálica por lo que puede ser administrado sistémicamente a ratas, ratones y primates no humanos. Para su administración sistémica, se pueden emplear tanto bombas osmóticas subcutáneas como la inyección directa subcutánea o intraperitoneal; sin embargo, la dosis empleada depende de la cepa de animales a utilizar pues se sabe que las ratas Fisher son más susceptibles en general a diferentes condiciones pero muestran variabilidad significativa en respuesta a la toxina. En el caso de las ratas Lewis, éstas parecen perder susceptibilidad al 3-NP, pero con la dosis apropiada muestran lesiones consistentes y déficit conductual.

2.2.2.1.2 3-NP, déficit energético y daño oxidativo

Como ya se mencionó, el 3-NP es una micotoxina que causa neurotoxicidad en animales y en humanos (Ludolph et al., 1991). Las lesiones cerebrales causadas por la administración sistémica del 3-NP son altamente específicas del estriado, aunque también se han encontrado en hipocampo, tálamo y corteza cerebral (Borlongan et al., 1997), por lo que ha sido ampliamente utilizado como un modelo de la EH (Beal et al., 1993; Borlongan et al., 1997; Brouillet et al., 1999). El mecanismo primario de esta toxina involucra la inhibición de la succinato deshidrogenasa, una enzima localizada en el interior de la membrana mitocondrial y la cual es responsable de la oxidación del succinato a fumarato, llevando a la reducción de la síntesis de ATP y a la muerte neuronal, (Túnez et al., 2004; Coles et al., 1979).

Varias enzimas involucradas en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y la cadena de transporte de electrones están afectadas en su actividad en cerebros de pacientes con la EH. Por ejemplo, la actividad de aconitasa y los complejos II, III y IV están reducidos en el caudado y putamen de cerebros de pacientes con esta enfermedad (Browne et al., 1997; Gu et al., 1996; Tabrizi et al., 1999). El bloqueo de la actividad mitocondrial está a su vez íntimamente asociado con la formación de ERO. La inhibición de enzimas en la cadena de transporte de electrones puede llevar a un incremento en la fuga de los mismos desde la mitocondria y la consecuente producción de $O_2^{\cdot -}$, H_2O_2 y $\cdot OH$, entonces las ERO causan daño a las membranas celulares y al material genético. Como se mencionó con anterioridad, el 3-NP causa daño mitocondrial por la inhibición de la succinato deshidrogenada, una enzima involucrada tanto en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos como en la cadena de transporte de electrones (Alson et al., 1977; Coles et al., 1979). La administración sistémica del 3-NP además disminuye los niveles de glutatión e incrementa la producción de radicales libres y de nitrotirosina, así como los niveles de proteínas oxidadas en el estriado. Interesantemente, antioxidantes endógenos y exógenos como la coenzima Q10, la N-acetilcisteína, la melatonina, la deshidroepiandrosterona, entre otros, protegen del daño neuronal inducido por el ácido 3-NP (La-fontaine et al., 2000; Nam et al., 2005; Túnez et al., 2004a; Túnez et al., 2005). Estos hallazgos sugieren que el estrés oxidativo y nitrérgico pueden ser importantes mediadores en el daño neuronal inducido por esta toxina. Más aún, la S-alilcisteína (SAC), el compuesto organosulfurado más abundante del ajo (Lawson 1996), tiene propiedades antioxidantes tanto *in vivo* como *in vitro*, en dicho modelo.

2.2.2.1.3 3-NP y excitotoxicidad

En 1987, Hamilton y Gould sugirieron que la excitotoxicidad mediada por glutamato podría jugar un papel importante en la degeneración estriatal mediada por 3-NP. Desde que esa hipótesis fue sugerida, los mecanismos de toxicidad con 3-NP han sido asociados con la excitotoxicidad; pero no fue sino hasta 1988 cuando se determinó experimentalmente que un defecto en el metabolismo energético podía resultar en excitotoxicidad, lo cual fue demostrado por el trabajo de Novelli (1988), quien mostró que inhibidores de la fosforilación oxidativa o de la Na^+,K^+ -ATPasa permitían al glutamato ser neurotóxico en concentraciones que ordinariamente no ejercían neurotoxicidad. El mecanismo para este efecto fue una consecuencia en la reducción en el nivel de ATP, el cual es crucial para mantener el potencial de reposo normal de la membrana celular (Beal et al., 1994). Estudios adicionales empleando microdiálisis mostraron un incremento no significativo en las concentraciones extracelulares de glutamato después de la administración de dosis neurotóxicas de 3-NP, en contraste con un marcado incremento en la concentración de lactato (Wullner et al., 1994; Beal, 1994). Estos resultados son consistentes con la idea de que el 3-NP causa excitotoxicidad haciendo a las neuronas más vulnerables a los niveles endógenos de glutamato.

En diferentes reportes se ha encontrado que toxinas mitocondriales como el ión MPP^+ (cation 1-metil-4-fenilpiridinium) derivado del MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina), el malonato y la rotenona, pueden producir lesiones parecidas a las generadas por agonistas de receptores para NMDA

(NMDA y quinolinato) y este efecto puede ser bloqueado por la administración de antagonistas para receptores NMDA, tales como el MK-801 o dizocilpina (Brouillet et al., 1999; Greene & Greenamyre, 1996). Estos resultados combinados con las observaciones que indican un déficit energético en pacientes con la EH, sugieren que las anomalías metabólicas en esta enfermedad pueden resultar en la activación indirecta de la cascada excitotóxica (Albin & Greenamyre, 1992; Beal, 1992). Adicionalmente, se sabe que el 3-NP *in vitro* altera la homeostasis del Ca^{2+} involucrando la excitotoxicidad, que ha sido vinculada con la generación de ERO (Lafon-Cazal et al., 1993; Alexi et al., 1998). Más aún, se ha reportado ampliamente el papel del estrés oxidativo en el daño neuronal inducido por el 3-NP (La Fontaine, 2000; Teunissen, 2002).

2.2.2.1.4 3-NP y alteraciones conductuales

El 3-NP es capaz de mimetizar los síntomas hiper e hipocinéticos de la EH, dependiendo del tiempo de administración. Cuando el 3-NP es dado en dos dosis individuales a animales, éstos sufren síntomas hipercinéticos análogos a los estadios tempranos de la EH (Borlongan et al., 1997). En contraste, la administración de más de 4 inyecciones de 3-NP causa movimientos hipoactivos similares a los estadios tardíos de la enfermedad. En primates no humanos la administración de dosis bajas de 3-NP por 3 a 6 semanas causa movimientos coreiformes evocados por apomorfina y distonia de las extremidades (Palfi et al., 1996) y cuando es administrado por más de 4 meses, este agente causa discinesias espontáneas y distonia (Brouillet et al., 1995). El 3-NP también causa degeneración de neuronas espinosas medianas GABAérgicas (Beal et al., 1993).

Un estudio de análisis cuantitativo de conducta locomotora espontánea utilizando el sistema Digiscan mostró que animales tratados con 3-NP (10 mg/Kg) cada 4 días por 28 días, presentan una fase temprana de hipercinesia (1ª y 2ª semanas de tratamiento), seguida de una fase tardía de hipocinesia (Borlongan et al., 1995a,b). Cuando la intoxicación crónica de 3-NP fue detenida durante la fase hipercinética temprana, se observó un persistente incremento en la actividad locomotora por alrededor de 16 días más. De acuerdo a estos resultados parece obvio que dependiendo de la dosis empleada de 3-NP será la magnitud del déficit neurológico, pudiendo éste ir desde incoordinación general, somnolencia y debilidad general, hasta parálisis de las extremidades traseras, rigidez y finalmente la muerte (Hamilton & Gould, 1987a).

Estudios adicionales en ratones muestran que la administración sistémica simple repetida de 3-NP resulta en lesiones de los ganglios basales con una disminución inicial en la actividad motora seguida por episodios ocasionales de hiperactividad y/o movimientos anormales (temblor, inclinación de la cabeza, rigidez de la cola) (Ludolph et al., 1991). Adicionalmente, estudios en ratas jóvenes (6-10 semanas) y en ratas adultas (14-28 semanas) inyectadas sistémicamente con 3-NP muestran que estos animales manifiestan bradicinesia y parálisis, respectivamente, sugiriendo que la severidad en el deterioro conductual es dependiente de la edad (Borlongan et al., 1995; Koutouzis et al., 1994).

Más recientemente, Roitberg y colaboradores (2002) inyectaron bilateralmente QUIN e intramuscularmente 3-NP a primates no humanos, y evaluaron la conducta antes, durante y después

de 3 meses de la administración con las toxinas. Estos autores encontraron que la función cognitiva evaluada a través de la recuperación de un objeto mostró un marcado deterioro en las respuestas de éxito en ambos casos. Ambos grupos de animales mostraron una postura anormal; el grupo tratado con 3-NP mostró distonia y discinesia inducida por apomorfina, mientras que los animales tratados con QUIN mostraron hiperactividad nocturna. Por otra parte, Shear y colaboradores (1998b) también evaluaron las diferencias con ambas toxinas, las cuales al ser administradas intraestriatalmente ambas causan un incremento en la actividad a las 2 semanas de la lesión, aunque solo el QUIN muestra hiperactividad a las 4 semanas. Tanto el QUIN como el 3-NP mostraron un deterioro significativo en la prueba de equilibrio de viga. Por su parte, el 3-NP mostró un severo deterioro en el aprendizaje en la prueba del laberinto de Morris. Las ratas tratadas con 3-NP, pero no las tratadas con QUIN mostraron una rigidez progresiva que tiende a incrementarse con el tiempo. Las pruebas neuroanatómicas indicaron que ambas toxinas producen atrofia estriatal, dilatación ventricular y pérdida neuronal, pero solo el 3-NP crea cavidades necróticas en el estriado. Todos estos datos sugieren que la inyección intraestriatal con QUIN mimetiza los estadios tempranos de la EH, mientras que el 3-NP mimetiza tanto los estadios tempranos como los tardíos de la enfermedad, por lo que este último es considerado como uno de los mejores modelos a nivel conductual.

2.2.2.1.5 3-NP y muerte celular

El 3-NP es una toxina mitocondrial que inhibe irreversiblemente a la succinato deshidrogenasa, e induce rápidamente necrosis en algunas neuronas y apoptosis tardía en otras en cultivos de neuronas hipocampales (Pang & Geddes, 1997), lo cual es consistente con la hipótesis de excitotoxicidad indirecta que propone que la pérdida en los niveles de ATP resulta en el déficit energético que conlleva a la inhabilitación del mantenimiento de las bombas iónicas, resultando en la despolarización de la membrana y removiendo el Mg^{2+} que bloquea al receptor para NMDA-voltaje dependiente (Novelli et al., 1988; Albin & Greenamyre, 1992; Beal et al., 1993). Bajos estas condiciones, niveles basales de glutamato extracelular generan muerte neuronal por necrosis y este efecto es mediado por el receptor para NMDA (Pang & Geddes, 1997; Behrens et al., 1995). Estos resultados sugieren que el influxo de Ca^{2+} a través del receptor para NMDA puede jugar un papel crítico en la determinación del tipo de muerte celular. Recientemente, Nasr y colaboradores (2003) demostraron que la muerte necrótica inducida por el 3-NP en presencia o ausencia de glutamato, está asociada con una elevación de $[Ca^{2+}]_{\text{citósólico}}$ y $[Ca^{2+}]_{\text{mitocondrial}}$; este tipo de muerte neuronal está vinculada con una rápida y pronunciada pérdida de ATP y con una rápida caída del potencial de membrana mitocondrial. Estos resultados demuestran que la muerte neuronal necrótica inducida por el 3-NP, particularmente en presencia de bajos niveles extracelulares de glutamato está asociada con elevación en la concentración de calcio citoplasmático y mitocondrial, la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, la activación de calpaínas y la pronunciada pérdida de ATP. Adicionalmente, Jacquard y colaboradores (2007) han demostrado recientemente que la activación moderada de los receptores para NMDA por el QUIN combinada con alteraciones mitocondriales por el 3-NP puede aumentar sinérgicamente la

degeneración estriatal, la cual involucra primordialmente la desregulación del Ca^{2+} intracelular y sugieren la ausencia de hipersensibilización del receptor para NMDA por la toxina mitocondrial.

Pan y Geddes (1997) demostraron con anterioridad que en cultivos de neuronas hipocámpales el 3-NP induce la muerte celular a través de dos distintas vías. Una que involucra la activación de receptores para NMDA y que rápidamente lleva a la muerte necrótica, y la otra es una retrasada muerte apoptótica, la cual es independiente al receptor para NMDA. La excitotoxicidad fue involucrada en la muerte celular inducida por 3-NP cuando se administró simultáneamente el MK-801 con el 3-NP al medio de cultivo, observándose que el MK-801 efectivamente bloquea la muerte necrótica aguda. Sin embargo, este agente fue ineficaz en la prevención de la muerte apoptótica, indicando que la necrosis neuronal aguda fue mediada por el receptor para NMDA, mientras que la apoptosis retrasada fue independiente de dicho receptor. Morfológicamente, la muerte celular aguda resulta en un encogimiento nuclear, fragmentación y un rápido hinchamiento del cuerpo celular, y lisis, características todas de muerte necrótica. En contraste, la muerte celular retrasada lleva a una fragmentación nuclear, sin hinchamiento del cuerpo, característico de la muerte apoptótica (Wyllie et al., 1980).

3. Cadena Respiratoria Mitocondrial

La mitocondria contiene dos compartimentos ligados por las membranas interna y externa. La membrana externa es permeable a metabolitos pequeños, mientras que la permeabilidad de la membrana interna es controlada y mantenida por el alto gradiente electroquímico creado por la cadena respiratoria mitocondrial, que es necesaria para la conservación de la energía y síntesis de ATP (Echtay, 2007). En la membrana interna mitocondrial se encuentra la cadena respiratoria que está formada por proteínas que se ensamblan en complejos multiprotéicos denominados I, II, III y IV. El complejo I denominado NADH-deshidrogenasa recibe los electrones de la oxidación del NADH y los transfiere a la coenzima Q, la cual se desplaza libremente a través de la membrana interna mitocondrial; el complejo II, la succinato deshidrogenasa, se encarga de transferir los electrones del succinato a la coenzima Q, sin translocar protones; el complejo III, la citocromo c-coenzima Q oxidoreductasa, recibe los electrones de la coenzima Q y los transfiere al citocromo c, un transportador electrónico protéico soluble que se encuentra en el espacio intramembranal; y el complejo IV, o citocromo oxidasa, acopla la oxidación del citocromo c con la reducción del oxígeno molecular a agua. Las reacciones globales de los complejos I, II, III y IV son exergónicas y la energía liberada en ellas crea un gradiente de protones a través de la membrana interna mitocondrial al resultar los protones bombeados al espacio intermembranal. Este gradiente de protones libera la energía suficiente para que tenga lugar la síntesis de ATP por la ATP-sintetasa.

Como se ha discutido, en los últimos años se han descrito numerosas enfermedades asociadas al metabolismo energético de la mitocondria, tales como la EH, en la cual se ha observado una marcada disminución del metabolismo de la glucosa y del O_2 en los ganglios basales y la corteza cerebral (Beal, 1992). Esta disminución en el metabolismo energético mitocondrial parece deberse a una alteración en la actividad de los complejos I y IV (Borlongan et al., 1997; Brenuan et al., 1985), y estos hallazgos se

ven apoyados por los estudios ultra estructurales en los que se observan mitocondrias anormales en pacientes tanto jóvenes como adultos mayores con esta enfermedad (Strydom et al., 1994).

3.1 Potencial de membrana en células neuronales

En el caso particular de las células neuronales, el mantenimiento de las funciones de los complejos de la cadena respiratoria les garantiza la capacidad de conservar su potencial basal de membrana, el cual se sabe que es electronegativo con respecto al medio extracelular (Martín et al, 1994). El éxito en el mantenimiento de este potencial claramente depende de la actividad de las ATPasas de membrana, las cuales mantienen un gradiente electronegativo adecuado al modular el ingreso y la salida de iones de la célula. Se sabe que el SNC es especialmente vulnerable a las variaciones energéticas, debido tanto al elevado metabolismo que desarrollan las neuronas como a la baja capacidad de almacenar sustratos ricos en energía; por lo tanto, ya sea por alteraciones en la capacidad de las neuronas para mantener los niveles normales de energía, o simplemente a partir de su necesidad de responder rápidamente a un requerimiento mayor de la misma, la viabilidad neuronal se puede ver afectada (Less, 1993). La disminución en el suministro de sustratos ricos en energía provoca paralelamente cambios en las concentraciones intra y extracelular de iones, y con ello en el potencial de membrana, mismo que generalmente conduce a una despolarización de la membrana (Martín et al, 1994). En estos procesos cobra especial interés el ión Ca^{2+} , ya que un incremento en su concentración intracelular por efecto de apertura sostenida en sus canales, o bien por su liberación desde reservorios intracelulares (desde la mitocondria y el retículo endoplásmico), conducirá a procesos excitotóxicos que terminen en la muerte neuronal.

4. Estrés oxidativo y nitrosativo

El desbalance en la producción de ERO y las defensas antioxidantes provoca un daño oxidativo conocido como estrés oxidativo, el cual lleva a una serie de cambios fisiológicos y bioquímicos que provocan el deterioro y muerte celular. Por su parte, el estrés nitrosativo (o nitrérgico) se refiere a una serie de eventos tóxicos producidos a nivel celular y molecular por radicales derivados del nitrógeno y moléculas reactivas como el NO^{\cdot} y el ONOO^- , entre otros (Santamaría & Jiménez, 2005).

4.1 Especies reactivas de oxígeno (ERO)

La mayor parte del oxígeno celular se reduce a través de reacciones enzimáticas, pero del 2-5% escapa a esta reducción tetravalente y ello resulta en la formación de ERO. Los radicales libres (RL) son átomos o moléculas que poseen uno o más electrones desapareados en su órbita más externa, y que también pueden ser generados cuando ocurre una adición a un doble enlace. Los RL son muy inestables y reaccionan con otras moléculas, entregando o recibiendo electrones. Las ERO son definidas como entidades moleculares que reaccionan con componentes celulares, resultando en

alteraciones en su función. Las ERO incluyen tanto a RL ($O_2^{\bullet -}$ y el $\bullet OH$), como a otras especies no radicales, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el $ONOO^-$ (Tabla 4).

RADICALES	NO RADICALES
ión superóxido ($O_2^{\bullet -}$)	peróxido de hidrógeno (H_2O_2)
radical hidroxilo ($\bullet OH$)	ácido hipocloroso ($HOCl$)
radical peroxilo ($\bullet OOR$)	ozono (O_3)
radical hidropoxilo ($\bullet OOH$)	oxígeno singulete (1O_2)
radical alcoxilo ($\bullet OR$)	peroxinitrito ($ONOO^-$)
	peróxidos orgánicos ($ROOH$)

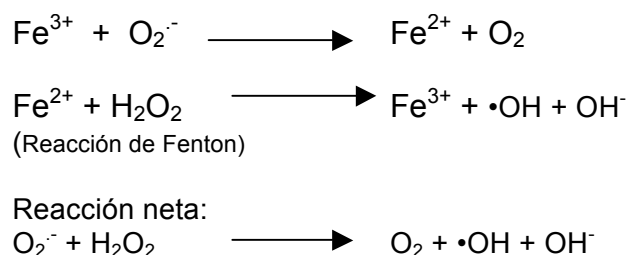
Tabla 4. Especies Reactivas de oxígeno

El O_2 es un diradical, lo cual significa que tiene dos electrones libres o desapareados; estos electrones tienen el mismo giro por lo que solo pueden interactuar con los electrones de otros elementos y compuestos que estén libres y que tengan el giro opuesto. Por esta razón, el O_2 no es muy reactivo. Por su parte, se sabe que del oxígeno singulete (1O_2) existen dos tipos: Sigma ($\uparrow \downarrow$) que es altamente reactivo y el Delta ($\uparrow \downarrow _$) que no es reactivo. El 1O_2 se forma cuando uno de los electrones libres del O_2 capta energía y cambia de giro; cuando esto sucede, inmediatamente se aparea con el otro electrón libre, el cual es muy reactivo y es capaz de reaccionar con la mayoría de los compuestos celulares. El radical producido fuera de las células reacciona fundamentalmente con las membranas plasmáticas, mientras que el producido dentro de las células interactúa con ADN, proteínas y lípidos (Lledias et al., 2000).

Por su parte, el $O_2^{\bullet -}$ se forma cuando el O_2 capta un electrón, y esto ocurre en todos los organismos que respiran, pues una pequeña parte de los electrones que pasan por la cadena respiratoria sale de ésta y es captado por el O_2 . Otras fuentes de superóxido son diversas oxidasas como la xantina-xantina oxidasa ó la NADPH oxidasa.

La mayor parte del H_2O_2 proviene de la dismutación del $O_2^{\bullet -}$, aunque también algunas oxidasas lo producen, tales como la oxidasa de xantina, oxidasas de aminoácidos de hexosas y de fenoles. La concentración de H_2O_2 en las células varía dependiendo del organismo o del tejido y va desde pico o nanomolar, hasta cerca de 100 μM . Esta especie es poco reactiva y puede difundir a través de los compartimientos celulares, aunque tiende a formar aductos con carbohidratos, aminoácidos y bases nitrogenadas.

Por otro lado, la reacción de Haber-Weiss catalizada por el hierro - la cual hace uso de la química de Fenton - es considerada actualmente como el mecanismo principal por el cual el $\bullet OH$ es generado en los sistemas biológicos (Kehrer, 2000).



4.2 Daño oxidativo

La producción de RL conlleva a una serie de reacciones con macromoléculas celulares, lo que da como resultado la formación de una gran cantidad de productos que pueden ser determinados, y de esta manera se puede evaluar el daño producido a nivel oxidativo. Dentro de las moléculas con las que estas especies pueden interactuar se encuentran las proteínas, los carbohidratos, los lípidos y el ADN. La oxidación de proteínas por las ERO produce cambios físicos importantes, como la fragmentación de su estructura hasta la oxidación de las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos, mismos que a su vez promueven directamente la dimerización o la agregación. En cuanto al ADN, éste puede ser atacado por el $\cdot\text{OH}$, lo cual conlleva a la formación de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina, su aducto. Por otra parte, el HNO_2 y ONOO^- pueden nitrar y desaminar al ADN, causando rupturas en las cadenas y mutaciones.

La reacción de RL y otras ERO con los lípidos de las membranas biológicas ocasiona la producción de diversos compuestos tóxicos, altera su fluidez y permeabilidad, así como la actividad de las proteínas, enzimas, receptores y canales iónicos asociados a ellas, situación que compromete la estructura y función celular.

4.2.1 Peroxidación de lípidos (PL)

Los ácidos grasos saturados o los mono-insaturados que forman parte de la membrana son poco susceptibles al ataque por ERO, mientras que los poli-insaturados son rápidamente atacados debido a la presencia de sus dobles enlaces conjugados, mismos que debilitan la energía de unión del átomo de hidrogeno presente en el carbono adyacente a los enlaces. Es precisamente esta alta reactividad lo que hace que la PL en los sistemas biológicos sea un proceso auto-catalítico y de propagación.

Los radicales libres $\cdot\text{OH}$ e hidroperóxido, así como el $^1\text{O}_2$, pueden reaccionar con los ácidos grasos de los fosfolípidos y otros componentes lipídicos de las membranas para formar hidroperóxidos lipídicos (Aikens & Dix, 1991; Choe et al., 1995; Choi & Yu 1995, Gutteridge & Halliwell, 1990; Halliwell & Gutteridge, 1984; Horton & Fairhurst, 1987; Niki et al., 1991; Schaich, 1992). La fase de iniciación comienza cuando el radical libre secuestra un átomo de hidrógeno de uno de los carbonos de la cadena carbonada para generar un radical libre lipídico ($\text{L}\cdot$). Los ácidos grasos poli-insaturados de

membrana son especialmente susceptibles a ser atacados por RL, puesto que contienen grupos metilenos separados por dobles enlaces que debilitan el enlace C-H metileno. Cuando un L• se origina, sufre inmediatamente un reajuste molecular, produciéndose así un dieno conjugado que puede reaccionar con el O₂ y formar un radical hidroperoxilo. Este radical libre da lugar a endoperóxidos, o bien, puede tomar un átomo de hidrógeno de un carbono metileno de otro ácido graso poli-insaturado adyacente para formar de nuevo un RL lipídico y un hidroperóxido (Fig. 5). El RL lipídico se combina con otra molécula de O₂ y así se establece una cadena de propagación del daño peroxidativo. Por su parte, el hidroperóxido, que es un compuesto estable, entra en contacto con iones metálicos de transición y producirá más RL que inician y propagan otras reacciones en cadena. Así, las membranas resultan seriamente dañadas y por tanto, su funcionalidad se ve alterada (Rice-Evans & Burton, 1993).

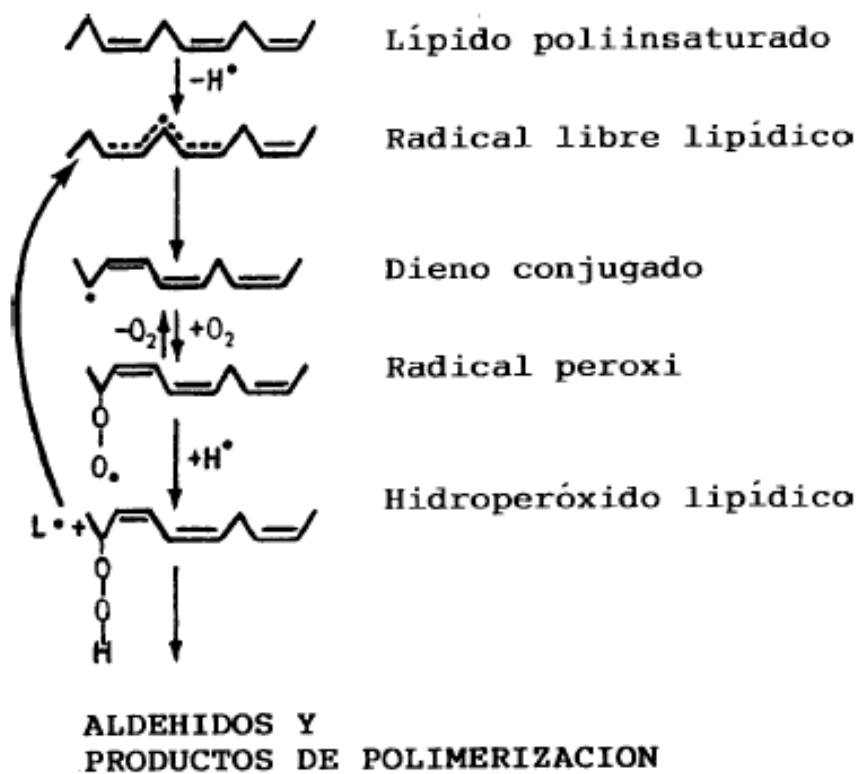


Figura 5. Esquema del proceso de la peroxidación de lípidos

4.3 Sistemas antioxidantes

El daño que causan las ERO es contrareestado en gran medida por los mecanismos antioxidantes celulares y los mecanismos de recambio y reparación. Estos sistemas antioxidantes son de dos tipos: enzimáticos y no enzimáticos.

- Sistemas antioxidantes no enzimáticos:

Los antioxidantes no enzimáticos constituyen un grupo heterogéneo de moléculas hidrófobas e hidrófilas que capturan RL y originan especies químicas menos nocivas para la integridad celular (Bandyopadhyay et al., 1999). En esencia, su mecanismo de acción se basa en la donación de un electrón a un RL con el fin de estabilizarlo. Dentro de estos sistemas no enzimáticos destacan:

- Vitamina E (α -tocoferol). Es considerado como el antioxidante más densamente distribuido en los seres vivos. Tiene la capacidad de interrumpir la peroxidación de lípidos en la fase de propagación, reaccionando con los radicales lipoperoxilos y los alcoxilos. Al interactuar con los lipoperoxidos se genera un radical α -tocoferilo el cual es reciclado a α -tocoferol al interactuar con el ácido ascórbico. Este último tiene la capacidad de interactuar con 1O_2 , y en menor grado con $O_2^{\bullet-}$ (Burton et al., 1982; Halliwell & Gutteridge, 2001).
- Vitamina C (ácido ascórbico). Distribuido intra y extracelularmente. Reacciona en forma directa con el $O_2^{\bullet-}$ y $\bullet OH$ (Frei et al., 1990; Sauer et al., 2001), generando radical ascorbilo, el cual es reciclado a ácido ascórbico por el sistema reductor tioredoxina/tioredoxina reductasa (May et al., 1998).
- Glutatión (GSH/GSSG): Su forma reducida se considera como un compuesto antioxidante ya que impide la oxidación de los grupos $-SH$ de las proteínas; tiene la capacidad de reaccionar con las ERO, transfiriéndoles un átomo de hidrógeno (Halliwell & Gutteridge, 2001).
- Ácido úrico. Tradicionalmente es considerado un producto terminal del metabolismo de las purinas, también posee propiedades antioxidantes; sin embargo, se desconoce el proceso por el cual ejerce su acción protectora. Su mecanismo de acción aparente es el de prevenir la oxidación de la vitamina C y formar complejos con los metales Fe y Cu (Yu, 1994).

- Sistemas antioxidantes enzimáticos:

Dentro de los sistemas destinados a convertir las ERO en especies menos reactivas - antes de que se conviertan en moléculas más reactivas - destacan:

- Superóxido dismutasa (SOD). Es una metaloproteína cuya función es catalizar la dismutación del $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 . La SOD presenta tres isoformas, de las cuales dos tienen en su sitio activo Cu^{2+} y Zn^{2+} ; una de ellas se localiza en el citosol, en el núcleo y en menor cantidad en el espacio intramembranal, y la otra se ubica extracelularmente en fluidos como

el plasma (Oury et al., 1996). La tercera isoforma tiene en su sitio activo al Mn^{2+} y se encuentra en la matriz mitocondrial.

- Catalasa. Es una hemoproteína que se concentra principalmente en los peroxisomas y en las mitocondrias; su papel antioxidante consiste en disminuir el riesgo de formación del $\bullet OH$ por la interacción del H_2O_2 con metales de transición vía la reacción de Fenton (Halliwell, 1999). Su mecanismo catalítico tiene lugar en dos fases: la primera fase se lleva a cabo el rompimiento de una molécula de H_2O_2 , generándose en el grupo hemo la especie oxoferrilo con la formación de una molécula de H_2O ; la segunda fase se caracteriza por la reacción de la especie oxoferrilo con otra molécula de H_2O_2 (Putnam et al., 2000).
- Glutación peroxidasa. Es una selenoproteína que se ubica en la matriz mitocondrial y en el citosol. La glutación peroxidasa es eficiente en la degradación de H_2O_2 y requiere de la presencia de GSH para poder llevar a cabo su actividad catalítica (Powers & Lennon, 1999).
- Glutación reductasa. Enzima que requiere NADPH y que cataliza la conversión de GSSG a GSH. Esta enzima es esencial para el ciclo redox del GSH que mantiene los niveles adecuados de esta molécula (Harris & Massey, 1992).
- La citocromo oxidasa, la cual esta encargada de evitar la reducción univalente del oxígeno.

4.4 Especies reactivas de nitrógeno

Como se mencionó anteriormente, el estrés nitrosativo es generado por la rápida oxidación del ON. El ON es un radical porque tiene un electrón desapareado; sin embargo, éste no es muy reactivo y fácilmente difunde. El ON reacciona lentamente con los tioles, formando tionitritos, o con los sulfidrilos de algunas enzimas. En cambio, esta especie reacciona rápidamente con otros radicales, tales como el $O_2^{\bullet -}$, y forma de esta manera al $ONOO^-$. El ON puede reaccionar con diversas moléculas (Fig. 6), como el O_2 , ERO, metales de transición y tioles, que lo llevan a formar las ERN.

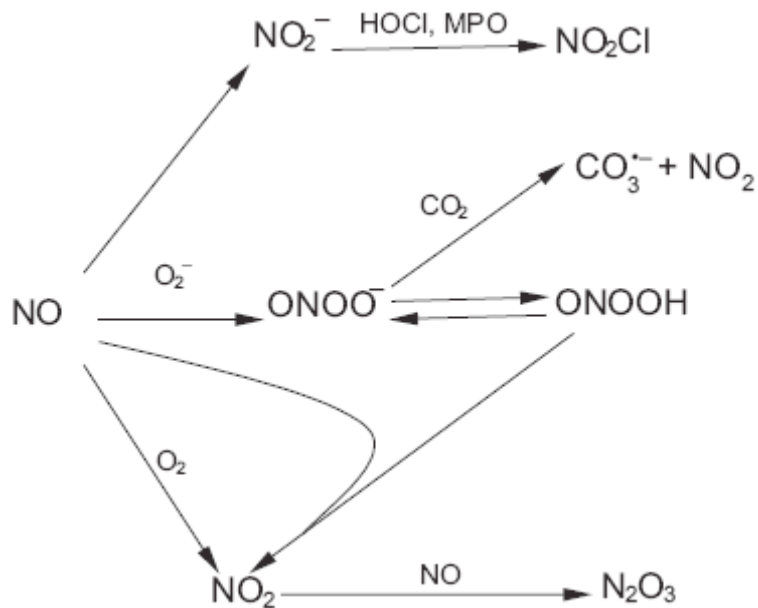


Figura 6. Vía general de oxidación del ON y generación de ERN (Tomado de Soneja et al., 2005).

4.4.1 Peroxinitrito

4.4.1.1 Formación

La generación simultánea de ON y $\text{O}_2^{\bullet -}$ favorece la producción del ONOO^- (Fig. 7) (Beckman et al., 1990). La reactividad oxidante del peroxinitrito es mediada por la actividad biológica del $\bullet\text{OH}$.

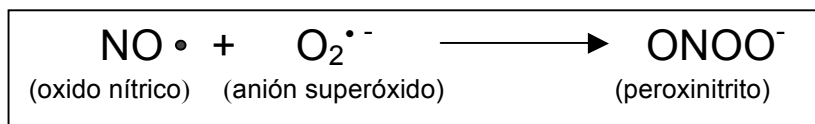


Figura 7. Formación del ONOO^-

La constante de reacción del ON con el $\text{O}_2^{\bullet -}$ es de $\sim 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Radi, 1994), indicando la competencia del ON con la SOD por el $\text{O}_2^{\bullet -}$. El ONOO^- está en equilibrio rápido con su forma protonada, el ácido peroxinitroso (ONOOH) ($\text{pK}_a = 6.8$). Ambas especies existen *in vivo*, predominando la forma aniónica a pH 7.4. Tanto la forma aniónica como la protonada del ONOO^- son capaces de cruzar, por diferentes mecanismos, las biomembranas (Denicola et al., 1996).

El ONOO^- reacciona rápidamente con el dióxido de carbono (CO_2) presente en sistemas biológicos, conduciendo así a la formación de radicales secundarios, tales como los radicales carbonato ($\text{CO}_3^{\bullet -}$) y dióxido de nitrógeno ($\bullet\text{NO}_2$). Finalmente, una pequeña fracción de ONOO^- se homoliza, dando lugar a la formación del $\bullet\text{OH}$ (Fig. 8). Adicionalmente, la deficiencia de tetrahydrobiopterina (BH_4) puede desencadenar la formación de $\text{O}_2^{\bullet -}$ y/o ONOO^- a través del desacoplamiento de la actividad de la SON1 (Abu-Soud et al., 1997; Vásquez-Vivar et al., 1999). Por otra parte, el ONOO^- puede ser sintetizado después de una persistente inhibición de la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial por el ON (Poderoso et al., 1996; Clementi et al., 1998).

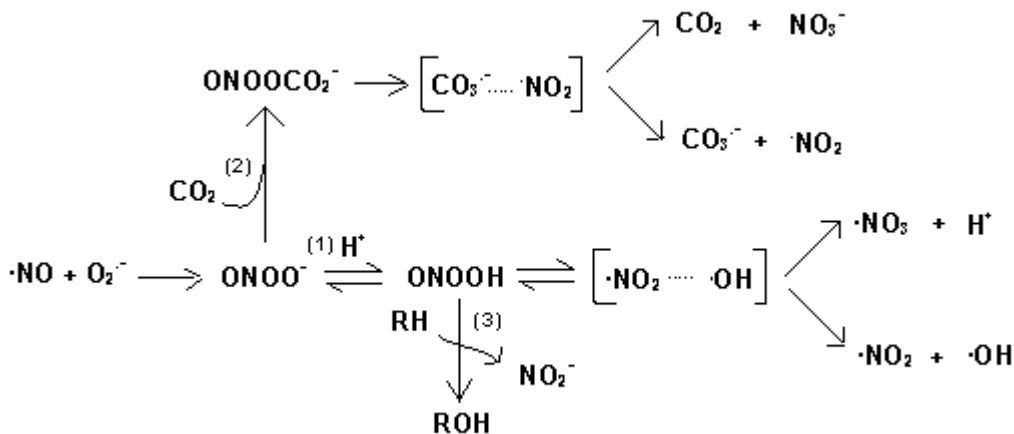


Figura 8. Rutas de formación y descomposición de ONOO⁻ en sistemas biológicos. Esta especie se forma por la reacción controlada por difusión de los radicales ON y O₂^{•-} (Radi, 2000). El ONOO⁻ puede formar, junto con el dióxido de carbono (CO₂), el anión nitrosoperoxycarboxilato (ONOOCO₂⁻), un aducto transitorio (2) (Denicola et al., 1996), para luego formar anión carbonato y dióxido de nitrógeno o CO₂ y nitratos (Bonini et al., 1999; Goldstein & Czaoski, 1998; Lehnig, 1999). El ácido peroxinitroso puede oxidar directamente sustratos (3) o descomponerse en una ruptura homolítica a •OH y •NO₂. Los procesos de nitración (adición de un grupo nitro NO₂ a una molécula) involucran las reacciones del •NO₂ con las moléculas blanco.

4.4.1.2 Toxicidad

El ONOO⁻ es particularmente efectivo oxidando moléculas aromáticas y compuestos organosulfurados, incluyendo aminoácidos libres y residuos peptídicos. La cisteína y el glutatión son importantes reservorios de antioxidantes y éstos son convertidos a disulfuros (Szabo et al., 2002). En sistemas *in vitro*, el ONOO⁻ es muy reactivo: se ha reportado dentro de su actividad la rápida oxidación de grupos sulfhidrilos y tioésteres, así como la nitración e hidroxilación de compuestos aromáticos (incluyendo la tirosina, el triptofano y la guanina). La oxidación de grupos sulfhidrilo es responsable de la inhibición mitocondrial, de la aconitasa citosólica y de otras enzimas críticas en la cadena respiratoria mitocondrial (Hausladen & Fridovich, 1994). Mientras la reacción del ONOO⁻ con grupos sulfhidrilo es directa, la nitración de tirosina probablemente esté asociada con la formación del catión nitrosonio (NO₂⁺) intermediario.

La mitocondria representa un blanco preferencial de las acciones tóxicas del ONOO⁻. Experimentos iniciales (Radi et al., 1994) mostraron que el ONOO⁻ afecta varios componentes de la cadena de transporte mitocondrial, de la síntesis de ATP y la enzima ferro-sulfurada del ciclo de Krebs, la aconitasa, causando así una inhibición de la respiración y una caída de la síntesis de ATP. Estos efectos, a su vez, tienen un impacto directo sobre la homeostasis mitocondrial y celular del Ca²⁺. Además, la interacción del ONOO⁻ con las mitocondrias puede determinar la señalización de procesos de muerte celular programada (apoptosis). Se sabe que concentraciones bajas de ONOO⁻ pueden

disparar la muerte celular apoptótica, mientras que altas concentraciones pueden llevar a necrosis (Virág et al., 2003). Algunos de los procesos citotóxicos evocados por el ONOO^- se muestran en la Figura 9.

Varias reacciones del ONOO^- ocurren cuando éste reacciona con enzimas, macromoléculas y lípidos, mostrando así influencia sobre funciones celulares. En primera instancia, la nitración de tirosina puede llevar a la disfunción de las proteínas nitradas, como se ha sugerido en el caso de la SOD, la tirosina hidroxilasa neuronal, el citocromo P450 y la prostaciclina sintetasa (Greenacre & Ischiropoulos, 2001). Es importante resaltar que el ONOO^- también puede inhibir a la SOD (Ischiropoulos et al., 1992; Yamakura et al., 1998), la glutaredoxina (Aykaç-Toker et al., 2001) y a otras moléculas y sistemas antioxidantes como el glutatión (Cuzzocrea et al., 1998). Finalmente el ONOO^- también puede ocasionar daño a nivel genético por rupturas y desaminación del ADN (Rojas-Walker et al., 1995).

La reacción del ONOO^- con los lípidos lleva a la peroxidación (formación de malondialdehído y dienos conjugados) y a la formación del nitro-nitroperoxo- y/o oxidación de aductos de lípidos nitrados (Rubbo et al., 1994).

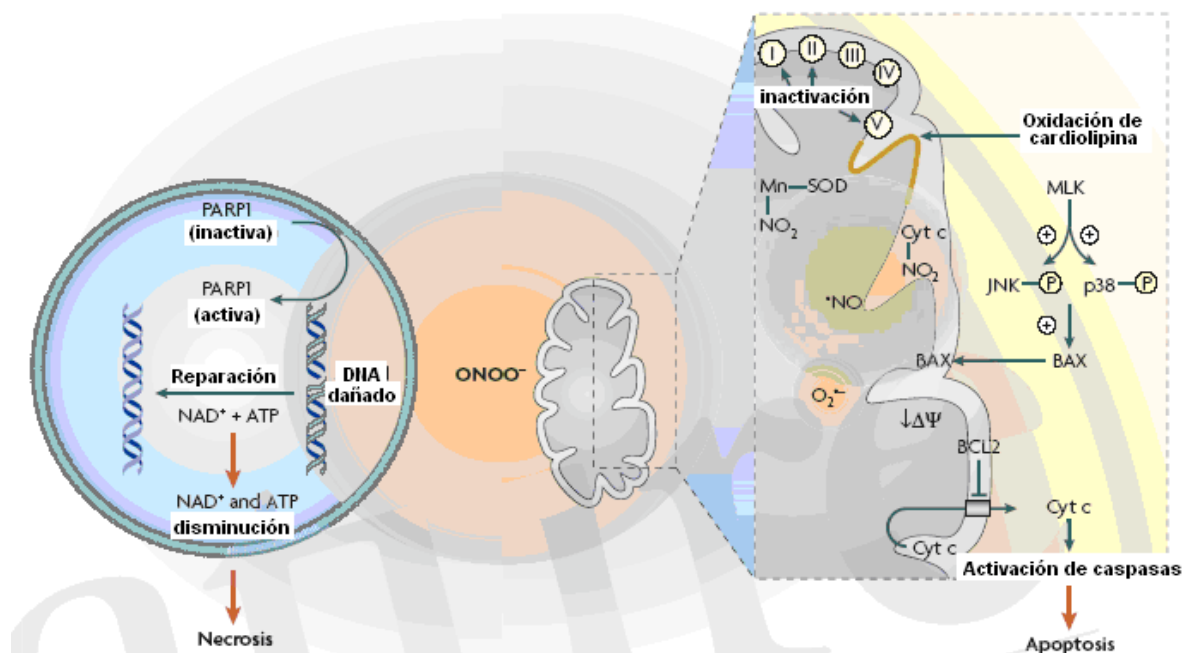


Figura 9. Mecanismos de muerte celular inducidos por el ONOO^- (Tomado de Szabo et al., 2007).

El ONOO^- puede inducir tanto la muerte celular apoptótica como la necrótica (Fig. 9), dependiendo de los niveles de su producción, los niveles de antioxidantes endógenos y el tiempo de exposición. La apoptosis involucra señales mitocondriales que pueden aumentar la oxidación intramitocondrial y las reacciones de nitración en blancos cruciales, como componentes protéicos del poro de transición permeable y la cardiolipina, lo cual facilita la liberación del citocromo c y la activación del apoptosoma. Alternativamente, la apoptosis puede ser mediada por la activación secundaria de la protein cinasa activada por mitógeno que resulta en la fosforilación de p38 y JNK (c-jun N-terminal cinasa), lo cual a su vez promueve la translocación de proteínas pro-apoptóticas, tales como BAX, a la mitocondria. Los

altos niveles de ONOO⁻ llevan a la muerte necrótica, en parte por la activación de la vía de la poli(ADP) polimerasa (PARP), ya que la excesiva activación de la PARP lleva a la disminución celular de NAD⁺ y ATP, lo que resulta en una pérdida de la regulación redox y el colapso energético así como la subsecuente muerte necrótica. La disminución de ATP también puede ser secundaria a la inactivación de los complejos I, II y V de la cadena de transporte de electrones por el ONOO⁻, así como de la nitración dependiente de esta especie de proteínas mitocondriales, tales como la MnSOD.

La nitración de residuos de tirosina es considerada como un marcador bioquímico de la producción de ONOO⁻ *in vitro* e *in vivo* (Beckman et al., 1994). La detección de 3-nitrotirosina se ha establecido como un marcador del incremento de la nitración de tirosina en una gran variedad de enfermedades (Greenacre & Ischiropoulos, 2001; Ischiropoulos et al., 1992), y este fenómeno puede desacoplar diversas funciones celulares. La deficiencia en la SOD-Cu/Zn causa la incapacidad de las neuronas de eliminar el O₂^{•-}, aumentando así la formación de ONOO⁻ (Oury et al., 1992). Se ha observado que en pacientes con esclerosis amiotrófica lateral se expresa una mutante no funcional de la SOD-Cu/Zn; estos pacientes muestran un aumento significativo en la 3-nitrotirosina (Rosen et al., 1993; Beal et al., 1997), sugiriendo el involucramiento del ONOO⁻ en la patogénesis de este desorden (Beckman et al., 1993; 2001). En el hipocampo de cerebros *postmortem* de pacientes con Alzheimer hay una importante correlación entre el depósito del β-amiloide y la nitración de un gran número de proteínas (Sultana et al., 2006), sugiriendo que la modificación de proteínas por el ONOO⁻ puede estar involucrada en la patogénesis de diversas enfermedades neurológicas (Beckman et al., 1990; Lipton et al., 1993; Bonfoco et al., 1995).

Actualmente se están desarrollando estrategias que disminuyan la formación o el tiempo de vida del ONOO⁻. Dentro de dichas estrategias destacan tres primordialmente: 1) Su bloqueo por limitación del ON o del O₂^{•-}, ya sea inhibiendo la SON o acelerando la dismutación del O₂^{•-}; 2) la competencia estequiométrica de atrapadores de ONOO⁻; y 3) la catálisis de la descomposición de ONOO⁻, llevando así a otros productos inocuos (por ejemplo, nitratos y nitritos) (Cuzzocrea et al., 2001).

4.4.1.3 Metaloporfirinas

4.4.1.3.1 Generalidades

Como se mencionó anteriormente, en la actualidad se están estudiando las vías de descomposición del ONOO⁻ con especial interés. Se ha reportado que la reacción del ONOO⁻ con CO₂ provee una vía adicional para su descomposición, aunque esta vía es lenta con respecto a la difusión transmembranal y la reacción con centros metálicos. Desde que se demostró que el ONOO⁻ reacciona eficientemente con centros metálicos biológicos, las metaloporfirinas han sido investigadas como catalizadores en la descomposición de ONOO⁻, sugiriéndose así a éstas como una nueva clase de catalizadores que descomponen un rango amplio de ERO, tales como el O₂^{•-}, el peroxilo, el ONOO⁻ y los RL peroxilipídicos.

Algunos factores en las metaloporfirinas, tales como el tipo de centro metálico, el potencial redox y la carga electrostática de estos compuestos, son reconocidos como determinantes importantes en su actividad catalítica de descomposición y potencia. Estos conceptos han conducido al desarrollo de metaloporfirinas con actividad específica mayor que la de las SOD nativas. Las metaloporfirinas más potentes que hasta el momento se han evaluado poseen metales como manganeso o el hierro embebidos dentro del “corazón” de la porfirina; estas porfirinas son conocidas como antioxidantes ya que pueden atrapar un gran número de ERO (Day, 2004; Muscoli et al., 2003; Patel & Day, 1999; Riley, 1999).

Recientemente se ha descrito un conjunto de metaloporfirinas que catalizan selectivamente la descomposición de ONOO⁻. Entre éstas tenemos al FeTMS, al 5,10,15,20-tetrakis[4-sulfonatofenil]porfirinato de Fe(III) (FeTPPS), al 5,10,15,20-(N-metil-4-piridil) porfirinato de Fe(III) (FeTMPyP), a la porfirina tetrakis(ácido 4-benzoico) de Mn(III) (MnTBAP), a la porfirina tetrakis(1-metil-4-piridil) de manganeso (III) (MnTMPyP), etc. Las porfirinas de Mn(III) y Fe(III) muestran efectividad a bajas concentraciones; sin embargo, dependiendo del mecanismo de reacción, los atrapadores catalíticos pueden no apagar o detener efectivamente a los intermediarios reactivos, por lo que requieren de compuestos celulares (típicamente de antioxidantes como el ascorbato y el GSH) para ser regenerados (Crow, 2000). Porfirinas hidrosolubles de Fe y Mn presentan una alta reactividad con el ONOO⁻ (Shimanovich & Groves, 2001), además de prevenir el daño oxidativo dependiente de ON en modelos animales y en cultivos celulares. Recientemente, estos compuestos han demostrado eficacia en modelos experimentales de isquemia (flujo sanguíneo insuficiente) (Mackense et al., 2001) y de esclerosis lateral múltiple en ratones transgénicos (Wu et al., 2003).

En los últimos años, se ha descrito en detalle la gran afinidad del ONOO⁻ por los metales de transición. La primera indicación de que el ONOO⁻ actúa con el Fe del grupo hemo aparece en 1993, cuando Floris y colaboradores reportaron una constante de $6.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para la reacción del ONOO⁻ con la mieloperoxidasa a un pH de 7.2. En 1996, Stern y colaboradores reportaron que el FeTMPyP descompone el ONOO⁻ a nitrato, y en el mismo año Szabo y colaboradores reportaron que el MnTBAP inhibe la oxidación mediada por el ONOO⁻ *in vitro* y que además previene la inhibición de la respiración mitocondrial en células expuestas a ONOO⁻. Más aún, estudios en animales han demostrado que porfirinas tales como el Fe(TMPS) reducen la nitración de residuos de tirosina evocada por ONOO⁻, no

observándose protección cuando se utilizó el H₂TMPS; es decir, la misma porfirina pero sin el metal. Esto sugiere fuertemente que la protección que proveen las metaloporfirinas se debe a la presencia del centro metálico (Misko et al., 1998).

4.4.1.3.2 Mecanismos de acción

Las porfirinas de Mn(III) son diferentes de las de Fe(III) en los agentes reductores que utilizan. El ascorbato es necesario para reducir el intermediario oxo-Mn(IV) a Mn(III), y de esta manera completar el ciclo (Fig. 10). Afortunadamente, la reducción del oxo-Mn(IV) ocurre más rápido que la oxidación por ONOO⁻ (Crow, 2000).

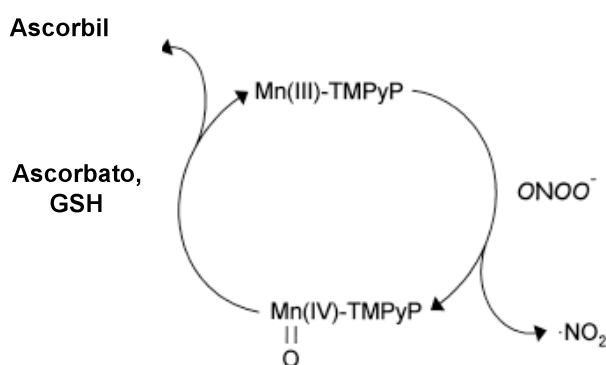


Figura 10. Mecanismo de descomposición del ONOO⁻ propuesto para las porfirinas de Mn(III) (Tomado de Crow, 2000). La reacción del ONOO⁻ con porfiratos de Mn(III) produce un intermediario Mn(IV) y el radical dióxido de nitrógeno, y estas dos especies pueden oxidar moléculas que contengan residuos de tirosina; sin embargo, el ascorbato puede limitar este evento mediante la reducción del Mn(IV) a Mn(III) y del •NO₂ a nitrato, regenerándose así la porfirina y completando el ciclo catalítico.

Por otra parte, las porfirinas de Fe(III) descomponen al ONOO⁻ sin agentes reductores. La reacción entre el ONOO⁻ y la porfirina de Fe(III) forma el oxo-Fe(IV). Por su parte, las porfirinas de Fe(III) descomponen el ONOO⁻ a NO₃⁻ en mayor proporción, tal y como se muestra en la Figura 11.

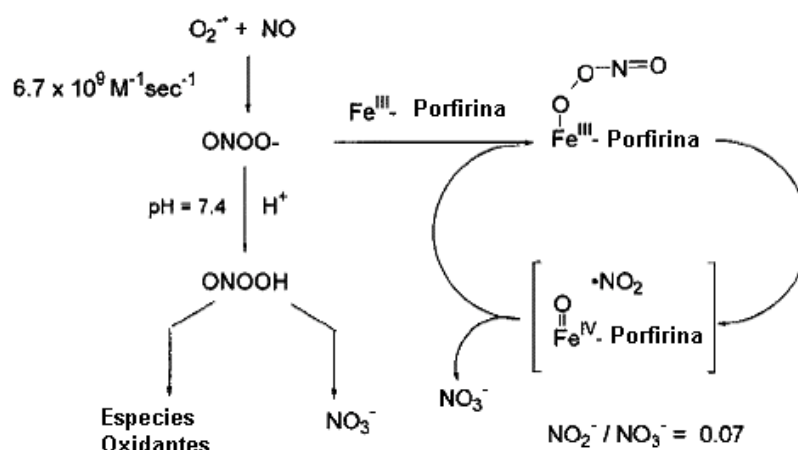


Figura 11. Mecanismo de la descomposición de ONOO⁻ por porfirinas de Fe(III) (Tomado de Salvemini et al., 1998).

Las siguientes reacciones (Fig. 12) muestran la forma en que la porfirina de Fe(III), al reaccionar con el ONOO⁻, forma un intermediario oxoFe(IV) (1) el cual se puede reducir al reaccionar con el •NO₂ (2) o con el NO₂⁻ (4), y formar nitrato. Cuando el oxoFe(IV) reacciona con el •NO₂ libre, es muy rápido comparado con el NO₂⁻. El •NO₂ está en constante equilibrio con el N₂O₄ (3), el cual es una fuente de NO₂⁻ y NO₃⁻ (Shimanovich & Groves, 2001).

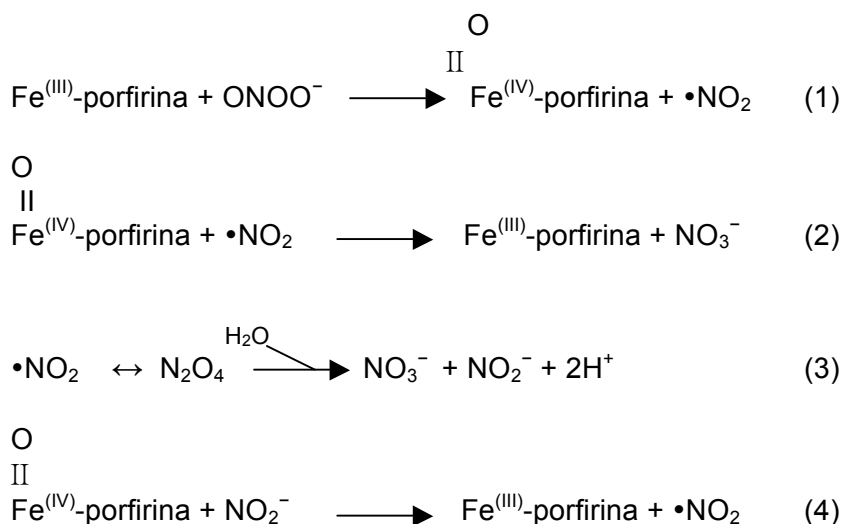


Figura 12. Reacciones del ONOO⁻ con las porfirinas de Fe(III).

Consecuentemente, las metaloporfirinas han mostrado ser protectoras en una amplia variedad de modelos de inducción de estrés oxidativo *in vitro*, en donde se involucra la generación de O₂⁻, H₂O₂, y ONOO⁻. A nivel micromolar, donde las metaloporfirinas parecen no ser tóxicas, éstas protegen a las células contra la toxicidad de generadores de O₂⁻, como el paraquat (Day et al., 1995) y la piocianina (Gardner et al., 1996), y de generadores de H₂O₂ como la glucosa oxidasa (Day et al., 1997) y de ONOO⁻ (Szabó et al., 1996a; Misko et al., 1998). En consecuencia, las metaloporfirinas son potentes inhibidores de la PL (Day et al., 1999). Un claro ejemplo del potencial terapéutico experimental de las porfirinas se aprecia con el MnTBAP, el cual suprime la respuesta inflamatoria además de disminuir los niveles de 3-nitrotirosina de manera concentración dependiente en un modelo de pleuresia de pulmón (Cuzzocrea et al., 1999b).

4.4.1.3.3 5,10,15,20-tetrakis (4'-fenilsulfonato) porfirinato de Fe(III) (FeTPPS)

En particular, el FeTPPS (Fig. 13) es un poderoso catalizador de la descomposición de ONOO⁻. Es soluble en agua y cataliza la isomerización de ONOO⁻ exclusivamente a nitrato (Stern et al., 1996). Se ha determinado que juega un papel protector muy importante en inflamaciones agudas (Salvemini et al., 1998) y que tiene efecto protector frente al ONOO⁻ generado endógenamente en células RAW

264.7 y en cultivos de neuronas hipocampales expuestas a citocinas (Misko et al., 1998). De igual manera, se ha probado en modelos de daño renal inducido por cisplatino, donde provee protección y reduce la cantidad de nitrotirosina (Chirino et al., 2004). Un estudio reciente basado en la disfunción miocárdica, reporta que el Fe(TPPS) está asociado a la reducción de la degradación de $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$, el inhibidor del factor de transcripción nuclear NF- κB - factor involucrado en eventos de muerte celular apoptótica, entre otros -, así como en la activación de macrófagos y en la reducción de los niveles plasmáticos del FNT- α , el cual inicia y magnifica el proceso inflamatorio (Lancel et al., 2004).

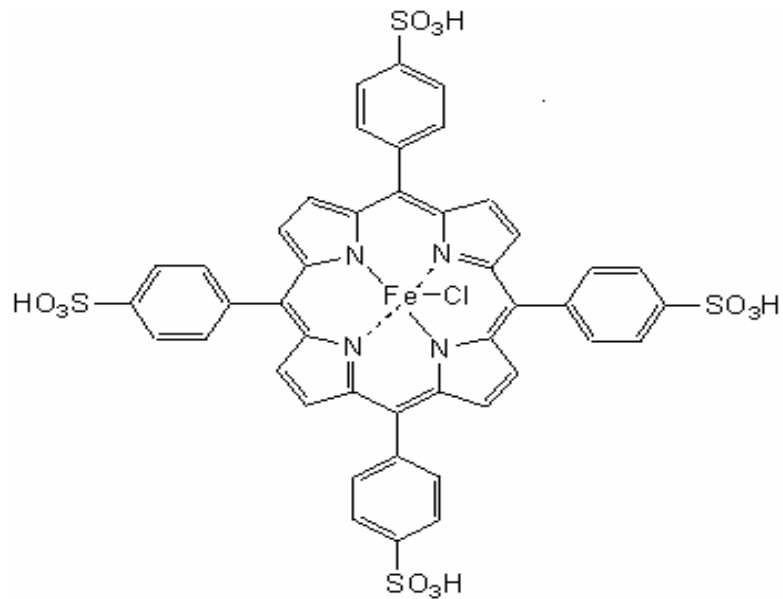


Figura 13. Estructura del FeTPPS

El FeTPPS también ha sido utilizado en un modelo neurotóxico inducido por metanfetamina, en el cual resultó ser totalmente protector contra la producción de ONOO^- y contra la disminución de dopamina inducida por esta toxina (Imam et al., 2000). Recientemente, este catalizador fue utilizado en un modelo de isquemia cerebral focal en ratas, donde produjo neuroprotección al disminuir los niveles de ONOO^- , 3-nitrotirosina, apoptosis y daño al ADN (Thiyagarajan et al., 2004).

Un estudio más reciente muestra que el FeTPPS previene el daño al ADNm inducido por el palmitato, así como su citotoxicidad (Rachek et al., 2006). Cuzzocrea y colaboradores (2006) mostraron que el FeTPPS previene la contractilidad aórtica y la disfunción endotelial inducidas por LPS, sugiriendo así que la formación de ONOO^- juega un papel importante en estos modelos experimentales.

5. Planteamiento y Justificación del Problema

Dado que la EH es un padecimiento que limita la capacidad del paciente de cuidarse a sí mismo, debido a la invalidez total a la que llega, y principalmente debido al largo tiempo que pasan estos pacientes con las manifestaciones clínicas, es importante evaluar todos los posibles factores mecanísticos causales que pueden estar involucrados en el padecimiento, y de esta manera poder ofrecer alternativas para mejorar la calidad de vida del paciente. En consideración a las evidencias que establecen que el déficit energético, los eventos excitotóxicos y la generación de especies reactivas desempeñan un papel crucial en las alteraciones neuroquímicas, moleculares y conductuales en la EH, el propósito de este estudio es caracterizar y vincular los perfiles de déficit energético producidos por el QUIN y el 3-NP, y sus respectivos mecanismos tóxicos mediados por la formación de la especie tóxica, el ONOO⁻ (dependencia del déficit energético del ONOO⁻). El empleo del QUIN y del 3-NP para estos propósitos nos permitirá descifrar el grado de participación del ONOO⁻ en los diferentes componentes tóxicos de la EH a nivel experimental: a través del modelo excitotóxico (QUIN) evaluaremos la participación del ONOO⁻ en eventos relacionados con la alteración del metabolismo energético, así como los efectos directos de la neurotoxina sobre la neurodegeneración. A través del modelo de déficit energético directo (3-NP), podremos comparar las alteraciones mediadas por el ONOO⁻ con las del otro modelo y estableceremos criterios bioquímicos y conductuales de comparación.

6. Hipótesis

Si la formación del ONOO^- en ambos modelos obedece a mecanismos diferenciales, entonces nosotros sugerimos que esta especie se constituirá como un factor causal de daño energético en el modelo excitotóxico, y como una consecuencia de la alteración en el metabolismo energético en el modelo con 3-NP. En consecuencia, el empleo de catalizadores de su descomposición y agentes que en general prevengan su formación resultará en la atenuación o la prevención diferencial del déficit energético, del daño oxidativo, y en general de la toxicidad evocada por esta especie en ambos modelos.

7. Objetivos

7.1 Objetivo general

- Caracterizar y vincular los perfiles de déficit energético producidos por el QUIN (modelo excitotóxico) y del 3-NP (modelo de déficit energético directo), y sus respectivos mecanismos tóxicos mediados por la formación de la especie reactiva, el ONOO⁻ (dependencia del déficit energético del ONOO⁻).

7.2 Objetivos particulares

1. Caracterizar el patrón conductual, 24 h y 7 días después de la inyección bilateral de QUIN y 3-NP en el estriado de las ratas.
2. Caracterizar el daño oxidativo a través de la peroxidación de lípidos; y la funcionalidad mitocondrial a través de la reducción de MTT en los estriados de las ratas previamente tratados con las toxinas.
3. Evaluar el posible papel causal del ONOO⁻ sobre las alteraciones conductuales, el daño oxidativo y la funcionalidad mitocondrial en ratas lesionadas intraestriatalmente con QUIN y 3-NP, a través del Fe(TPPS).

8. Metodología

8.1 Reactivos

El QUIN, el 3-NP y el ácido tiobarbitúrico fueron de Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, EUA). El Fe(TPPS) fue de Calbiochem USA. Los demás reactivos de grado reactivo y/o HPLC y fueron de casas comerciales conocidas. Las soluciones fueron preparadas usando agua desionizada obtenida de un sistema purificador Direct-Q (Millipore).

8.2 Animales

Ratas Wistar macho (270-300 g) fueron utilizadas a lo largo del trabajo. Para todos los experimentos propuestos, los animales se agruparon en 5 por cada caja de acrílico, alimentados con un producto comercial (Purina Chow) y agua *ad libitum*. Las habitaciones del bioterio fueron mantenidas en condiciones constantes de temperatura ($25 \pm 3^\circ\text{C}$), humedad ($50 \pm 10\%$), y luz (12:12 ciclo luz:oscuridad).

8.3 Diseño experimental

Los animales fueron agrupados en seis grupos experimentales (seis ratas por grupo como mínimo), de acuerdo al tratamiento al que fueron expuestos:

- 1) Control o Sham
- 2) Fe(TPPS)
- 3) QUIN
- 4) QUIN + Fe(TPPS)
- 5) 3-NP
- 6) 3-NP + Fe(TPPS)

Las ratas de todos los grupos fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.) y 30 min después recibieron una inyección intraestriatal bilateral de solución salina (grupos 1 y 2), 120 nmoles de QUIN en cada estriado (grupos 3 y 4) ó 250 nmoles de 3-NP en cada estriado (grupos 5 y 6), de acuerdo a reportes previos (Santamaría & Ríos, 1993), siguiendo las coordenadas estereotáxicas: +0.5 mm anterior a bregma, -2.6 ó +2.6 mm lateral a bregma y 4.5 mm ventral a la dura (Paxinos & Watson, 1998). Los animales control (grupo 1) y las ratas tratadas con QUIN y 3-NP (grupo 3 y 5) recibieron previamente una inyección intraperitoneal de agua estéril (pH 7.4). El Fe(TPPS) fue disuelto en agua estéril y administrado 2 h antes de la infusión intraestriatal con las toxinas (grupo 4 y 6) a una dosis previamente reportada con un efecto protector en otros modelos neurotóxicos (10 mg/Kg, i.p.) (Imam et al., 2000). Todos los animales fueron sacrificados por decapitación al séptimo día, después de la evaluación conductual (para ensayos de PL y funcionalidad mitocondrial) después de la infusión estriatal con las toxinas. Los estriados fueron disecados en hielo y preservados a -75°C en un REVCO hasta su empleo para análisis. Grupos adicionales de ratas fueron sacrificados 24 h después de la infusión de QUIN y 3-NP para la determinación de las pruebas antes mencionadas a un tiempo más corto.

8.4 Determinación conductual

La actividad conductual de las ratas fue evaluada en el monitor y analizador de actividad animal Versamax (AccuScan Instruments, Inc, Columbus, Ohio, USA) 24 h y 7 días después de la lesión con las toxinas. Los parámetros evaluados fueron la actividad horizontal y vertical y la distancia total recorrida. Los resultados fueron representados como el número total de movimientos, ya sea horizontales ó verticales, en 60 minutos, y la distancia total recorrida en (cm) también en 60 minutos, para cada grupo de datos.

8.5 Obtención de sinaptosomas

Para el análisis bioquímico se utilizaron fracciones sinaptosomales, las cuales fueron obtenidas del estriado de ratas por centrifugaciones diferenciales, con modificaciones discretas a métodos previamente reportados (Dodd et al., 1981; Santamaría et al., 2003; Pérez-De La Cruz et al., 2005). Brevemente, las ratas fueron decapitadas y los estriados de estas fueron homogenizados en sacarosa 0.32 M y centrifugados a 1,073 x g por 10 min; el sobrenadante fue re-centrifugado a 17,172 x g por 15 min. Posteriormente, se resuspendió el botón en un buffer de HEPES (NaCl 0.1 M, NaH₂PO₄ 0.001 M, NaHCO₃ 0.005 M, CaCl₂ 0.001 M, glucosa 0.006 M y HEPES 0.01 M, pH 7.4). Las fracciones sinaptosomales fueron preservadas a -72°C.

8.6 Determinación de peroxidación de lípidos en sinaptosomas

La PL en vesículas sinápticas de estriados de rata fue estimada por la producción de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), de acuerdo con reportes previos (Santamaría et al., 1999). A 250 µL de sinaptosomas se adicionaron 250µL de HEPES y 500 µL del reactivo TBA (0.75g de TBA + 15 g de ácido tricloroacético +2.54 de HCl concentrado). La solución final fue puesta en un baño de ebullición (94°C) durante 30 min. Posteriormente, las muestras fueron puestas en hielo y centrifugadas a 3,000 g por 15 min y la densidad óptica del sobrenadante fue determinada con un espectrofotómetro Genesys 8 a una longitud de onda de 532 nm. La concentración de TBARS fue calculada por interpolación en una curva estándar de malonaldehído. Los resultados fueron expresados en nmoles de TBARS por mg de proteína.

8.7 Estimación de la viabilidad mitocondrial

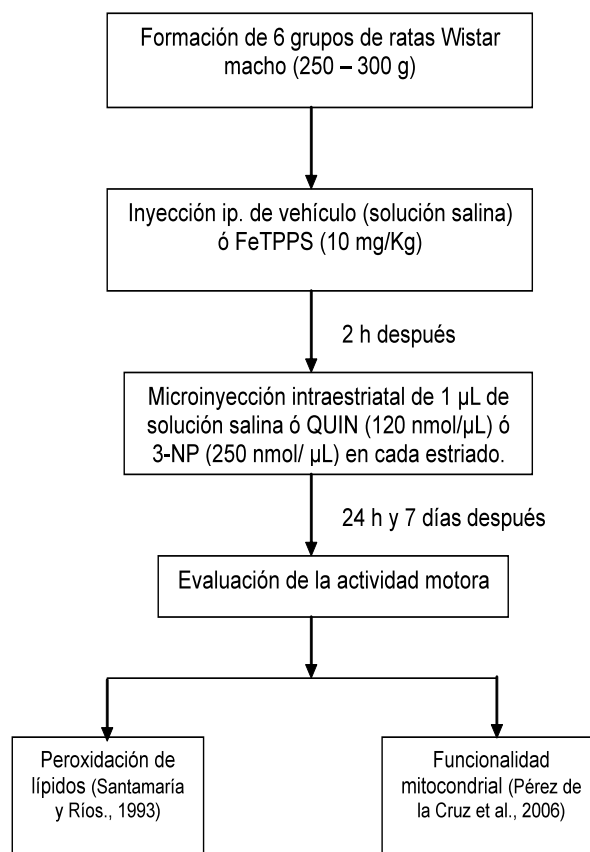
La viabilidad mitocondrial fue evaluada en fracciones sinápticas por el ensayo de reducción del MTT, realizando pequeñas modificaciones a reportes originales (Mosmann, 1983; Berridge y Tan, 1993). Este método es comúnmente empleado como un índice del estado funcional de la cadena respiratoria, ya que la formación de las sales de formazan ocurre por la acción de las deshidrogenasas mitocondriales de células viables (Masseiu et al., 2004). A 300 µL de sinaptosomas se les agregaron 100 µL de HEPES y 5 µL de MTT, y la mezcla se incubó por 20 minutos a 37°C. Transcurrida la incubación, se centrifugó a 5,000 rpm durante 3 minutos y el botón fue resuspendido en 750 µL de isopropanol ácido. La cuantificación espectrofotométrica de formazán fue realizada en un espectrofotómetro Genesys 8 a una longitud de onda de 570 nm. Los resultados fueron expresados

como el porcentaje de la reducción de MTT con respecto al control. Se recolectaron datos de seis experimentos por grupo.

8.8 Análisis estadístico

Todos los resultados fueron expresados como valores promedio \pm S.E.M. Se les aplicó un análisis de varianza de una vía seguido de la prueba de Tukey para comparaciones múltiples de medias, utilizando el software Prism 3.02 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Los grupos tratados con cada toxina y su equivalente con el respectivo pretratamiento con Fe(TPPS) fueron evaluados de manera independiente. Valores de $P < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

8.9 Diagrama de Flujo



9. Resultados

9.1 Efecto de la lesión intraestriatal con QUIN y el 3-NP en la distancia total recorrida

La Figura 14A muestra una disminución significativa en la distancia total recorrida en 60 min, 24 h después de haber lesionado a los animales bilateralmente en el estriado con 3-NP o QUIN (250 y 120 nmoles en cada estriado, respectivamente). La distancia total recorrida es un índice directo de la actividad motora. Los animales tratados previamente con Fe(TPPS) mostraron una tendencia a aumentar la actividad en los animales lesionados con las toxinas.

En la Figura 14B se muestra lo ocurrido con este marcador 7 días después de la lesión con las toxinas. A este tiempo se sigue observando una disminución significativa en la actividad motriz de estos animales, mientras que el pre-tratamiento con Fe(TPPS) no parece tener efecto sobre este patrón evaluado.

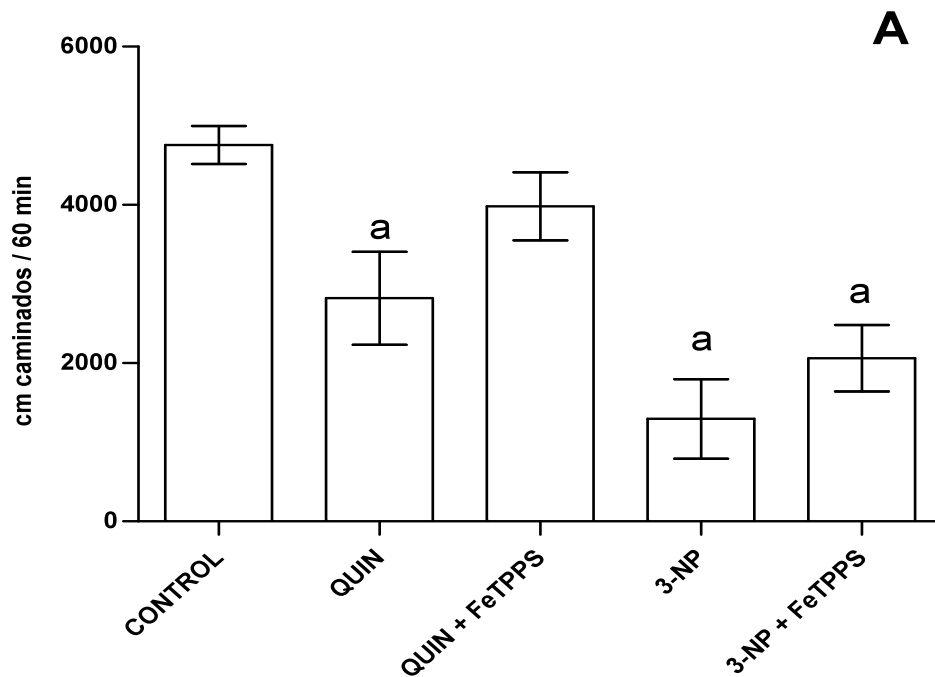


Figura 14A

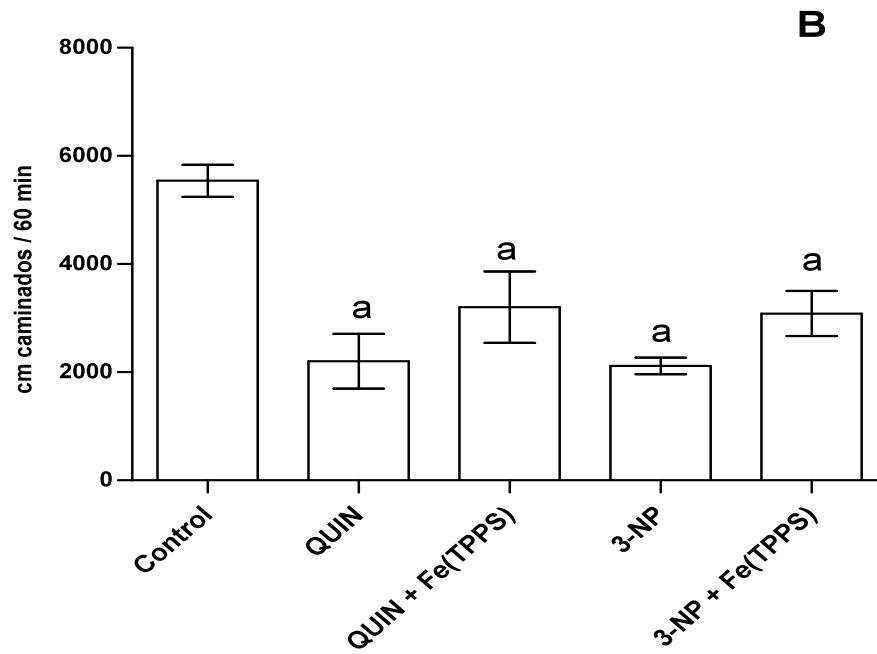


Figura 14. Efectos del QUIN y del 3-NP en la distancia total recorrida por las ratas en 60 min. En A se muestra la conducta obtenida 24 h después de la lesión con las toxinas. En B se presenta la distancia total recorrida 7 días después de la lesión. En ambas condiciones, el Fe(TPPS) se administró 2 h antes de la lesión intraestriatal. Se presenta la media \pm SEM de seis experimentos por grupo. ^a $p < 0.01$, significativamente diferente del control. ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey.

9.2 Efecto de la inyección bilateral intraestriatal con QUIN y 3-NP en la actividad horizontal de rata

La Figura 15A se observa 24 horas después de la lesión estriatal, una disminución significativa en la actividad vertical en las ratas lesionadas con 3-NP, mientras que los animales lesionados con QUIN muestran una tendencia no significativa a disminuir este parámetro. En la figura B se presenta el efecto de QUIN y 3-NP sobre la actividad horizontal 7 días después de la lesión, se puede observar un aumento no significativo en la actividad horizontal evocado por el 3-NP. En ambas condiciones, el Fe (TPPS) no mostró efecto al evocado por las toxinas.

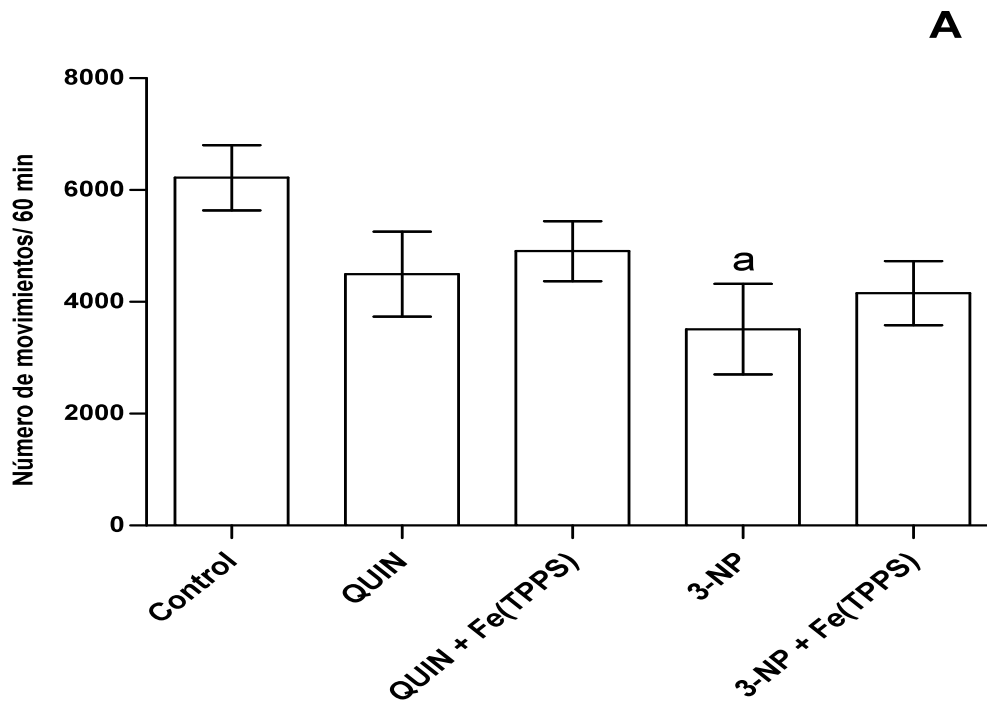


Figura 15 A

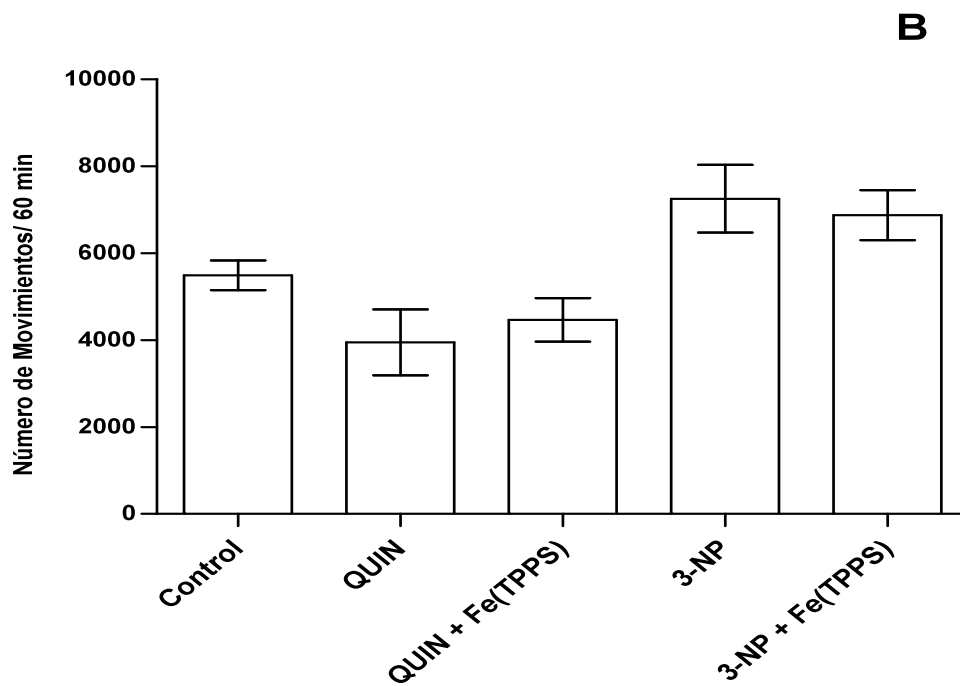


Figura 15. Efecto del QUIN y 3-NP en la actividad horizontal. En A y en B se muestra la actividad horizontal obtenida 24 h y 7 días post-lesión con las toxinas, respectivamente. Se presenta la media \pm SEM de seis experimentos por grupo. ^a $p < 0.01$, significativamente diferente del control. ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey.

9.3 Efecto de la lesión con QUIN y 3-NP en la actividad vertical. Efecto protector del Fe(TPPS).

En la figura 16 se muestra la actividad vertical de los animales lesionados con QUIN o 3-NP. En A se observa una disminución significativa de este parámetro 24 horas después de lesionar a los animales con 3-NP o QUIN. El Fe(TPPS) aumentó de manera significativa la actividad vertical en ratas lesionadas con QUIN, pero no en los animales lesionados con 3-NP.

En B se muestran la actividad vertical 7 días posteriores a la lesión con QUIN o 3-NP. Con ambas toxinas se muestra una disminución de la actividad vertical, mientras que el Fe(TPPS) atenuó de manera significativa esta disminución para el caso del 3-NP.

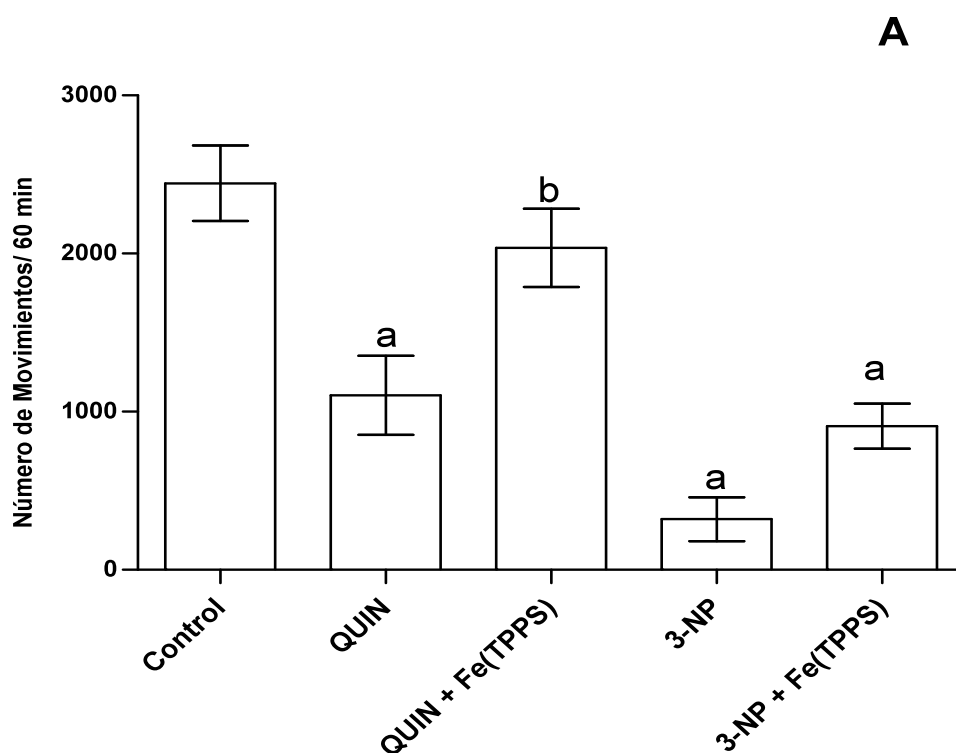


Figura 16 A

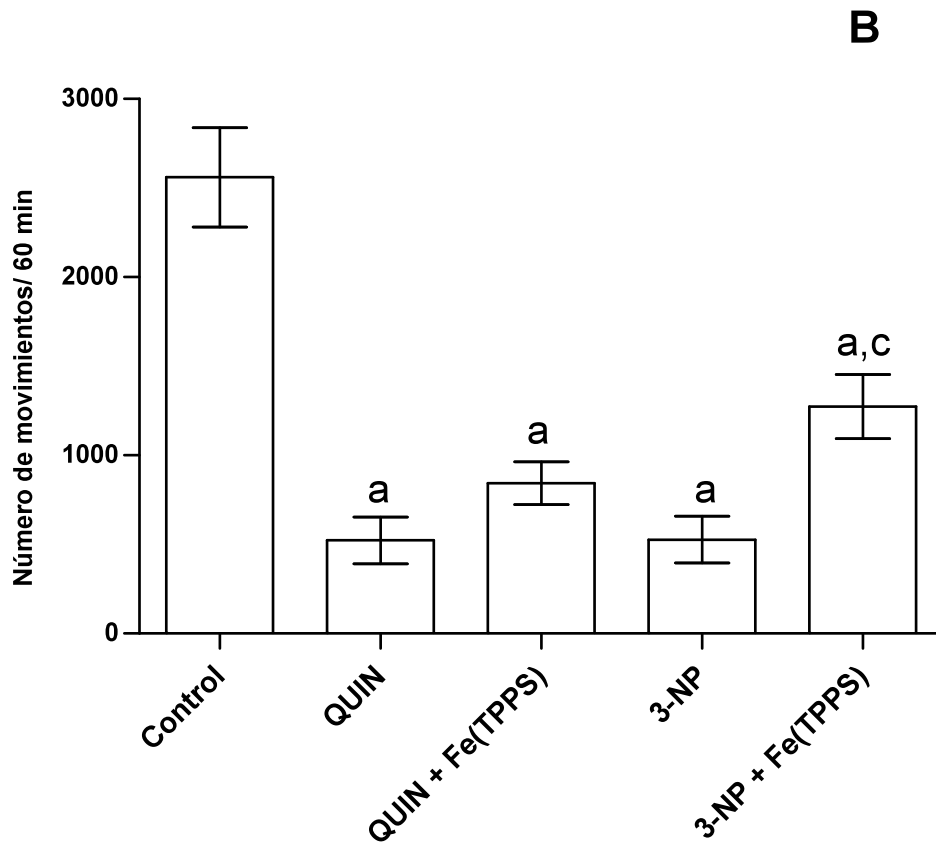


Figura 16. Efecto de QUIN y 3-NP sobre la actividad vertical de las ratas. En A y en B se muestra la actividad vertical obtenida 24 hrs y 7 días post-lesión, respectivamente. En ambos casos el Fe(TPPS) se administró 2 h antes de la lesión intraestriatal. Se presenta la media \pm SEM de seis experimentos por grupo. ^a $p < 0.01$, significativamente diferente del control, ^b $p < 0.01$, significativamente diferente de QUIN; ^c $p < 0.01$, diferente significativamente de 3-NP. ANOVA de una vía seguida de una prueba de Tukey.

9.4 Efecto del Fe(TPPS) en la lipoperoxidación evocada por QUIN y 3-NP.

La acción peroxidativa del QUIN y del 3-NP, así como el efecto del Fe(TPPS) sobre la LP inducida por las toxinas, se presentan en la Figura 17. En A se muestra un aumento en la PL, 24 h. después de la lesión con QUIN y un efecto protector al utilizar como pre-tratamiento al Fe(TPPS). En B, se observa un aumento significativo en los lípidos peroxidados evocado tanto por QUIN como por 3-NP a 7 días después de su administración. El Fe(TPPS) disminuyó por completo este marcador de daño oxidativo al ser administrado 2 h antes de la infusión con las toxinas.

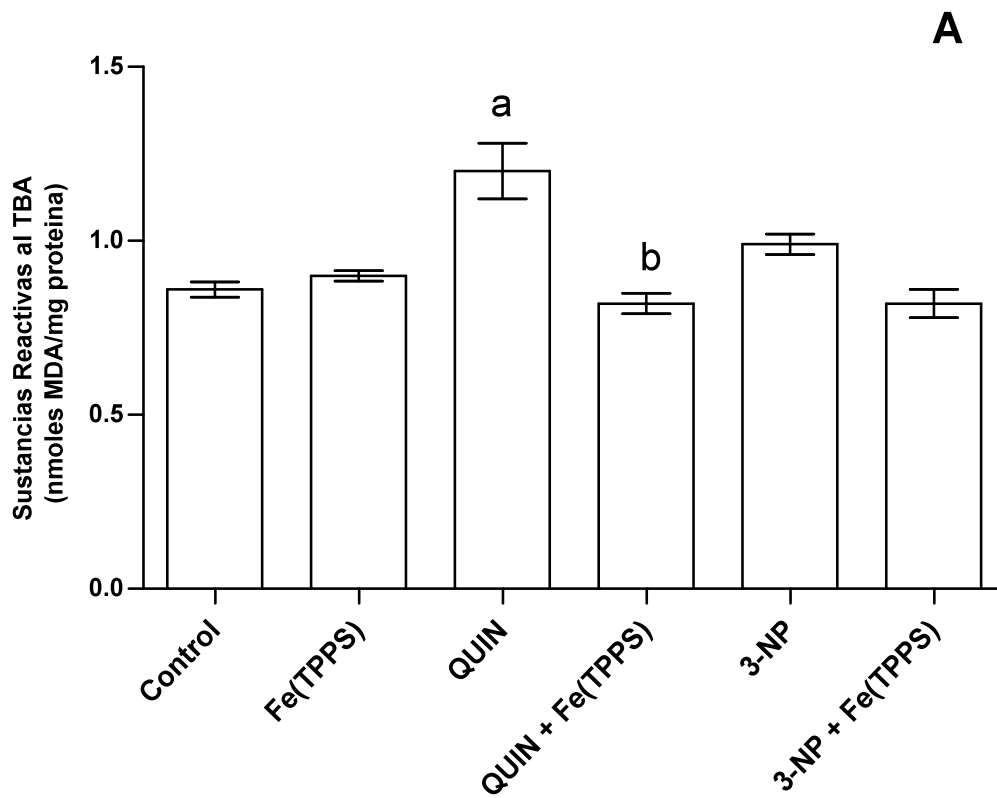


Figura 17A

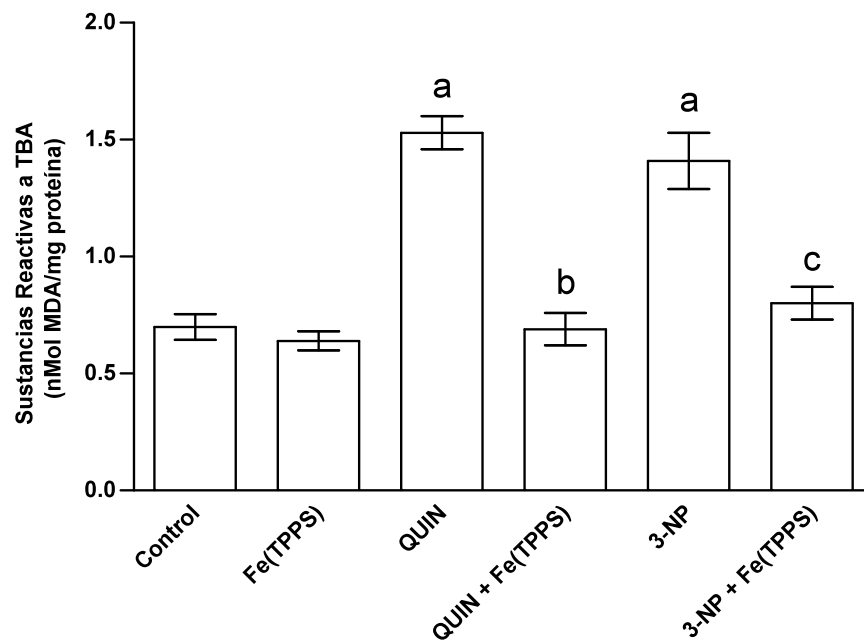
B

Figura 17. Efecto protector del Fe(TPPS) en la lipoperoxidación evocada por QUIN y 3-NP. En A y en B se muestra la PL obtenida 24 h y 7 días después de la lesión con las toxinas, respectivamente. En ambos casos el Fe(TPPS) se administró 2 h antes de la lesión intraestriatal. Se presenta la media \pm SEM de seis experimentos por grupo. ^a $p < 0.01$, significativamente diferente del control; ^b $p < 0.01$, significativamente diferente de QUIN; ^c $p < 0.01$, diferente significativamente de 3-NP. ANOVA de una vía seguida de una prueba de Tukey.

9.5 El Fe(TPPS) atenuó la disfunción mitocondrial evocada por QUIN y 3-NP

En la figura 18, se muestra el efecto del QUIN y el 3-NP sobre la funcionalidad mitocondrial. En A se observa una disminución en la reducción de MTT evocada 24 h después de la infusión con las toxinas. El catalizador de ONOO- mostró tener un efecto protector en la disfunción mitocondrial causada por el QUIN y el 3-NP. Siete días después de la lesión, los niveles en la reducción de MTT continúan disminuidos por las toxinas. El Fe(TPPS) únicamente es capaz de atenuar la disfunción mitocondrial en los animales lesionados con QUIN (Fig. 18B).

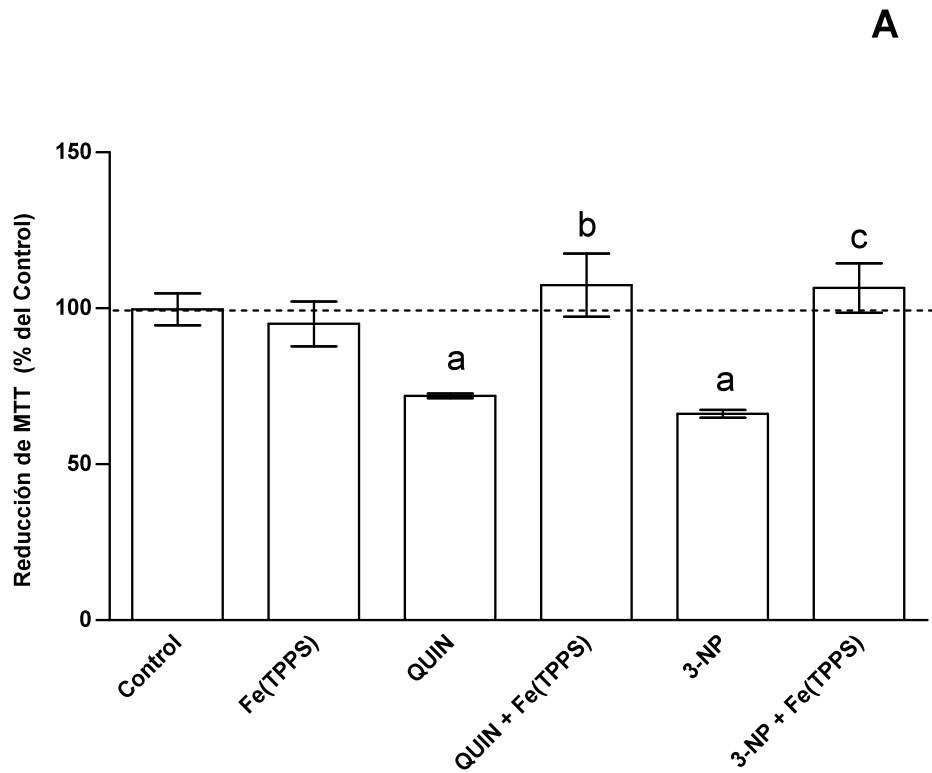


Figura 18A

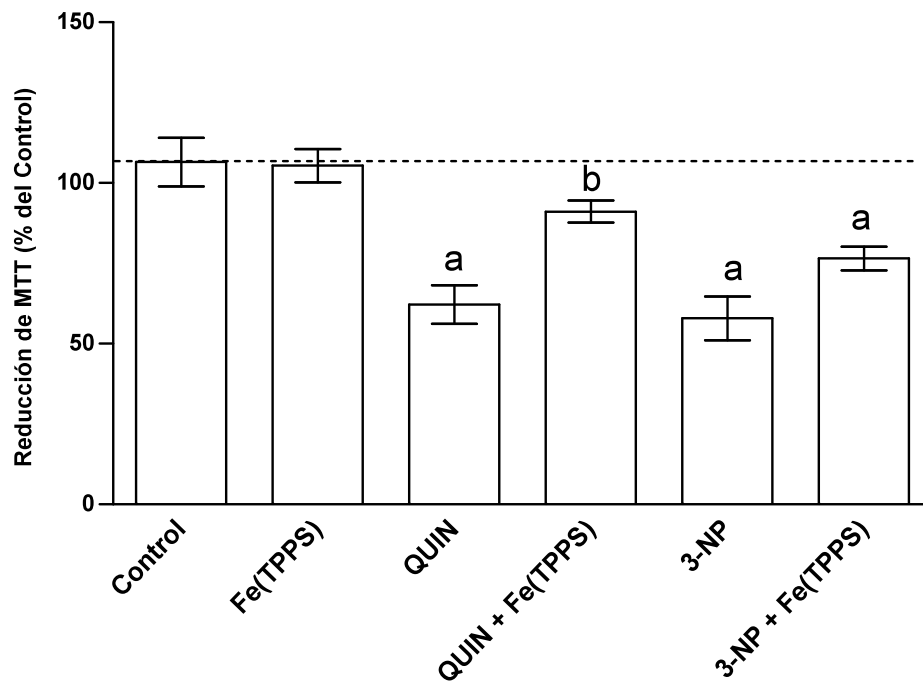
B

Figura 18. Posible participación del ONOO^- en la disfunción mitocondrial evocada por el QUIN y el 3-NP. En A y en B se muestra la funcionalidad mitocondrial obtenida 24 h y 7 días después de la lesión con las toxinas, respectivamente. En ambos casos, el Fe(TPPS) se administró 2 h antes de la lesión intraestriatal. Se presenta la media \pm SEM de seis experimentos por grupo. ^a $p < 0.01$, significativamente diferente del control; ^b $p < 0.01$, significativamente diferente de QUIN; ^c $p < 0.01$, diferente significativamente de 3-NP. ANOVA de una vía seguida de una prueba de Tukey.

10. Discusión

El QUIN y el 3-NP son toxinas con mecanismos de acción primarios diferentes, pero ambos involucran en algún momento tanto la excitotoxicidad como la alteración en el metabolismo energético, llevando de esta manera a la muerte celular. Recientemente, nuestro grupo caracterizó la formación de ONOO⁻ (a través de su biomarcador, la 3-nitrotirosina) en el daño neurotóxico evocado por el QUIN desde tiempos cortos (Pérez de la Cruz et al., 2005), estableciendo así que la producción de ONOO⁻ puede ser consecuencia de la activación de receptores para NMDA evocada por esta toxina, ya que reportes previos muestran que el QUIN es capaz de aumentar los niveles en la actividad de la sintasa del óxido nítrico, y por otra parte disminuye la actividad de la SOD, generando así el ambiente idóneo para la formación de esta especie (Pérez-De la Cruz et al., 2005; Schmidt et al., 1995). En el caso del 3-NP, como mecanismo primario, este agente conduce a la disfunción mitocondrial a través de la alteración en la función de la succinato deshidrogenasa, evento de a su vez conduce a la despolarización de la membrana, generando de esta manera una excitotoxicidad secundaria. En este paradigma también se ha caracterizado el aumento en los niveles de 3-nitrotirosina, evidenciando así la presencia de ONOO⁻ (Galpern et al., 1996).

En este estudio demostramos que la infusión intraestriatal bilateral de ambas toxinas produce un importante déficit motor a las ratas. En el caso de la administración intraestriatal de QUIN, encontramos una notable disminución en la actividad exploratoria evaluada a través de la actividad vertical, y de la misma manera se observó que la actividad motora general disminuyó (distancia total recorrida y actividad horizontal) tanto a las 24 h como a los 7 días post lesión; sin embargo, estos datos están en parcial discrepancia con algunos reportes previos que muestran que animales lesionados bilateralmente con QUIN se vuelven hiperactivos (Borlongan et al., 1997; Shear et al., 1998).

En el caso del 3-NP, se observó que tanto la conducta exploratoria como la motora se ven disminuidas a las 24 h y a los 7 días después de la lesión, llevando a la conclusión de que estos animales son hipocinéticos. Es importante mencionar que para este caso nuestros datos reproducen estudios previos de Koustouzis y colaboradores (1992), donde la infusión bilateral de 3-NP a altas dosis (500 y 750 nmoles) produjo patrones de hipoactividad en actividad locomotora espontánea en ratas Sprague-Dawley. En contraste, nuestros hallazgos no concuerdan con otros reportes previos de Shear y colaboradores (1998), quienes describieron que 2 semanas después de la infusión bilateral de QUIN (200 nmoles) ó 3-NP (700 nmoles), las ratas exhiben un aumento en los niveles de actividad motora, pero solo el QUIN fue capaz de mantener dicha actividad por más de 2 semanas. Estas alteraciones motoras fueron acompañadas de déficit en el aprendizaje y atrofia estriatal. En base a este estudio, sus autores concluyeron que el QUIN produce lesiones que corresponden más a los síntomas tempranos de la EH, mientras que el 3-NP produce cambios tempranos y tardíos de la EH, correspondientes más a la EH juvenil y las etapas tardías de la EH, respectivamente. Aunque hasta ahora no disponemos de una explicación del porqué de estas discrepancias entre los datos de Shear y los encontrados por nosotros y el grupo de Koutouzis, estas alteraciones bien podrían deberse a diferentes variables implicadas en la experimentación, tales como la dosis empleada de las toxinas, la cepa específica de animales utilizada, el tiempo de evaluación, los parámetros evaluados, etc.

Por su parte, el ONOO⁻ juega un papel importante en el daño evocado en ambos modelos, y teniendo en cuenta que esta especie puede llevar a la muerte celular, empleamos al Fe(TPPS) para evaluar la posible contribución de esta especie en las alteraciones conductuales, el daño oxidativo y la disfunción mitocondrial evocados por el QUIN y el 3-NP. Para el caso del QUIN, el Fe(TPPS) solo fue capaz de atenuar la actividad exploratoria a las 24 h después de la lesión, mientras que la PL y la disfuncionalidad evocada por el QUIN fue disminuida por este catalizador de ONOO⁻ a los dos tiempos probados, sugiriendo así que el ONOO⁻ está contribuyendo tanto al daño temprano como al tardío del QUIN; sin embargo, no debe descartarse que las alteraciones conductuales evocadas en este modelo también pueden deberse a procesos más complejos, involucrando por ejemplo la activación de factores de transcripción, o la inducción de vías alternas, como ha sido ya sugerido en otros estudios (Kells et al., 2008; Qin et al., 2000).

En relación al modelo de toxicidad por 3-NP, encontramos que a la dosis empleada de este agente no hubo un aumento significativo en la PL a las 24 h, pero sí a los 7 días post-lesión, misma que fue prevenida por el Fe(TPPS). En contraste, la capacidad reductora mitocondrial evocada por esta toxina disminuyó significativamente a los dos tiempos probados, pero dicho marcador únicamente fue disminuido por el Fe(TPPS) a las 24h post-lesión. Adicionalmente, se observó que el Fe(TPPS) solo fue capaz de atenuar la disminución en la conducta exploratoria a los 7 días después de la lesión, sugiriendo que el ONOO⁻ puede estar jugando un papel importante en la toxicidad del 3-NP a diferentes tiempos, aunque la atenuación de sus efectos sea limitada.

En resumen, nuestro estudio demuestra la participación activa del ONOO⁻ en el patrón de daño neuronal inducido por ambas toxinas en el cerebro de ratas. Los resultados obtenidos sugieren que la participación de esta especie se da de manera diferencial para estos modelos, a juzgar por la magnitud de los efectos del Fe(TPPS) y sus tiempos de acción. Para el caso del QUIN, esta especie parece estar involucrada más en el daño temprano. En contraste, para el caso del 3-NP, el involucramiento del ONOO⁻ parece obedecer más a una etapa tardía. Para poder afirmar lo que nos surgieren estos datos, se requieren estudios más detallados en relación a las vías que se ven alteradas con estas toxinas y cuales de ellas involucran directamente la formación de ONOO⁻.

11. Conclusiones

- El QUIN, a una dosis de 120 nmoles por estriado, disminuyó la actividad motora y exploratoria de la rata 24 h y 7 días después de la lesión.
- El Fe(TPPS) atenuó la disminución en la conducta exploratoria evocada por el QUIN solo a 24 h de la lesión.
- Las ratas tratadas con 3-NP (250 nmoles por estriado) se tornaron hipoactivas en ambas condiciones temporales.
- El Fe(TPPS) atenuó la conducta exploratoria solo 7 días después de la lesión.
- La PL y disfunción mitocondrial evocadas por el QUIN 24 h y 7 días después de la lesión fueron atenuadas por el Fe(TPPS).
- El 3-NP disminuyó la funcionalidad mitocondrial 24 h y 7 días después de la lesión, y aumentó la PL a los 7 días post-lesión.
- El Fe(TPPS) atenuó las alteraciones en los marcadores bioquímicos y energéticos evocados por el 3-NP en los tiempos probados.
- Los resultados obtenidos sugieren que la participación de ONOO⁻ se da de manera diferencial para estos modelos, a juzgar por la magnitud de los efectos del Fe(TPPS) y sus tiempos de acción. Para el caso del QUIN, esta especie parece estar involucrada más en el daño temprano, mientras que para el 3-NP parece obedecer más a una etapa tardía.

Participación del calcio intracelular en el daño oxidativo evocado por un modelo sinérgico (QUIN + 3-NP) de toxicidad

12. Excitotoxicidad y déficit energético

El déficit energético y la excitotoxicidad son dos eventos que se encuentran mutuamente relacionados en diferentes desórdenes neurodegenerativos; sin embargo, cual de estos dos factores es el que desencadena al otro, aun está en controversia. La excitotoxicidad neuronal involucra una elevación fisiológica de las concentraciones de Ca^{2+} intracelular en respuesta a una sobre exposición de aminoácidos excitadores como el glutamato. Un disturbio en el influjo de Ca^{2+} puede potenciar vías bioquímicas letales que involucran enzimas degradativas y/o incrementar la formación de RL, así como llevar a la disfunción mitocondrial (Rami et al., 1997). Además, la entrada masiva de Ca^{2+} a las terminales nerviosas puede aumentar la liberación de aminoácidos excitadores endógenos y propagar así el daño celular por una retroalimentación positiva, llevando a la célula a una muerte apoptótica o necrótica. Se sabe también que el SNC es especialmente vulnerable a las variaciones energéticas, debido tanto al elevado metabolismo que desarrollan las neuronas, como a la baja capacidad de almacenar sustratos ricos en energía. Las alteraciones en el suministro de sustratos ricos en energía provocan paralelamente cambios en la concentración intracelular y extracelular de iones, y con ellos en el potencial de membrana (Martín et al, 1994).

13. Potenciación de la excitotoxicidad por alteraciones en el metabolismo

La muerte neuronal por glutamato es influenciada por el estado energético de la célula, siendo que las concentraciones normales de glutamato llegan a ser tóxicas durante el déficit energético (Massieu et al., 2000; Del Rio et al., 2007; Novelli et al., 1988; Greene et al., 1998), causando la muerte celular a través de procesos conocidos como excitotoxicidad secundaria. Esta muerte celular resulta de la facilitación de apertura del receptor para NMDA. El potencial de membrana es mantenido a través de la actividad de las ATPasas Na^+/K^+ , la cual colapsa después, durante condiciones limitadas de producción de ATP, así como de desbalance glucolítico o del metabolismo energético, despolarizando así la membrana plasmática y causando la remoción del tapón de Mg^{2+} del receptor para NMDA y la consecuente activación de dicho receptor.

Diversos reportes han mostrado que la inhibición de la enzima glucolítica gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa por iodoacetato facilita el daño neuronal inducido por la inhibición del transportador de glutamato o por la administración de glutamato (Massieu et al., 2000; Mejia-Toiber et al., 2006). Estos mecanismos asociados con el incremento en la vulnerabilidad a la toxicidad por glutamato no han sido completamente elucidados; sin embargo, recientes estudios indican que el tratamiento con iodoacetato induce la disminución del contenido del transportador de glutamato GLT-1 e incrementa los niveles de fosforilación de la subunidad NR2B de los receptores para NMDA (Camacho et al., 2007). Estas observaciones están a favor de que una estrecha relación existe entre el metabolismo energético y la excitotoxicidad. Esto es apoyado por estudios en los que se muestra que la co-administración de una

concentración subumbral de malonato (un inhibidor mitocondrial) puede aumentar las lesiones producidas por aminoácidos excitadores tales como el L-glutamato, el NMDA o el AMPA, indicando así que el malonato incrementa la vulnerabilidad neuronal a los efectos excitotóxicos producidos por la estimulación del receptor para NMDA (Greene & Greenamyre, 1995). También, Bazzett y colaboradores (1996) sugirieron un efecto sinérgico en las lesiones producidas por la combinación de QUIN más malonato, y este efecto fue bloqueado por el MK-801, enfatizando la participación de los receptores para NMDA.

Adicionalmente, se ha demostrado resistencia a la toxicidad estriatal del malonato en neonatos PND7, lo que demuestra la falta de toxicidad intrínseca; sin embargo, la susceptibilidad a la neurotoxicidad por NMDA está bien documentada. Para estos casos, la diferencia en el desarrollo de la utilización energética puede contar como un factor por el cual se observa una susceptibilidad reducida a la toxicidad de malonato en neonatos PND7 (Maragos et al., 1995). Así, el Sistema Nervioso inmaduro puede no estar dependiendo enteramente del metabolismo oxidativo para satisfacer sus demandas de energía. Por ejemplo, en ratas neonatas, la inhibición de la glucólisis, pero no de la fosforilación oxidativa, reduce el tiempo de vida de estos animales expuestos a un ambiente anóxico (Himwich, 1985); sin embargo, a pesar de que el malonato no muestra toxicidad intrínseca, sí es capaz de aumentar la toxicidad del NMDA, y esto es debido a que muchas toxinas mitocondriales pueden ejercer su efecto tóxico activando indirectamente los receptores para NMDA y/o por la alteración de los mecanismo de intercambio de iones en la glia, lo cual conlleva a un incremento de aminoácidos excitadores en el espacio sináptico (Greene & Greenamyre, 1995, Henshaw et al., 1994; Riepe et al., 1995).

Por otra parte, se ha observado que la exposición crónica tanto a QUIN (4 mM) como a malonato (400 mM) produce un aumento en el volumen de lesión cuando ambas toxinas son administradas de manera conjunta, y este efecto es bloqueado al utilizar un antagonista de receptores para NMDA (Bazzett et al., 1996). Se ha observado también que la muerte neuronal por acumulación de glutamato y aspartato mediada por la inhibición de transportadores de glutamato es facilitada en el estriado de animales previamente tratados con 3-NP (García et al., 2001; Sánchez et al., 1999). Adicionalmente, se ha encontrado un efecto sinérgico entre el 3-NP y un medio libre de Mg^{+} , generando así una alteración en la función del receptor para NMDA (Greene et al., 1998).

Jacquard y colaboradores (2007) demostraron que la activación moderada de los receptores para NMDA por QUIN, combinada con alteraciones mitocondriales por 3-NP, pueden aumentar sinérgicamente la degeneración estriatal, la cual involucra primordialmente la desregulación del Ca^{2+} intracelular y sugiere la ausencia de hipersensibilización del receptor para NMDA por la toxina mitocondrial. Este grupo mostró que el QUIN incrementa los niveles de oligonucleosoma libre y el número de núcleos positivos a TUNEL en ratas tratadas previamente con 3-NP. Más aún, se dedujo que esta potenciación en la toxicidad de QUIN por el 3-NP estaba asociada con la alteración en los niveles de Ca^{2+} , y para comprobar esto se utilizó la actividad de calpainas como un índice de esta desregulación. Estas proteasas mostraron un incremento significativo en su actividad comparada con la de ratas no tratadas con toxinas.

En este contexto teórico, surge la inquietud de si los elementos de daño oxidativo en ese modelo sinérgico son susceptibles a elevados niveles de Ca^{2+} intracelular, y cual es el origen del mismo.

14. Hipótesis

Si la potenciación en el daño oxidativo dada en el modelo sinérgico de QUIN + 3-NP es dependiente de las concentraciones de Ca^{2+} intracelular, entonces el empleo de un secuestrador de calcio intracelular atenuará la PL presente en este modelo. El mayor aporte de Ca^{2+} intracelular debe corresponder a su liberación desde reservorios intracelulares.

15. Objetivos

15.1 Objetivo general

- Determinar la participación del Ca^{2+} intracelular en la potenciación del daño oxidativo evocado por la co-administración de QUIN y 3-NP a concentraciones subtóxicas.

15.2 Objetivos particulares

- Evaluar el efecto de un quelante de calcio intracelular (BAPTA) en la peroxidación de lípidos de terminales sinápticas expuestas a concentraciones subtóxicas QUIN y 3-NP (21 y 166.6 μM , respectivamente).
- Caracterizar el efecto del Fe(TPPS), el MK-801, la acetil L-carnitina y la SAC en la lipoperoxidación en sinaptosomas expuestos a las toxinas, con la finalidad de establecer mecanismos diferenciales de toxicidad.

16. Metodología

16.1 Materiales y animales

El 3-NP, el QUIN, el FeTPPS, el MK-801, el malonaldehído, y el 3-[4,5-dimetil-tiazol]-2,5-difenil tetrazolio bromuro (MTT) fueron de Sigma Chemical Company. La acetil L-carnitina y la SAC fueron amablemente donados por los Doctores Ali y Maldonado (coautores en las publicaciones). Los reactivos grado reactivo y fueron de casas comerciales conocidas. Las soluciones fueron preparadas usando agua desionizada obtenida de un sistema purificador Direct-Q (Millipore). Para la obtención de las fracciones sinaptosomales, se empelaron ratas Wistar macho de 250-300 g.

16.2 Preparación de sinaptosomas

Para los experimentos se utilizaron fracciones sinaptosomales, las cuales fueron obtenidas de cerebro completo de ratas por centrifugaciones diferenciales, con modificaciones discretas a métodos previamente reportados (Dodd et al., 1981; Santamaría et al., 2003; Pérez-de la Cruz et al., 2005). Brevemente, las ratas fueron decapitadas y los cerebros completos de estas fueron homogenizados en sacarosa 0.32 M y centrifugados a 1,073 x g por 10 min. El sobrenadante fue re-centrifugado a 17,172 x g por 15 min. Posteriormente, se resuspendió el pellet en un buffer de HEPES (NaCl 0.1 M, NaH₂PO₄ 0.001 M, NaHCO₃ 0.005 M, CaCl₂ 0.001 M, glucosa 0.006 M y HEPES 0.01 M, pH 7.4). Las fracciones sinaptosomales fueron preservadas a -72°C.

16.3 Determinación de peroxidación de lípidos en sinaptosomas

La PL en terminales sinápticas de cerebros completos de rata fue estimada por la producción de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), de acuerdo con reportes previos (Santamaría et al., 1999). Doscientos cincuenta µL de sinaptosomas se incubaron con concentraciones sub-tóxicas previamente calculadas de las toxinas 3-NP (166.6 µM) y QUIN (21 µM)), y concentraciones crecientes de MK-801, Fe(TPPS), acetil L-carnitina y SAC (0-1000 µM) (volumen final de 500 µL) a 37°C durante 60 min. Después de la incubación, se adicionaron 500 µL del reactivo TBA (0.75g de TBA + 15 g de ácido tricloroacético + 2.54 de HCl concentrado). La solución final fue puesta en un baño de ebullición (94°C) durante 30 min. Posteriormente, las muestras fueron puestas en hielo y centrifugadas a 3,000 g por 15 min, y la densidad óptica del sobrenadante fue determinada con un espectrofotómetro Genesys 8 a una longitud de onda de 532 nm. La concentración de TBARS fue calculada por la interpolación sobre una curva estándar de malonaldehído. Los resultados fueron expresados en nmoles de TBARS por mg de proteína.

16.4 Estimación de la participación del calcio intracelular

El BAPTA-AM, un conocido quelante de Ca²⁺ intracelular (Niesen *et al.*, 1991; Abdel-Hamid & Tymianski, 1997), fue empleado para estimar la participación de Ca²⁺ intracelular en el daño oxidativo. Los sinaptosomas fueron pre-incubados con BAPTA-AM (100 µM) durante 30 min a 37°C; pasado el

tiempo de incubación, se adicionaron las toxinas y el Fe(TPPS), el MK-801, la SAC y la acetil L-carnitina en el rango de concentraciones antes mencionado, y se continuó con la técnica de TBARS antes mencionada.

16.5 Análisis estadístico

Todos los resultados fueron expresados como valores promedio \pm S.E.M. A los datos se les aplicó un análisis de varianza de una vía seguido de la prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples de medias, utilizando el software Prism 3.02 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

17. Resultados

17.1 Efecto sinérgico de la co-administración de 3-NP (166.6 μ M) + QUIN (21 μ M) en la peroxidación de lípidos. Atenuación parcial por el MK-801

La Figura 19A nos muestra un aumento del 20% en la PL al adicionar QUIN, del 33% al adicionar 3-NP, y del 76% al adicionar ambos. Estos datos sugirieron un efecto sinérgico en los componentes de daño oxidativo evocados por dichas toxinas. También se puede observar una disminución en el daño oxidativo en presencia de un antagonista de receptores para NMDA (MK-801) de manera concentración dependiente (10-500 μ M), aunque a concentraciones mayores el efecto de este antagonista se vuelve inespecífico.

En la Figura 19B se observan los resultados en un medio libre de calcio. La PL evocada por el QUIN y el e-NP de manera independiente fue de 10 % y 30 % vs. el control, respectivamente. El incremento en la PL por la coadministración de QUIN+3-NP fue del 49 %, lo que sugiere un efecto de aditividad. Interesantemente, en este medio sin calcio extracelular, el MK-801 no muestra tener un efecto significativo sobre la PL inducida por QUIN + 3-NP. Las concentraciones de 750 y 1000 μ M de este agente fueron inespecíficas en este modelo experimental.

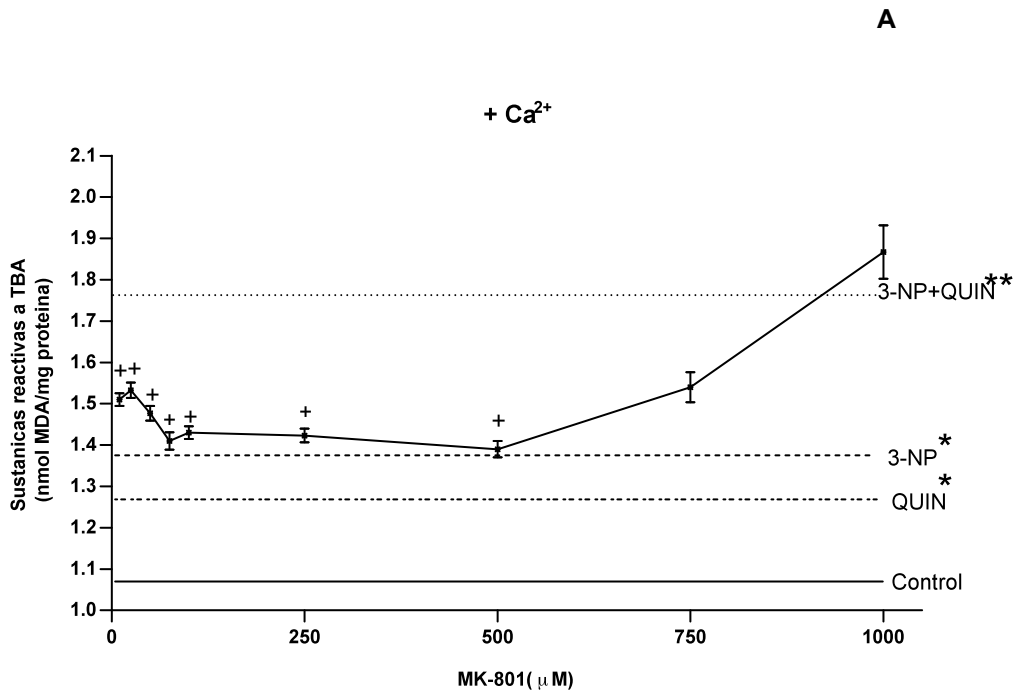


Figura 19A

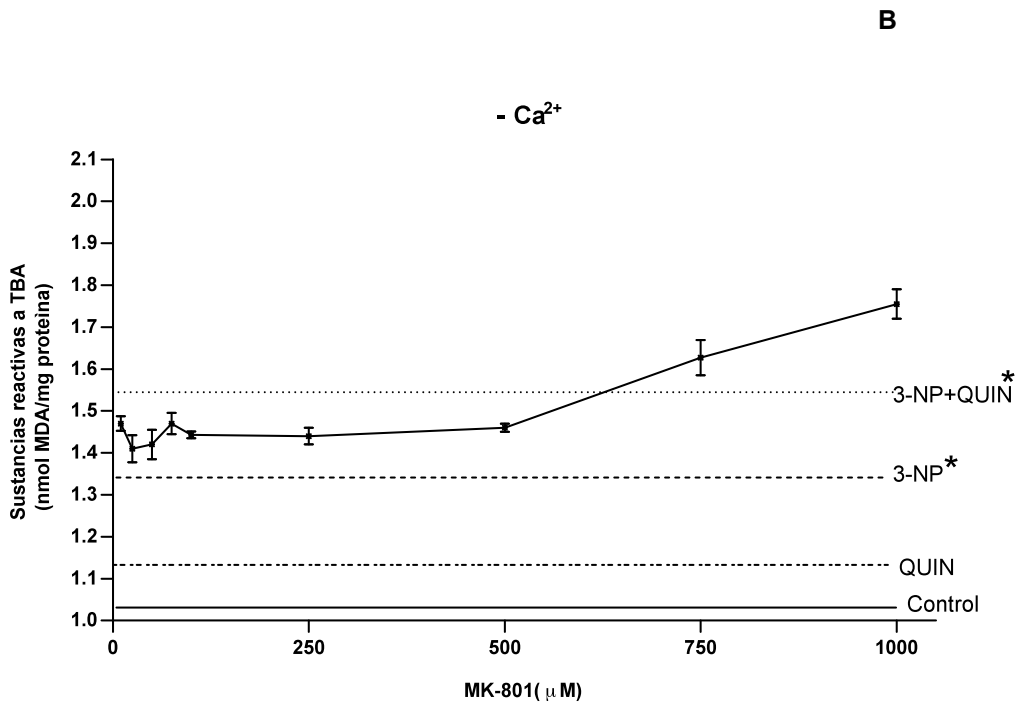


Figura 19. Efecto sinérgico en la PL por la coadministración de QUIN + 3-NP. Curva concentración respuesta de MK-801 (10-1000 µM). En A, los sinaptosomas fueron incubados en un medio que contenía Ca²⁺ a concentraciones fisiológicas. En B, las fracciones sinaptosomales fueron incubadas en un medio privado de Ca²⁺. En ambas graficas se presenta la media ± SEM de seis experimentos por grupo. *p<0.05 y **p<0.01, significativamente diferentes del control; †p<0.01, significativamente diferente de QUIN+3-NP.

17.2 ALCAR atenuó la PL inducida por QUIN + 3-NP de manera concentración dependiente, en presencia y ausencia de calcio extracelular

En la figura 20A podemos observar el efecto protector de ALCAR en el daño oxidativo evocado por QUIN + 3-NP. Este precursor energético y agente antioxidante disminuyó significativamente la PL de manera concentración dependiente, siendo su máximo efecto obtenido a una concentración de 1000 μM . La ausencia de Ca^{2+} en el medio extracelular disminuyó el efecto en la PL inducido por QUIN + 3-NP (49 % vs. control) y la ALCAR mostró ser más efectiva en estas condiciones, ya que a la concentración de 1000 μM disminuyó la PL (Figura 20B).

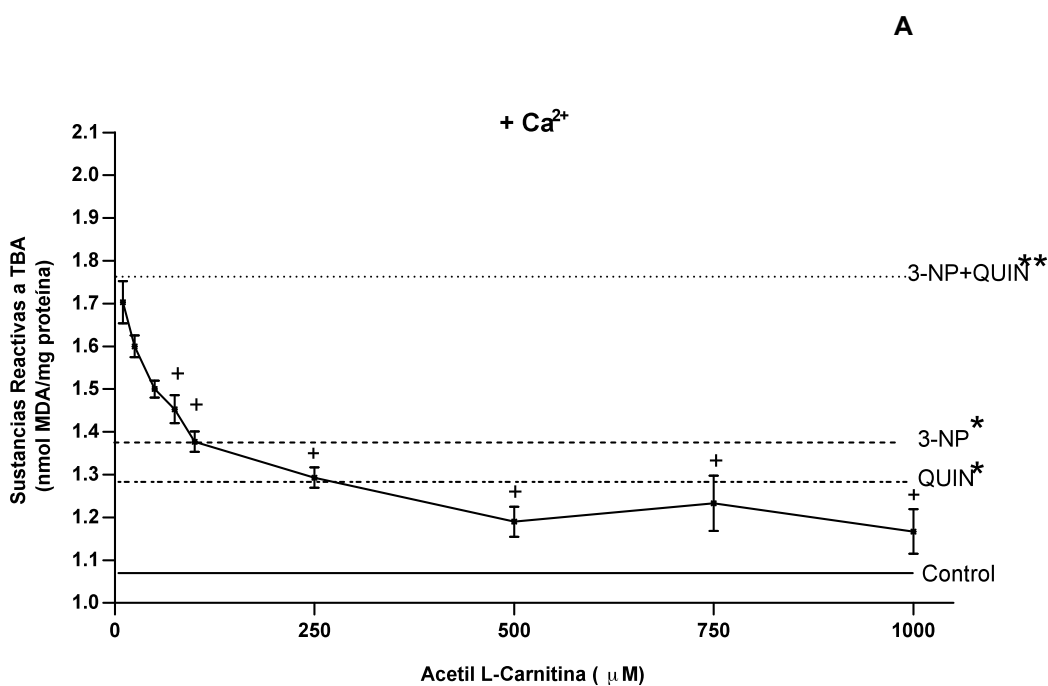


Figura 20 A

B

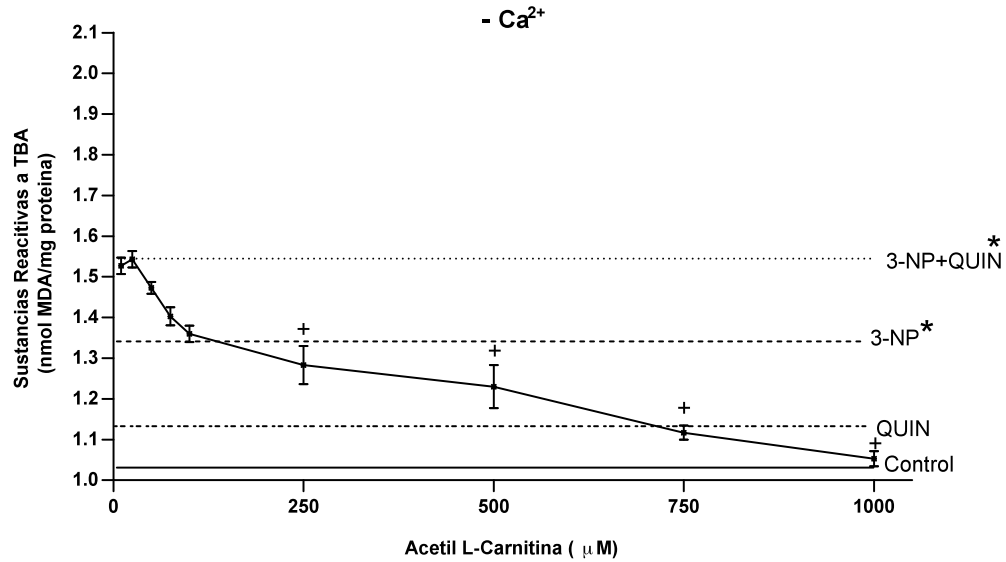


Figura 20. Curva concentración respuesta de ALCAR (10-1000 μM) en la PL inducida por la co-administración de QUIN+3-NP. En A, los sinaptosomas fueron incubados en un medio con Ca^{2+} a concentraciones fisiológicas. En B, las fracciones sinaptosomales fueron incubadas en un medio deprivado de Ca^{2+} . En ambas graficas se presenta la media \pm SEM de seis experimentos por grupo. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$, significativamente diferentes del control; $^+p < 0.01$, significativamente diferente de QUIN+3-NP.

17.3 El FeTPPS disminuyó el daño oxidativo evocado por la co-administración de QUIN+3-NP

El catalizador de la descomposición de ONOO⁻ disminuyó la PL inducida por la co-administración de QUIN + 3-NP desde las concentraciones más bajas empleadas, sugiriendo así la participación del ONOO⁻ en este patrón de daño oxidativo (Fig. 21A). En la figura 21B podemos observar un comportamiento similar del Fe(TPPS) al de la gráfica anterior, disminuyendo también la PL de manera concentración dependiente. Sin embargo, en ambos casos, las concentraciones de 750 y 1000 μM de Fe(TPPS) interfieren con la técnica espectrofotométrica empleada.

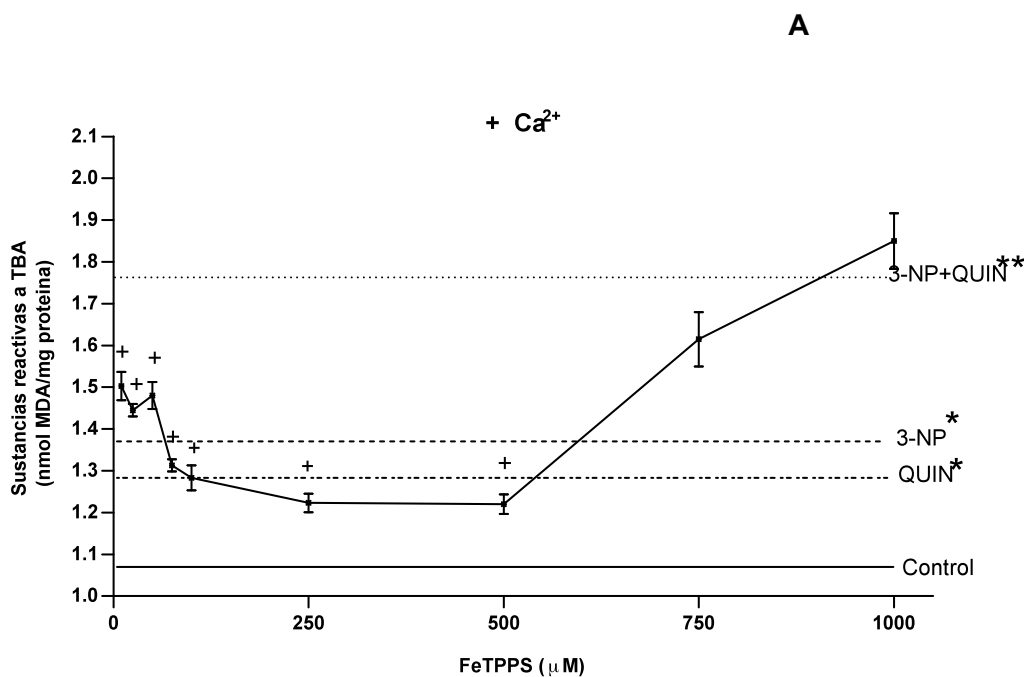


Figura 21 A

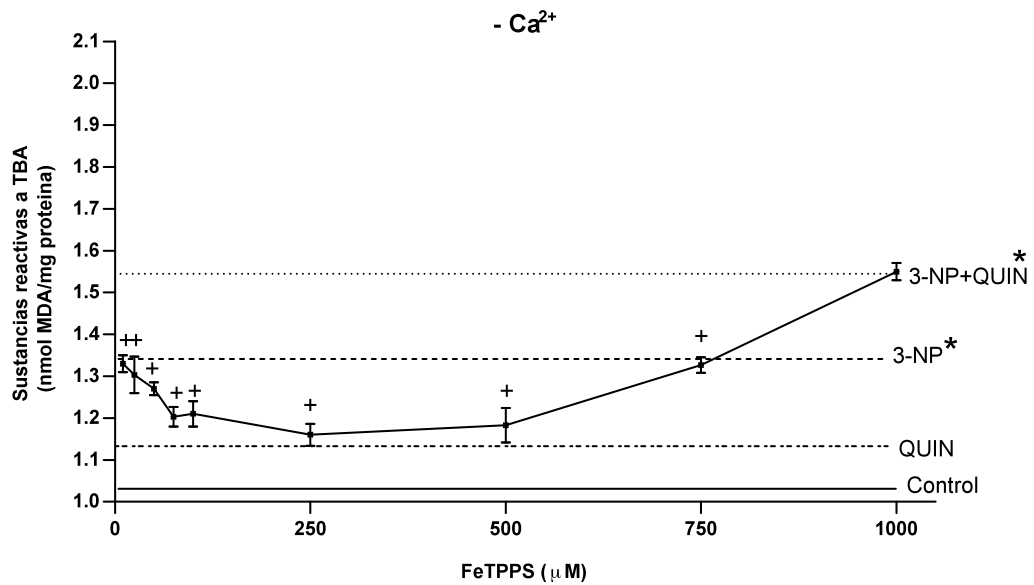
B

Figura 21. Efecto del Fe(TPPS) en la PL inducida por la co-administración de QUIN+3-NP. En A, los sinaptosomas fueron incubados en un medio con Ca^{2+} a concentraciones fisiológicas. En B, las fracciones sinaptosomales fueron incubadas en un medio privado de Ca^{2+} . En ambas gráficas se presenta la media \pm SEM de seis experimentos por grupo. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$, significativamente diferentes del control; + $p < 0.01$, significativamente diferente de QUIN+3-NP.

17.4 Efecto de la SAC sobre la PL inducida por QUIN + 3-NP

En la figura 22 se muestra el efecto de la SAC, un conocido atrapador de radicales libres e inductor de respuestas antioxidantes, sobre el daño oxidativo evocado por la co-administración de las toxinas. Se observó que en un medio con Ca^{2+} , la SAC disminuyó significativamente la PL inducida por la condición QUIN+3-NP a partir de la concentración de 500 μM (Fig 22A), mientras que dicho efecto lo alcanza más rápidamente en un medio sin Ca^{2+} (a partir de la concentración de 50 μM) (Fig. 22B).

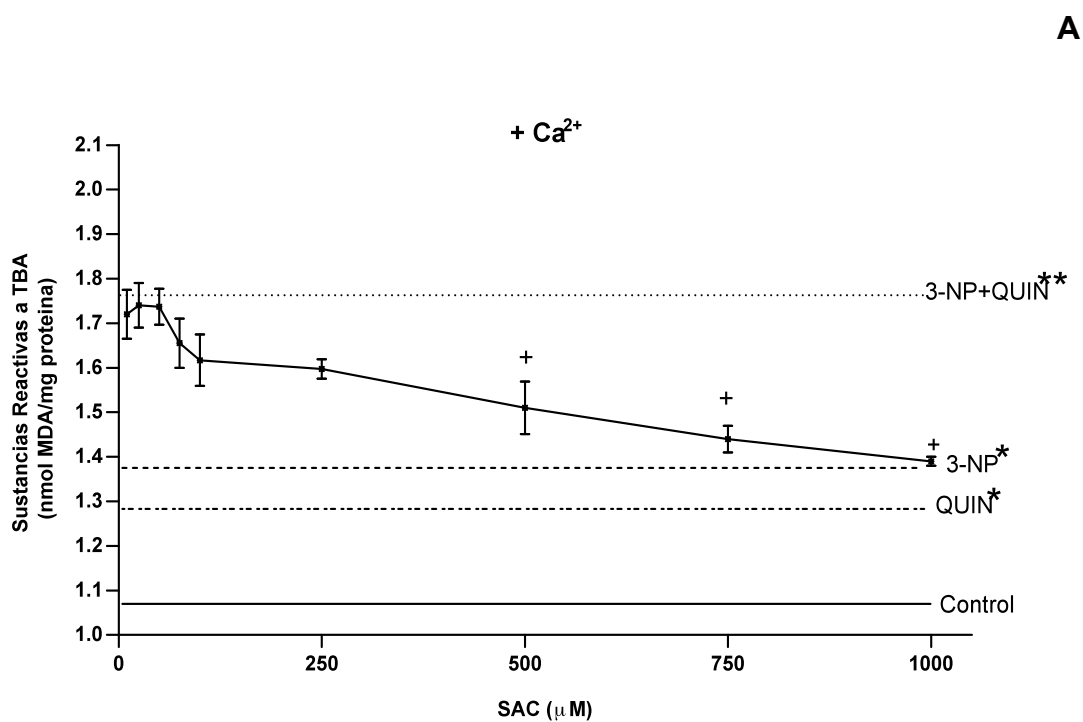


Figura 22 A

B

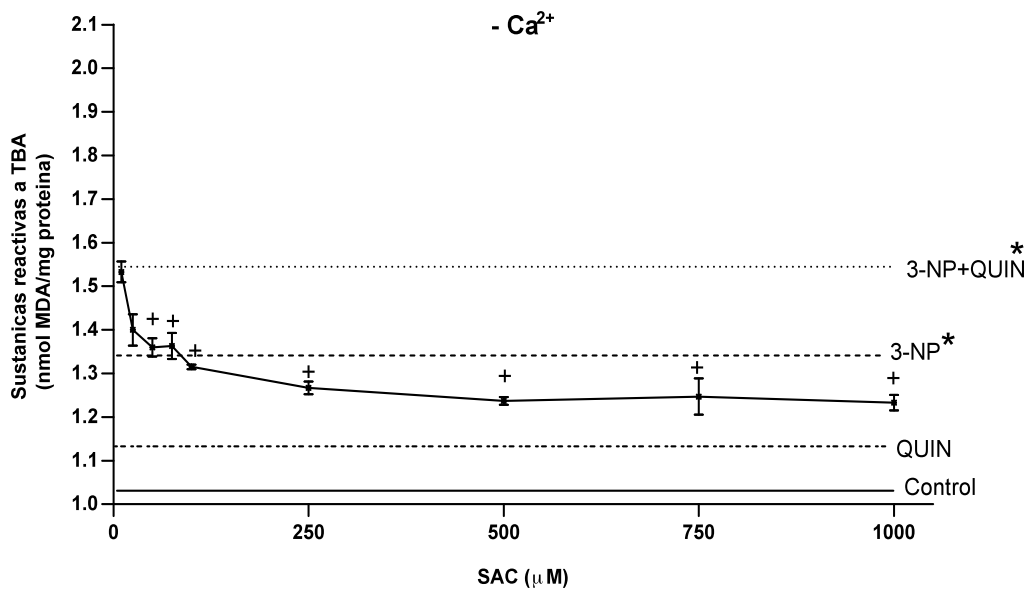


Figura 22. Efecto de la SAC en la PL inducida por la co-administración de QUIN+3-NP. En A, los sinaptosomas fueron incubados en un medio que contenía Ca^{2+} concentraciones fisiológicas. En B, las fracciones sinaptosomales fueron incubadas en un medio privado de Ca^{2+} . En ambas gráficas se presenta la media \pm SEM de seis experimentos por grupo. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$, significativamente diferentes del control; + $p < 0.01$ significativamente diferente de QUIN+3-NP.

17.5 Efecto del BAPTA-AM sobre la PL inducida por QUIN + 3-NP

La Figura 23 muestra el efecto de BAPTA-AM (10 μ M), un conocido quelante de calcio intracelular, en la PL evocada por QUIN + 3-NP en fracciones sinaptosomales. La adición de BAPTA al medio de incubación disminuyó en 14 % y 1% la PL inducida por el 3-NP y el QUIN, respectivamente, cuando son administrados de manera independiente. El aumento en la PL inducido por la co-administración de estas toxinas fue disminuido en un 35 % por BAPTA-AM.

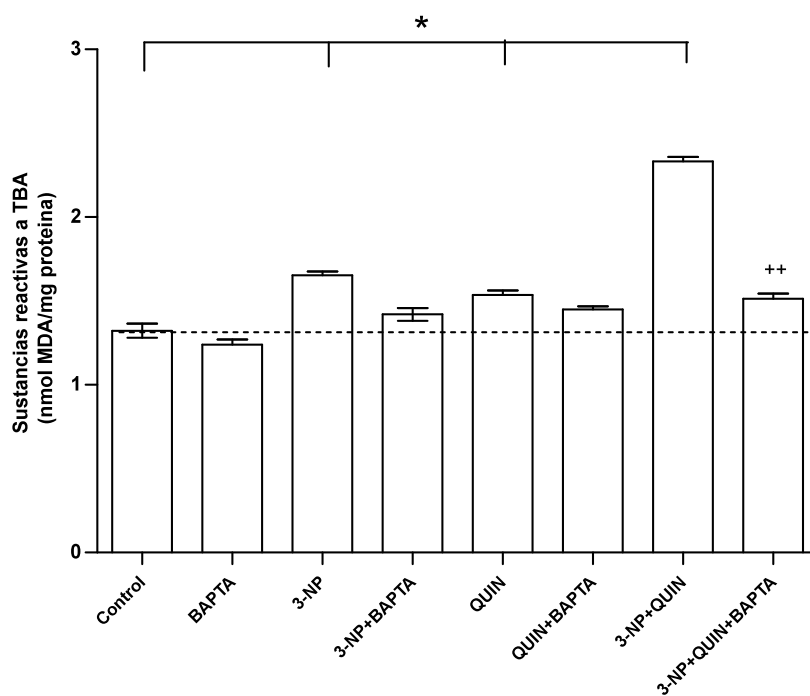


Figura 23. Efecto del BAPTA-AM en la PL evocada por QUIN + 3-NP en fracciones sinaptosomales. Se presenta la media \pm SEM de seis experimentos por grupo. * $p < 0.01$, significativamente diferente del control; ++ $p < 0.01$, significativamente diferente de QUIN+3-NP.

18. Discusión

El defecto en la función mitocondrial ha sido implicado como un factor que contribuye a la degeneración neuronal en numerosos desórdenes neurodegenerativos (Albin & Greenamyre, 1992; Beal, 1992; Beal, 1997). La hipótesis del déficit energético (hipótesis mitocondrial) propone que un metabolismo energético neuronal comprometido vuelve a las células vulnerables a concentraciones normales o elevadas de aminoácidos excitatorios endógenos por aumento de la activación de receptores para NMDA (Albin & Greenamyre, 1992; Beal, 1992; Beal, 1997). Adicionalmente, se cree que el Ca^{2+} es el responsable de eventos neurodegenerativos durante la ocurrencia de episodios de excitotoxicidad y déficit energético. Dentro de las consecuencias de este proceso se encuentra el daño oxidativo, el cual afecta a un considerable número de sustratos biológicos; sin embargo, el origen de dicho calcio no está del todo claro; es decir, si proviene del medio extracelular o de los reservorios intracelulares (mitocondria, retículo endoplásmico, etc.). Un reporte reciente de Jacquard y colaboradores (2006) establece que la potenciación excitotóxica mediada por receptores para NMDA a través de alteraciones mitocondriales involucra a nivel mecanístico la falta de regulación del Ca^{2+} intracelular en ausencia de hipersensibilidad del mismo receptor. Para este trabajo, nosotros evaluamos la participación del Ca^{2+} extracelular en el daño oxidativo evocado por el QUIN y el 3-NP a través de un medio con Ca^{2+} y un medio libre de Ca^{2+} , encontrando que el daño peroxidativo producido por la acción sinérgica del QUIN + 3-NP en fracciones sinaptosomales es aproximadamente 25 % mayor en un medio con calcio que en un medio libre de Ca^{2+} . Al emplear MK-801, un antagonista selectivo de receptores para NMDA, se observó una disminución de la PL (30 %) en comparación con la condición QUIN + 3-NP, sugiriendo que el calcio intracelular juega un papel crucial en dicho efecto. En este punto, es importante señalar que el QUIN ejerció un efecto de aditividad con el 3-NP en un medio libre de Ca^{2+} , y si consideramos que la mayor parte del daño evocado por el QUIN es a través de receptores para NMDA y la consecuente entrada de Ca^{2+} extracelular a las células, entonces la posible explicación a estos datos podría estar relacionada con un aumento en la permeabilidad a otros iones con efectos despolarizantes/excitotóxicos (tales como el sodio) vía los receptores para NMDA. A este respecto, el sustento para dicha hipótesis descansa en evidencia que demuestra que un aumento en el sodio intracelular conlleva a la liberación de Ca^{2+} de los reservorios intracelulares (Lowe et al., 1976), y si se razona el hecho de que el canal acoplado al receptor para NMDA es también permeable a sodio, esta idea cobra más sustento.

Para corroborar la participación del calcio intracelular en este modelo, y su contribución al daño peroxidativo, diseñamos una serie experimental empleando como fármaco de prueba el BAPTA-AM (quelante de Ca^{2+} intracelular). Nuestros resultados mostraron que el daño oxidativo en la condición QUIN + 3-NP es disminuído en un 38 % en presencia del quelante. Estos datos sugieren que al ser la mitocondria el mayor compartimiento intracelular de control y manejo de Ca^{2+} , entonces la disfunción mitocondrial promovida por el 3-NP puede causar una disminución en el secuestro de Ca^{2+} , conduciendo así a una sobrecarga de calcio citoplásmico que finalmente nos llevaría a una generación de ERO y ERN, activación de proteasas y muerte neuronal, efectos todos que se verían potenciados por el QUIN, el cual no es únicamente una excitotoxina, sino también un comprobado agente pro-

oxidante. Esta idea es apoyada por las observaciones de Jacquard y colaboradores (2006), quienes mostraron que la activación de calpainas en un modelo sinérgico de toxicidad *in vivo* por QUIN + 3-NP resulta de una disminución en la capacidad neuronal de modular el incremento en las concentraciones de Ca^{2+} citosólico más que por el incremento de la entrada de Ca^{2+} extracelular *per se*.

Participación de ERO/ERN en la peroxidación de lípidos evocada por la coadministración de QUIN + 3-NP

En 1987, Hamilton y Gould especularon sobre la posibilidad de que la excitotoxicidad mediada por glutamato podía jugar un papel importante en la degeneración estriatal mediada por 3-NP. Desde que esta hipótesis fue sugerida, mecanismos de toxicidad de 3-NP han sido asociados con la excitotoxicidad. Numerosos estudios en cultivos primarios neuronales, bajo circunstancias experimentales específicas, sugieren que el bloqueo del metabolismo energético puede llevar de manera secundaria a un aumento en la cascada excitotóxica de muerte celular, y este fenómeno involucra invariablemente a los receptores para NMDA. Al respecto, se ha encontrado que la inyección intraestriatal de toxinas mitocondriales (MPP⁺, malonato, rotenona, etc.) produce lesiones excitotóxicas similares a las de agonistas de receptores para NMDA (NMDA y quinolinato), y que este efecto puede ser bloqueado por la administración de antagonistas para receptores NMDA tales como el MK-801 (Brouillet et al., 1999; Greene & Greenamyre, 1996). Estos resultados, combinados con las observaciones sobre un déficit en el metabolismo energético en pacientes con diferentes enfermedades neurodegenerativas, sugieren que las anomalías metabólicas observadas en dichos padecimientos pueden resultar en la activación indirecta de la cascada de excitotoxicidad (Albin & Greenamyre, 1992; Beal, 1992).

Por otra parte, se sabe que el QUIN, un metabolito endógeno de la vía de la kinurenina generado en las células gliales, además de activar a los receptores para NMDA también es un agente pro-oxidante, y esta propiedad no depende completamente de la activación de los receptores para NMDA. El QUIN produce un incremento en la generación de $\bullet\text{OH}$ y parte de su daño oxidativo es mediado por la generación de ONOO⁻. Por su parte, el 3-NP es una toxina mitocondrial cuyo mecanismo primario de toxicidad involucra la inhibición de la succinato deshidrogenasa, una enzima localizada en el interior de la membrana mitocondrial y responsable de la oxidación del succinato a fumarato, llevando así a la reducción de la síntesis de ATP y a la muerte neuronal (Túnez et al., 2004; Coles et al., 1979). El 3-NP, bajo condiciones *in vitro*, altera la homeostasis del Ca^{2+} , involucrando a la muerte celular por excitotoxicidad a través de un proceso de generación de RL (Lafon-Cazal et al., 1993; Fudaka et al., 1997; Alexi et al., 1998). En este contexto, el papel del estrés oxidativo en el daño neuronal inducido por el 3-NP ha sido ampliamente descrito, dando sustento a esta hipótesis (La Fontaine, 2000; Teunissen, 2002). Estos hallazgos, en conjunto, sugieren que el estrés oxidativo puede ser un importante mediador en la producción del daño neuronal inducido por el 3-NP y el QUIN.

Se ha demostrado que la exposición a QUIN + 3-NP tiene un efecto sinérgico en diferentes marcadores de daño, como lo es en este caso el daño oxidativo. Así, la pérdida parcial del potencial de membrana y de la actividad mitocondrial son mediadores de alteraciones en la fosforilación oxidativa

(García & Massieu, 2003; Nasr et al., 2003). Estos eventos generalmente van acompañados por una pérdida de la homeostasis de Ca^{2+} intracelular y una excesiva producción de RL. Nuestros resultados demuestran claramente la participación activa del ONOO^- en este modelo sinérgico, dado que el $\text{Fe}(\text{TPPS})$, un catalizador selectivo de su descomposición, disminuyó la PL inducida por la co-administración de QUIN + 3-NP. La formación de ONOO^- se da básicamente por la reacción del ON con el $\text{O}_2^{\cdot -}$. Es importante mencionar que ambas moléculas pueden ser aportadas por la sintasa del ON, la cual puede a su vez ser estimulada por el incremento intracelular de Ca^{2+} . A este respecto, la SAC, un antioxidante general, fue capaz de atenuar en menor grado la PL inducida por las toxinas que el mismo $\text{Fe}(\text{TPPS})$, sugiriendo así que entre los mecanismos de daño oxidativo en este modelo, bajo nuestras condiciones experimentales, el ONOO^- bien puede ser especulado como un factor causal específico por encima de otras ERO/ERN.

Por otra parte, la ALCAR, un conocido agente antioxidante y precursor energético, disminuyó el daño oxidativo causado por la condición QUIN + 3-NP, sugiriendo que ambos elementos, la formación de ERO/ERN y el déficit en el metabolismo energético, están involucrados simultáneamente en dicho modelo.

En suma, nuestros datos sugieren que la inhibición moderada de la SDH por 3-NP y los efectos sub-tóxicos del QUIN son ambos potenciados cuando las dos toxinas se encuentran actuando sinérgicamente, y que el Ca^{2+} intracelular juega un rol activo en el daño oxidativo evocado por esta co-administración. La PL fue eficazmente atenuada por $\text{Fe}(\text{TPPS})$, SAC y mayormente por ALCAR, sugiriendo que a través de estos elementos de protección, la función mitocondrial bien podría estar siendo preservada para mantener el status energético necesario y hacer frente a los insultos tóxicos probados. De esta manera, hemos dado sustento a los mecanismos que subyacen al daño oxidativo neuronal en modelos de la EH.

19. Conclusiones

1. Los resultados obtenidos sugieren que la pérdida de la homeostasis de Ca^{2+} intracelular por la co-administración de 3-NP + QUIN conlleva a una excesiva generación de RL y al consecuente daño oxidativo.
2. El empleo de un precursor energético y antioxidante, como la ALCAR evidenció la apreciación de la primera conclusión, y generó un cuadro protector más efectivo que el evocado por el catalizador de ONOO- (Fe(TPPS)) y el antioxidante general (SAC).
3. Se sugiere la participación del ONOO- en la LP evocada por el modelo sinérgico dado que el Fe(TPPS) y la SAC atenuaron el efecto en dicho marcador.
4. Estudios más detallados a este respecto son necesarios para evidencias con mayor sustento el potencial tóxico del Ca^{2+} intracelular en este modelo de daño excitotóxico/energético combinado.

Participación de proteasas en el daño oxidativo, energético, y la muerte celular evocados por un modelo sinérgico de daño por la condición QUIN + 3-NP

20. Muerte celular

A principios de los años 70, Kerr, Wyllie y Curie encontraron que en las células se podían observar dos tipos diferentes de muerte: la bien caracterizada necrosis y una nueva forma, morfológicamente distinta, a la que llamaron apoptosis (Kerr et al., 1972; Wyllie et al., 1981). En la necrosis, un grupo de células expuestas a estímulos externos pierden la integridad de la membrana, alterando la regulación de la homeostasis iónica celular y permitiendo un gran edema intracelular seguido por la destrucción de organelos; como consecuencia se produce una intensa respuesta inflamatoria.

En contraste, durante el proceso de la apoptosis, la célula se vuelve más compacta y aparecen una gran cantidad de invaginaciones en la membrana citoplasmática. Dichas invaginaciones finalmente acaban dando lugar a los cuerpos apoptóticos, en los cuales quedan reclusos tanto los restos del citoplasma como los restos de los distintos organelos celulares. Por su parte, la cromatina empieza a condensarse y finalmente el DNA se fragmenta en fracciones definidas. Así, la apoptosis es un proceso activo dependiente de ATP que conlleva, por parte de la célula, a la síntesis de nuevo RNAm, así como de nuevas proteínas que participan en el proceso. Típicamente, la célula se observa heteropícnótica; es decir, condensada y con un núcleo fragmentado y de pequeño tamaño. Finalmente los cuerpos apoptóticos, los cuales están compuestos de citoplasma, organelos, y también algunos fragmentos nucleares siempre rodeados por una membrana, serán fagocitados por células que los rodean, evitando así cualquier tipo de respuesta inflamatoria.

En el caso del Sistema Nervioso, y en particular de las neuronas, la apoptosis es el tipo de muerte celular programada responsable de la eliminación fisiológica de poblaciones celulares que durante el desarrollo embrionario no han establecido las conexiones adecuadas, o bien, no disponen de los suficientes factores tróficos para poder llevar a cabo sus funciones (Wyllie, 1988). Siendo así, la apoptosis puede ser conceptualizada como un proceso fisiológico necesario para la maduración del SNC.

Interesantemente, una misma neurona puede activar distintas vías apoptóticas en respuesta a diferentes estímulos (Pettmann & Henderson, 1998). La decisión de morir de una célula entonces dependerá de la localización subcelular de los miembros de la familia Bcl-2, los receptores de muerte, y la presencia y/o activación de señales anti-apoptóticas. Se han descrito dos vías principales de señalización intracelular que dan lugar a la muerte apoptótica: la vía intrínseca y la vía extrínseca (Fig. 24).

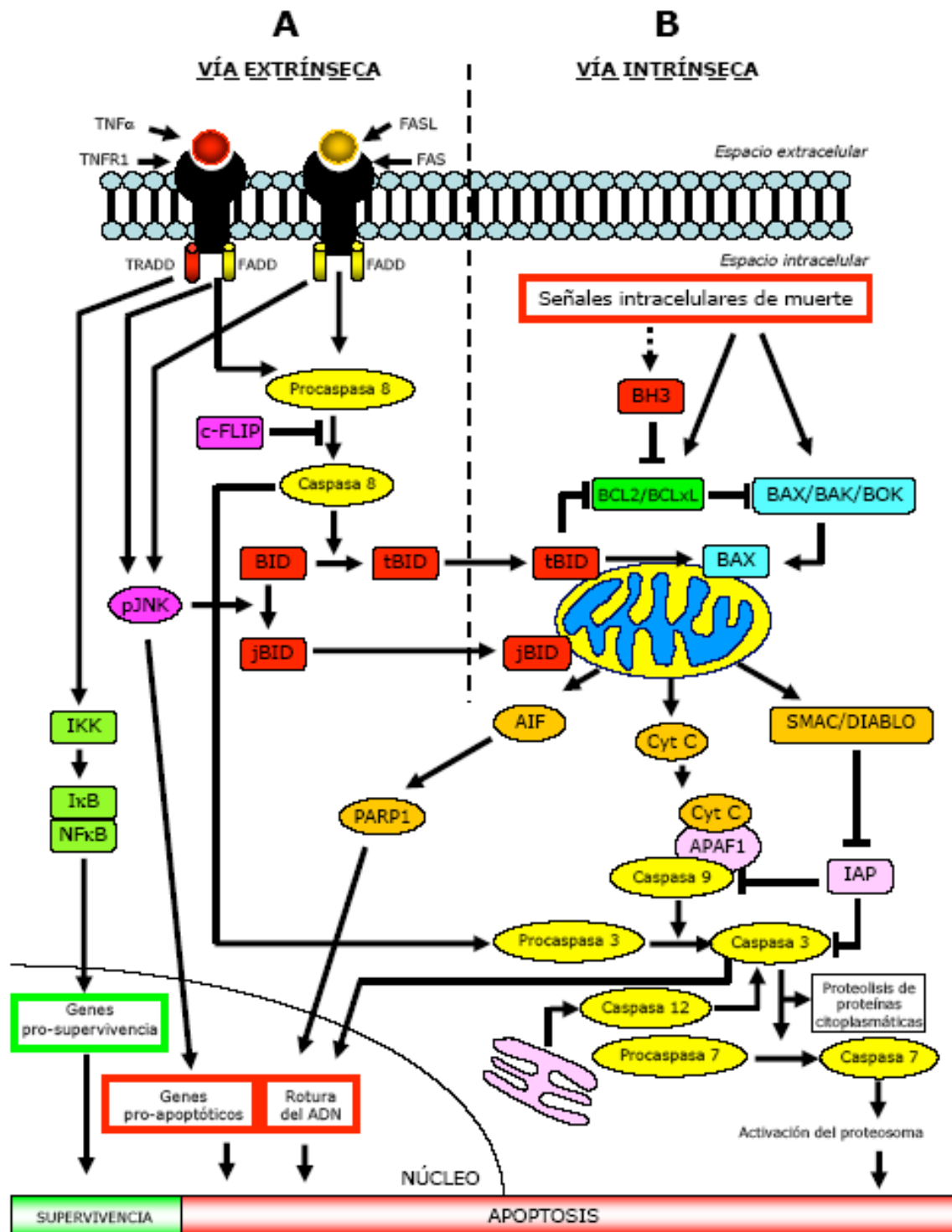


Figura 24. Vías apoptóticas de señalización intracelular (Nuria, 2005)

20.1 Vía intrínseca

La vía intrínseca (Fig. 24B) se caracteriza por el papel fundamental que tiene la mitocondria - concretamente la permeabilización de su membrana - en la cascada de señalización de muerte. La primera evidencia que indicó la importancia de la mitocondria en la apoptosis fue revelada por Newmeyer en el año 1994, usando un modelo de "célula libre". Actualmente, es bien conocido que esta vía está regulada por los miembros de la familia Bcl-2, ya que éstos realizan sus funciones (pro-apoptóticas o pro-supervivencia) en este organelo (Cory & Adams, 2002). El primer miembro de esta familia que se descubrió fue el proto-oncogen Bcl-2, y se observó que su expresión no promovía la proliferación celular como otros oncogenes, sino que bloqueaba la muerte celular ante múltiples estímulos fisiológicos y patológicos (Vaux et al., 1988; McDonnell et al., 1989). Dentro de la familia Bcl-2 existen miembros anti-apoptóticos que promueven la supervivencia y miembros pro-apoptóticos con la función opuesta. El primer homólogo pro-apoptótico de la familia fue Bax, identificado por su interacción con Bcl-2 (Oltvai et al., 1993).

Estructuralmente, todas estas proteínas presentan como mínimo una de las cuatro regiones o dominios homólogos a Bcl-2, lo cual les permite interacciones entre ellas, formando homodímeros o heterodímeros que regulan así su función (Oltvai et al., 1993). Las proteínas de esta familia se pueden regular a nivel transcripcional y post-translacional (mediante cambios conformacionales o por fosforilación). En condiciones normales, las proteínas anti-apoptóticas, como Bcl-2 o Bcl-x_L, están ancladas en determinadas membranas intracelulares, como las de mitocondria, retículo endoplásmico, o la misma membrana nuclear (Krajewski et al., 1993). Ambas proteínas actúan inhibiendo a los miembros pro-apoptóticos a través de la heterodimerización con éstos (Ferry & Korsmeyer, 1997). Además, de los cambios a nivel de dimerización, Bcl-2 también puede regularse por fosforilación. Dependiendo de la serina que se fosforile, puede dar lugar a un cambio de su función; así pues, la fosforilación de la serina 87 se ha ligado a la inactivación de la proteína con la consecuente pérdida de su función anti-apoptótica (Srivastava et al., 1998; Yamamoto et al., 1999; Coronen et al., 2003), y por el contrario, el incremento de la fosforilación de la serina 70 puede incrementar la función protectora de esta proteína en células mieloides dependientes de interleucina-3 o en diferentes líneas celulares de linfoma (Ruvolo et al., 1998; Deng et al., 2000; Zhao et al., 2001).

En contraste, Bax se localiza en el citosol, y después de un estímulo apoptótico es translocada a la membrana mitocondrial externa donde se integra y forma oligómeros o multímeros (Hsu et al., 1999; Mikhailov et al., 2001). A diferencia de Bax, Bak está siempre anclada a la membrana mitocondrial, pero durante la apoptosis también cambia de conformación y puede así formar grandes agregados (Griffiths et al., 1999; Wei et al., 2001). Se ha demostrado que las proteínas Bax y Bak actúan a nivel de la mitocondria, donde formarán poros para que se produzca la salida de citocromo c, de FIA (factor inductor de apoptosis) o de Smac/DIABLO (Segundo activador de caspasas derivado de mitocondria/proteína de unión directa asociada a IAP con bajo PI). Cabe mencionar que la salida de Smac/DIABLO y de FIA puede ocurrir por más de un mecanismo, o al menos puede estar regulada por varias proteínas pro-apoptóticas (Adrain et al., 2001). Una vez que se ha dado la salida del citocromo c de la mitocondria, este se une a la proteasa activadora de apoptosis Apaf-1, ambas se oligomerizan e

interaccionan con la pro-caspasa 9 y con ATP. Este complejo protéico recibe el nombre de apoptosoma y da lugar a la activación de la caspasa 9 (Srinivasula et al., 1998, Wang et al., 2001). A partir de la formación de este complejo, se inicia la activación de las caspasas 3 y 7, y la cascada de activación conlleva finalmente a la ruptura y a la degradación de proteínas estructurales citoplasmáticas y del DNA cromosómico (Benn & Wolf, 2004).

La activación de las caspasas dentro de la célula se encuentra altamente controlada, por eso en la cascada de muerte celular existe una serie de reguladores, procesos de retroalimentación e inhibidores endógenos que controlan este mecanismo. Un ejemplo claro de esto es el de la familia de las proteínas IAP (Inhibidores de apoptosis), las cuales regulan negativamente la activación de las caspasas 3, 7 y 9 (Riedl et al., 2001). Al mismo tiempo, las IAPs están controladas por varios mecanismos tales como el de la Smac/Diablo (Chai et al., 2000), el cual antagoniza el efecto inhibitor de la IAP. Smac/DIABLO sale de la mitocondria al citosol con el citocromo c, y así puede unirse a las IAPs, dejando libre a las caspasas para que ejerzan sus efectos (Saelens et al., 2004).

20.2 Vía extrínseca

Esta vía de inducción de la apoptosis en mamíferos se descubrió estudiando las propiedades del receptor Fas y su ligando (Iton et al., 1991; Watanabe-Fukunaga et al., 1992). Como se muestra en la figura 25, la vía extrínseca de la apoptosis se inicia con la interacción específica de un ligando con su receptor (Fas, receptor del TNF) y la subsecuente activación de una proteasa. Esta proteasa induce la liberación desde la mitocondria del citocromo c, el cual activará a su vez a una serie de proteasas cuya acción acabará destruyendo las estructuras celulares.

Como sabemos, esta vía se inicia por la activación de receptores de muerte de la familia TNF. Dichos receptores tienen un dominio llamado "dominio de muerte", y otro que es el efector de muerte (Tartaglia et al., 1993). Cuando el ligando se une a su receptor, los dominios de muerte se asocian con las proteínas adaptadoras que contienen los dominios efectores de muerte. Una vez que se han asociado a su receptor, se reclutan a la procaspasa 8, provocando así su activación. Posteriormente, la caspasa 8 proteoliza a Bid, que en condiciones normales se encuentra de forma inactiva en el citosol, formando un fragmento truncado (tBid) que es translocado a la mitocondria (Desagher et al., 1999). El tBid inicia la permeabilización de la membrana mitocondrial, induciendo cambios conformacionales y la oligomerización de Bax y Bak, y estimulando la salida del citocromo c (Esposti et al., 2002) y la posterior activación de caspasas efectoras. La caspasa 8 también puede activar estas caspasas directamente sin promover la salida de citocromo c de la mitocondria (Cryns & Yuan, 1998).

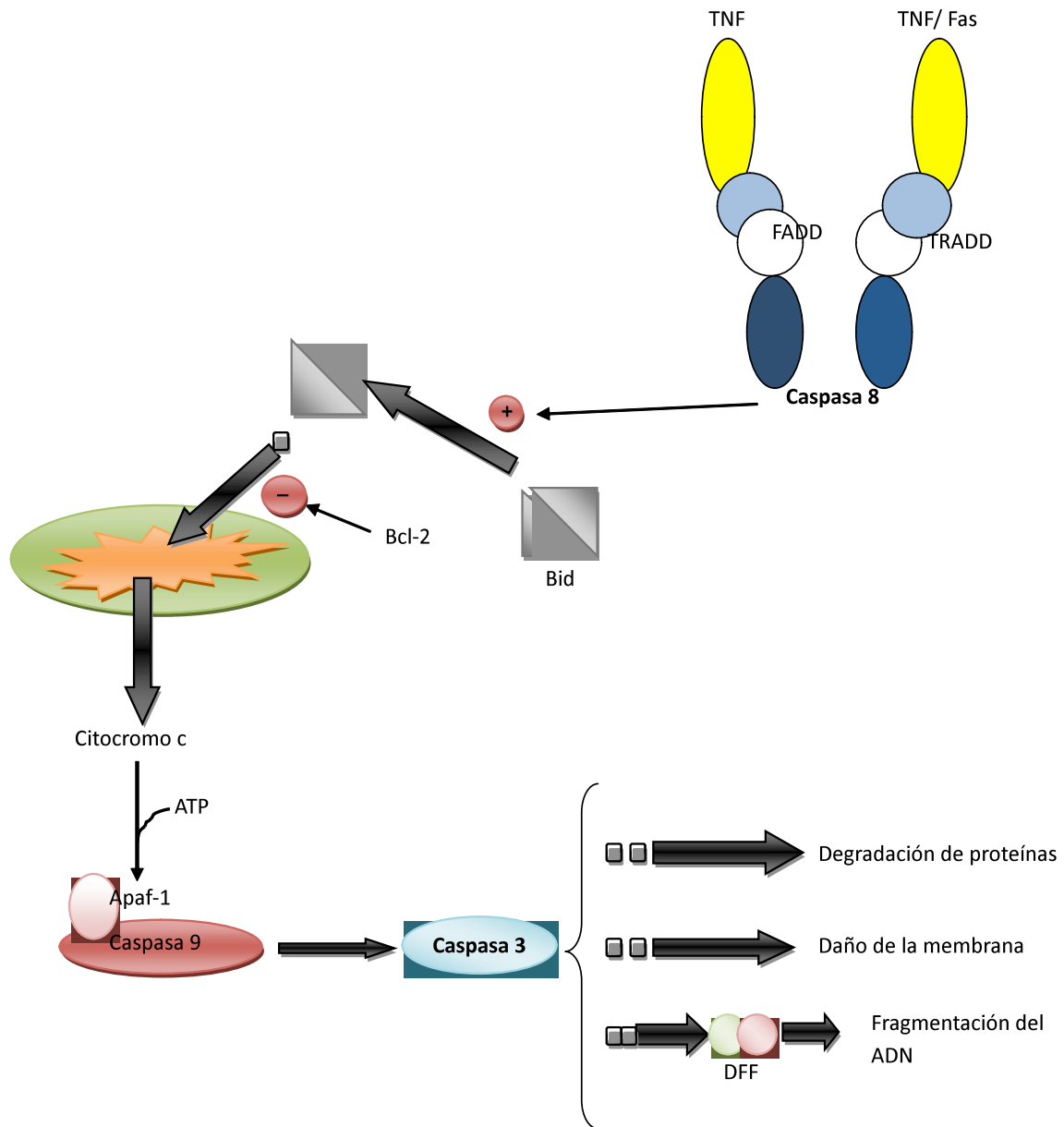


Figura 25. Vía extrínseca de la apoptosis (Nuria, 2005)

Otra vía activada por los receptores de muerte es la JNK (Weston & Davis, 2002; Shaulian & Karin, 2002; Lin, 2003), que desencadena la muerte apoptótica inactivando a los miembros anti-apoptóticos Bcl-2 y Bcl-x_L; o por el contrario, induciendo la fosforilación y la activación de la proteína pro-apoptótica Bim. Adicionalmente, JNK también incrementa la expresión de Bim, p53 y Fas/FasL (Ip & Davis, 1998). Bid también puede ser modificada por JNK, la cual genera un producto denominado jBid, diferente al Bid. A su vez, jBid es translocado a la mitocondria y permite la salida selectiva de Smac/Diablo (Deng et al., 2002;2003; Liu, 2003).

La interacción funcional entre la vía intrínseca y la extrínseca es un fenómeno que se ha descrito en multitud de modelos, y parece ser que la vía mitocondrial puede inducir una amplificación importante de la señal por parte de los receptores de muerte. Por otra parte, se ha observado que la pro-caspasa 8 puede activarse a través de un mecanismo que depende de la vía intrínseca (Slee et al., 1999), y por el contrario, la activación de la caspasa 8 y la ruptura de Bid puede ocurrir después de la salida del citocromo c y la activación de la caspasa 9 (Viswanath et al., 2001).

21. Caspasas y calpaínas

La apoptosis es un tipo de muerte celular que ocurre tanto en condiciones fisiológicas como en patológicas. En este proceso, la activación de proteasas juega un papel crítico (Wang et al., 1998). Tanto las caspasas como las calpaínas son de la familia de las cisteína proteasas. Mientras que las calpains requieren calcio para su actividad, las caspasas no son afectadas por este ion.

Las caspasas son cisteín-proteasas que se sintetizan como precursores inactivos, las cuales se activan durante la apoptosis a través del reclutamiento de complejos activadores o por su ruptura proteolítica por otras caspasas (Cryns & Yuan, 1998; Thornberry, 1998). Las caspasas pueden ser clasificadas en dos clases de acuerdo al largo de su predominio N-terminal. Las caspasas 1, 2, 8, 9 y 10 contienen largos predominios y se cree que actúan como caspasas activadoras (Cryns & Yuan, 1998; Thornberry, 1998). Esta clase de caspasas son activadas por la interacción con proteínas adaptadoras específicas. En el caso de la caspasa 9, la presencia de ATP y citocromo c inician la interacción entre Apaf-1 y pro-caspasa 9, lo cual activa a la caspasa 9 por auto-catálisis (Liu et al., 1996; Cou et al., 1997; Li et al., 1997). La caspasa 9 activa es una caspasa atípica que genera a la caspasa 3 activa. El mecanismo por el cual se activan las caspasas, además de la proteólisis, es por oligomerización. Dentro de los sustratos de las caspasas se incluyen: 1) proteínas del citoesqueleto (como la actina, tau y GAS-2); 2) enzimas de señales de transducción (proteína cinasa C isoformas delta y teta; proteína cinasa dependiente de calmodulina (CAMPK)-II y IV, fosfolipasa C, P-21 activada por cinasa y MEKK1); 3) proteínas del ciclo celular (PITSLRE cinasa; Rb, y Kip21); y 4) sustratos nucleares DNA-PKcs, PARP, U1-70K y Numa (Nicholson et al., 1997; Armstrong et al., 1997; Lazebnik et al., 1994; Nath et al., 1996; Zhivotovsky et al., 1997). Irónicamente, la alfa-espectrina, un sustrato de la caspasa 3, es el mejor sustrato conocido de la calpaína. Interesantemente, mientras Bcl-2 es un sustrato de la caspasa 3 (Cheng et al., 1997), BAX es reportado como un sustrato de calpaínas (Wood et al., 1998; McGinnis et al., 1999b). Además, la calpastina, una proteína inhibidora de calpaínas es sustrato de caspasas (Wang et al., 1998; Porn-Ares et al., 1998).

En cuanto a las calpaínas, las más caracterizadas hasta el momento son dos isoenzimas expresadas ampliamente, la μ - y la m-calpaína, las cuales puede ser distinguibles *in vitro* por su requerimiento de Ca^{2+} para su activación. Las μ -calpaínas necesitan para su activación la presencia de concentraciones micromolares de Ca^{2+} , mientras que la m-calpaína requiere de concentraciones milimolares de Ca^{2+} (Croall & Demartino, 1991; Saido et al., 1994).

Hay una amplia lista de sustratos de calpaínas que sugieren que éstas pueden estar involucradas en funciones celulares básicas, incluyendo la proliferación, la apoptosis y en general, en la regulación de la expresión de genes (Lu et al., 2002; Sazonowa et al., 1999; Sorimachi et al., 1997; Tan et al., 2006). Estas características son especiales debido a que no solo causan una degradación total de sustratos, sino que también son capaces de actuar como limitadores de proteólisis, cambiando la actividad de los sustratos (Sorimachi et al., 1997). Así, las calpaínas necesitan un control de su actividad proteolítica, la cual es mantenida primordialmente por dos mecanismos: el primero, su inhibidor endógeno específico, que en este caso sería la calpastatina; y el segundo, las calpaínas son por sí mismas las limitantes de sus actividad por autólisis (Sazonowa et al., 1999; Shi et al., 2000).

Las calpaínas tienen diferentes sustratos tales como factores de transcripción (c-FOS, c-JUN, c-MYC, c-MOS y NF-κB), proteínas de citoesqueleto, cinasas y fosfatasas (Darrel et al., 2003; Franco & Huttenlocher, 2005). La proteólisis mediada por calpaínas representa la mayor vía de modificación post-transcripcional que influye en varios aspectos de la fisiología celular, incluyendo la apoptosis, la migración celular y la proliferación (Carragher & Frame, 2002; Sorimachi et al., 1997).

Se ha reportado que las calpaínas son activadas durante la apoptosis de células T, timocitos, neuronas granulares cerebelares y células de neuroblastoma SH-SY5Y (Saido et al., 1997; Sarin et al., 1993; Nath et al., 1996a,b). De particular interés es el hecho de que la α-espectrina aparentemente es cortada tanto por la calpaína como por la caspasa 3 en la apoptosis (Nath et al., 1996a), sugiriendo que estas proteasas pueden compartir funciones.

21.1 Lenguaje entrecruzado entre caspasas y calpaínas

El lenguaje entrecruzado (o “cross-talk” en inglés) entre calpaínas y caspasas se ha sugerido por evidencia que apunta a que las enzimas pueden tener sustratos en común, incluyendo proteínas reguladoras y de citoesqueleto, con varias consecuencias funcionales. Las caspasas pueden indirectamente influenciar la actividad de las calpaínas, regulando la ruptura de la calpastatina. Por su parte, las calpaínas pueden cortar un gran número de caspasas, las cuales pueden llevar a la activación o inhibición de su actividad (Nixon, 2003; Raynaud & Marcilhac, 2006).

En un trabajo reciente, Wang y colaboradores (1998) encontraron que en células a las que se les había inducido la apoptosis por medio de estaurosporina, la aplicación de un inhibidor de caspasas, pero no de calpaínas, reduce la pérdida de calpastatina. Adicionalmente, este grupo encontró que la calpastatina podía ser cortada por las caspasas 1, 3 y 7, proponiendo de esta manera que la fragmentación de la calpastatina puede facilitar el lenguaje entrecruzado entre caspasas y calpaínas durante la apoptosis. Más aún, Pontremoli y colaboradores (1991) mostraron que cuando las calpaínas están en exceso, la calpastatina es más susceptible a la digestión por estas proteasas. Estos hallazgos sugieren que esta degradación de la calpastatina es susceptible a caspasas o calpaínas, dependiendo del estímulo y de las condiciones en las que se encuentre.

Chua y colaboradores (2000) mostraron que las caspasas son sustratos directos para las calpaínas. Estas proteasas dependientes de Ca^{2+} son capaces de cortar a la caspasa 7, generando fragmentos proteolíticos inactivos. Otras que pueden ser sustratos para las calpaínas son las caspasas 8 y 9. En el caso de la caspasa 9, al ser cortada genera una caspasa 9 truncada que es incapaz de activar a la caspasa 3. Los hallazgos de este grupo sugieren una vía alternativa de regulación de la apoptosis en la cual las calpaínas actúan como reguladores negativos de las caspasas y la apoptosis por efecto de la inactivación de las caspasas iniciadoras.

Por otra parte, Nakagawa y colaboradores (2000) demostraron que la actividad de calpaína es requerida para la activación de caspasa 12, la cual se encuentra predominantemente en el retículo endoplásmico, y es específicamente activada por disturbios en la homeostasis de este organelo. Estos autores además mostraron que la activación de calpaínas inducida durante la isquemia resulta en la ruptura de Bcl-xL, quitándole a este último la capacidad de molécula anti-apoptótica.

La contribución relativa de la apoptosis y la necrosis al daño cerebral ha sido un tema de mucho debate. La caspasa 3 ha sido identificada como una proteasa clave en la ejecución de la apoptosis, mientras que las calpaínas han sido típicamente implicadas en el daño neuronal excitotóxico. En un modelo de hipoxia-isquemia unilateral en ratas de 7 días de edad, la actividad de la caspasa 3 incrementó 24 veces a las 24 h post-insulto, coincidiendo con el rompimiento de la pro caspasa 3 y el sustrato endógeno de caspasa 3. Esta activación fue disminuída por un inhibidor farmacológico de calpinas. La activación de la caspasa 3 por m-calpaína, pero no por μ -calpaína, fue facilitada de manera dosis-dependiente en condiciones *in vitro* a través de la incubación de fracciones citosólicas conteniendo caspasa 3 con calpaínas. Esta facilitación pudo ser abolida por un inhibidor específico de calpaínas, como lo es la calpastatina. Esto indica que el rompimiento inicial de caspasa 3 por m-calpaínas produce un fragmento de 29 kDa, facilitando así el rompimiento subsecuente de las formas activas (Blomgren et al., 2001).

Existe un amplio espectro de citas en la literatura que demuestran las conexiones funcionales entre calpaínas y caspasas. Diferentes proteínas son sustratos comunes de estas proteasas, tales como la fodrina (Nath et al., 1996; Jänicke et al., 1998; Vanags et al., 1996; Wang et al., 1998b), la calpastatina (Pörn-Ares et al., 1998; Wang et al., 1998), la actina (Villa et al., 1998), la PARP (McGinnis et al., 1999) y la tau (Canu et al., 1998). Algunos de estos reportes han demostrado que el rompimiento de las caspasas 3, 7, 8 y 9 es mediado por calpaínas (McGinnis et al., 1999; Wolf et al., 1999). Además, las proteínas pro-apoptóticas tales como Bax, son cortadas por calpaínas durante la apoptosis inducida por drogas en células HL-60 (Word et al., 1998). Más aún, las calpaínas pueden ser responsables del rompimiento de Bcl-xL, y por ende, del hecho de que la molécula anti-apoptótica cambie a una pro-apoptótica (Nakagawa et al., 2000).

22. Participación de proteasas en el daño neurotóxico evocado por 3-NP

Diversos estudios han establecido que la exposición a 3-NP induce tanto muerte apoptótica como necrótica en células estriatales, hipocampales y corticales (Behrens et al., 1995; Pang & Geddes, 1997). El balance entre estos dos tipos de muerte celular depende básicamente de la severidad de la disminución de ATP (Eguchi et al., 1997; Leist et al., 1997; Ohgoh et al., 2000), el cual está ampliamente relacionado con la dosis y el tiempo de exposición a la toxina. En general, a bajas dosis de 3-NP se induce un daño menor y un tipo de muerte apoptótica, mientras que a altas concentraciones del agente *tóxico*, el patrón resultante es un daño agudo necrótico (Vis et al., 2002). Más en detalle, se ha observado que el 3-NP a bajas dosis (<1 mM) produce la activación de caspasas que llevan a la fragmentación del DNA, sin afectar la integridad de la membrana plasmática, lo cual concuerda con los procesos de muerte apoptótica. De hecho, el 3-NP parece activar la vía mitocondrial en neuronas corticales por inducción de la liberación de citocromo c. En presencia de 1-3 mM de 3-NP, las caspasas 2 y 8 fueron también activadas, sugiriendo el involucramiento de la vía extrínseca, la cual ha sido descrita como dependiente de la activación de receptores de muerte (Schulze-Osthoff et al., 1998). Se ha demostrado que ha concentraciones >1 mM, tanto la muerte apoptótica como la necrótica ocurren (Almeida et al., 2004). Esto puede ser confirmado por la observación de la liberación de citocromo c, la activación de caspasa 3, la fragmentación de ADN y la liberación de LDH. El análisis

del rompimiento de fodrina, un sustrato tanto de caspasa 3 como de calpaínas, mostró una ligera acumulación de fragmentos de 145 kDa, sugiriendo la activación de calpaínas, lo cual es típicamente asociado a procesos necróticos (Nars et al., 2003; Pang et al., 2003).

En cultivos de células neuronales, la muerte celular producida por el 3-NP puede ser dependiente de la activación de caspasas (Almeida et al., 2004), o no serlo (Galas et al., 2004; Nars et al., 2003), esté dependerá de las condiciones experimentales. Almeida y colaboradores (2004) claramente mostraron que cuando las células neuronales son incubadas por pocos días (3-6 días) en altas concentraciones de 3-NP (0.5 mM-5 mM), hay activación de caspasas. En contraste, cuando las células neuronales son incubadas de 8-10 días después del tratamiento en bajas concentraciones de la toxina (100 μ M), el efecto tóxico es independiente de las caspasas 9, 8 y 3 (Galas et al., 2004). Al respecto, se ha encontrado que en situaciones de daño crónico, las caspasas 3 y 9 son directamente inactivadas por la calpaína, la cual es prominente durante el tratamiento crónico con 3-NP (Bizat et al., 2003), y que la inyección cerebroventricular de zVAD, un inhibidor de caspasas, disminuye la degeneración estriatal inducida por el 3-NP y disminuye la activación de calpaínas, así como el rompimiento de fodrina dependiente de calpaínas (Bizat et al., 2005). En posterior refuerzo de las evidencias anteriores, estudios en en neuronas estriatales tratadas con 3-NP, no se ha encontrado cambio alguno en la actividad de las caspasas 9 y 3, a pesar de la liberación citosólica de citocromo c y Smac, los cuales son eventos clásicos de la apoptosis. En contraste, lo que sí se encontró fue una marcada activación de las proteasas dependientes de Ca^{2+} . En consecuencia, el inhibidor de caspasas z-VAD no mostró efecto alguno contra el 3-NP, mientras que el inhibidor de calpains IC1 fue neuroprotector (Galas et al., 2004). Estos datos sugieren que la ausencia de activación de caspasas 9 y 3 en neuronas estriatales puede estar relaciona con la activación de calpaínas, dado que recientes datos apoyan la habilidad de las calpaínas de inactivar la vía de las caspasas 9 y 3 en la muerte celular excitotóxica (Lankiewicz et al., 2000) y la degradación de las caspasas 9 y 3 durante la degeneración inducida por 3-NP *in vivo* (Bizat et al., 2003b).

Por otra parte, bajo condiciones *in vivo* se ha evaluado la administración subtóxica de 3-NP y glutamato, mostrándose que la combinación de estos dos agentes no generan un proceso de reclutamiento de caspasas, pero sí un aumento en la actividad de calpaínas, lo cual está posiblemente relacionado con la pérdida de la homeostasis de Ca^{2+} intracelular (Del Rio & Massieu, 2008). Adicionalmente, se ha visto que la muerte neuronal es parcialmente prevenida por sustratos energéticos como el piruvato y cuerpos cetónicos, soportando el papel del mantenimiento del metabolismo energético en la supervivencia celular (García & Massieu, 2001; Massieu et al., 2001, Massieu et al., 2003).

En lo que respecta al QUIN, este modelo ha sido poco estudiado en relación con la activación de caspasas y/o calpaínas, debido en gran medida a que típicamente se le ha asociado a un patrón de muerte necrótica. Por ende, es de gran interés el establecer en dicho modelo como se expresa este lenguaje de proteasas, y caracterizarlo también en relación al modelo sinérgico, donde sería de esperar que el comportamiento de este último sea diferente a los dos modelos individuales, en términos específicos de la participación de caspasas y/o calpaínas.

23. Planteamiento del problema

Hasta el momento, no se dispone en la literatura de una caracterización completa de los efectos neurotóxicos que se generan al co-administrar concentraciones subtóxicas de QUIN y el 3-NP. Algunas aproximaciones a este modelo establecen las alteraciones celulares generadas por la administración de agentes que pueden presentar efectos similares a los del QUIN (NMDA, glutamato, etc.) y los del 3-NP (malonato); sin embargo, el modelo de facilitación de daño por estas dos toxinas específicas tiene mayor relevancia como modelo de la enfermedad de Huntington debido a la cercanía metabólica del QUIN (vía de la kinurenina) a la enfermedad humana, y al hecho de que el 3-NP es un agente que en repetidas ocasiones ha sido sugerido como un buen modelo de las alteraciones energéticas de la EH. En consideración a lo anterior, consideramos que es relevante conocer el tipo y la naturaleza del daño causado en este doble modelo para obtener más información sobre los mecanismos potencialmente involucrados en la EH y en otras patologías neurodegenerativas con componentes excitotóxicos, oxidativos y de metabolismo energético comprometido, cuando estas condiciones ocurren de manera simultánea en el SNC. De hecho, dado que la teoría de excitotoxicidad indirecta propone que el compromiso en el metabolismo energético en células del SNC las hace más vulnerables a las concentraciones normales de aminoácidos excitadores presentes en el medio, y que este proceso involucra la activación del receptor para NMDA, este proceso en su conjunto podría explicar muchos de los eventos que ocurren en el cerebro de pacientes con la EH. Nuestro grupo recientemente caracterizó la participación de Ca^{2+} intracelular en el patrón de daño evocado por la co-administración de QUIN + 3-NP, encontrando que el mayor aporte al daño oxidativo proviene del Ca^{2+} intracelular. Teniendo esto como marco de referencia, y sabiendo que este ión es capaz de activar una serie de procesos que llevan a la muerte celular, es crucial saber que tipo de proteasas (caspasas o calpaínas) pueden estar mayormente involucradas en el proceso de muerte neuronal en este modelo, y contrastarlo contra lo ocurrido en los modelos independientes. Por ello, en esta sección presentamos los resultados del empleo de inhibidores selectivos de caspasas y calpaínas sobre diferentes marcadores de daño a tejido estriatal, incluyendo daño oxidativo a lípidos de membranas, disfunción mitocondrial, liberación de lactato deshidrogenado y degradación de DNA.

24. Hipótesis

- Dado el patrón de daño celular evocado en el modelo sinérgico hasta ahora caracterizado, y las posibles implicaciones de las proteasas en el mismo, el empleo de inhibidores, tanto de caspasas como de calpaínas, atenuará de manera diferencial el daño evocado por estas toxinas y sugerirá los mecanismos de acción predominantes para cada uno de los modelos.

25. Objetivos

25.1 Objetivo General

- Caracterizar la posible participación diferencial de proteasas en el daño neuronal evocado por la co-administración de QUIN + 3-NP y en los modelos independientes.

25.2 Objetivos particulares

- Cuantificar el daño oxidativo por PL, 1, 3 y 6 h después de la incubación de rebanadas estriatales con QUIN y/o 3-NP en presencia de inhibidores de caspasas y calpaínas.
- Evaluar la funcionalidad mitocondrial en el modelo sinérgico y los individuales, a diferentes tiempos en presencia de los inhibidores de proteasas.
- Analizar el efecto de la co-administración de las toxinas y su administración separada, en presencia de los inhibidores de proteasas en la actividad de lactato deshidrogenasa y degradación del DNA, como marcadores de daño y muerte celular.

26. Metodología

26.1 Reactivos

El 3-NP, el QUIN, el ácido tiobarbitúrico (TBA), el malondialdehído, el 3-[4,5-dimetil-tiazol]-2,5-difenil tetrazolio bromuro (MTT), el β -NADH y el piruvato fueron de Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA). El inhibidor de calpaínas 1 (IC1) y el inhibidor de caspasas z-VAD fueron de Roche. Todos los otros reactivos fueron de casas comerciales conocidas. Las soluciones fueron preparadas con agua desionizada obtenida de un sistema de purificación Milli-RQ de Millipore (Billerica, Massachusetts, USA).

26.2 Animales

Se emplearon rebanadas estriatales, que se obtuvieron del cerebro de ratas Wistar macho (280-320 g). Un total de 60 ratas fueron empleadas para este trabajo. Para todos los experimentos, los animales se agruparon en 5 por cada caja de acrílico, alimentados con un producto comercial (Purina Chow) y agua *ad libitum*. Las habitaciones del bioterio fueron mantenidas en condiciones constantes de temperatura ($25 \pm 3^\circ\text{C}$), humedad ($50 \pm 10\%$), y luz (12:12 ciclo luz:oscuridad).

26.3 Preparación e incubación de las rebanadas estriatales

Las rebanadas estriatales (200-300 nm de espesor) fueron obtenidas en fresco e inmediatamente transferidas a un medio frío con HEPES (pH 7.4), el cual contenía: NaCl 0.1 M, NaH_2PO_4 0.001 M, NaHCO_3 0.005 M, CaCl_2 0.001 M, glucosa 0.006 M, HEPES 0.01 M. Cinco rebanadas fueron colocadas por tubo e incubadas en un medio con HEPES (volumen final de 900 μL), en presencia de concentraciones subtóxicas de QUIN (21 μM) y 3-NP (166.6 μM) previamente descritas (Pérez-De la Cruz et al., 2008). Tubos adicionales de rebanadas fueron incubados en presencia de concentraciones tóxicas conocidas de estos agentes (QUIN 100 μM y 3-NP 1 mM) por separado. Algunos tubos con las toxinas también fueron incubados con z-VAD o IC1 (100 μM y 50 μM , respectivamente). Todos los tubos fueron incubados a 37°C durante 1, 3 y 6 h con agitación.

26.4 Evaluación funcional de las rebanadas estriatales a través de la reducción de MTT.

La reducción del MTT fue determinada como un índice del estatus funcional de la cadena respiratoria y la función mitocondrial. Brevemente, después de la incubación, las rebanadas estriatales fueron homogenizadas con 900 μL de HEPES; posteriormente se adicionaron 8 μl de MTT (5 mg/ml) y se incubaron a 37°C por 30 min (Pérez-De La Cruz et al., 2006). Después, las muestras se centrifugaron a $15,300 \times g$ por 15 min, y el botón fue resuspendido en 1 ml de isopropanol ácido. La cuantificación de formazán fue estimada en el sobrenadante en un espectrofotómetro ThermoSpectronic Genesys 8 a una densidad óptica de 570 nm. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de la reducción de MTT con respecto a los valores controles. Se colectaron 7 datos por grupo experimental.

26.5 Peroxidación de Lípidos

La PL fue medida en homogenados de rebanadas previamente incubadas con las toxinas e inhibidores de proteasas, a través de la formación de sustancias reactivas al TBA (TBARS), de acuerdo a reportes previos (Santamaría *et al.*, 1999). A los homogenados se les adicionó 500 μ L del reactivo TBA (0.75g TBA + 15 g de ácido tricloroacético + 2.54 ml HCl), y se re-incubaron en un baño de agua a ebullición (94°C) por 20 min. Las muestras fueron colocadas en hielo por 5 min y centrifugadas a 3,000 x g por 15 min. La densidad óptica de los sobrenadantes fue estimada en un espectrofotómetro Genesys 8 a una longitud de onda de 532 nm. Las concentraciones de MDA (expresadas como nmol de TBARS/mg de proteína) fueron calculadas por la interpolación en una curva estándar de MDA (realizada en paralelo) y expresadas como porcentajes de MDA formado vs. Control.

26.6 Actividad de lactato deshidrogenasa

En grupos adicionales de rebanadas similarmente tratadas, se separó el medio en el cual fueron incubadas. A este medio de incubación se le adicionaron 50 μ l de β -NADH (2.7mM) y 50 μ L de piruvato (23 mM). La densidad óptica fue determinada a 340 nm por 1 min en intervalos de 10 segundos para monitorear la oxidación de NADH. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de oxidación expresado en unidades internacionales por mg de proteína.

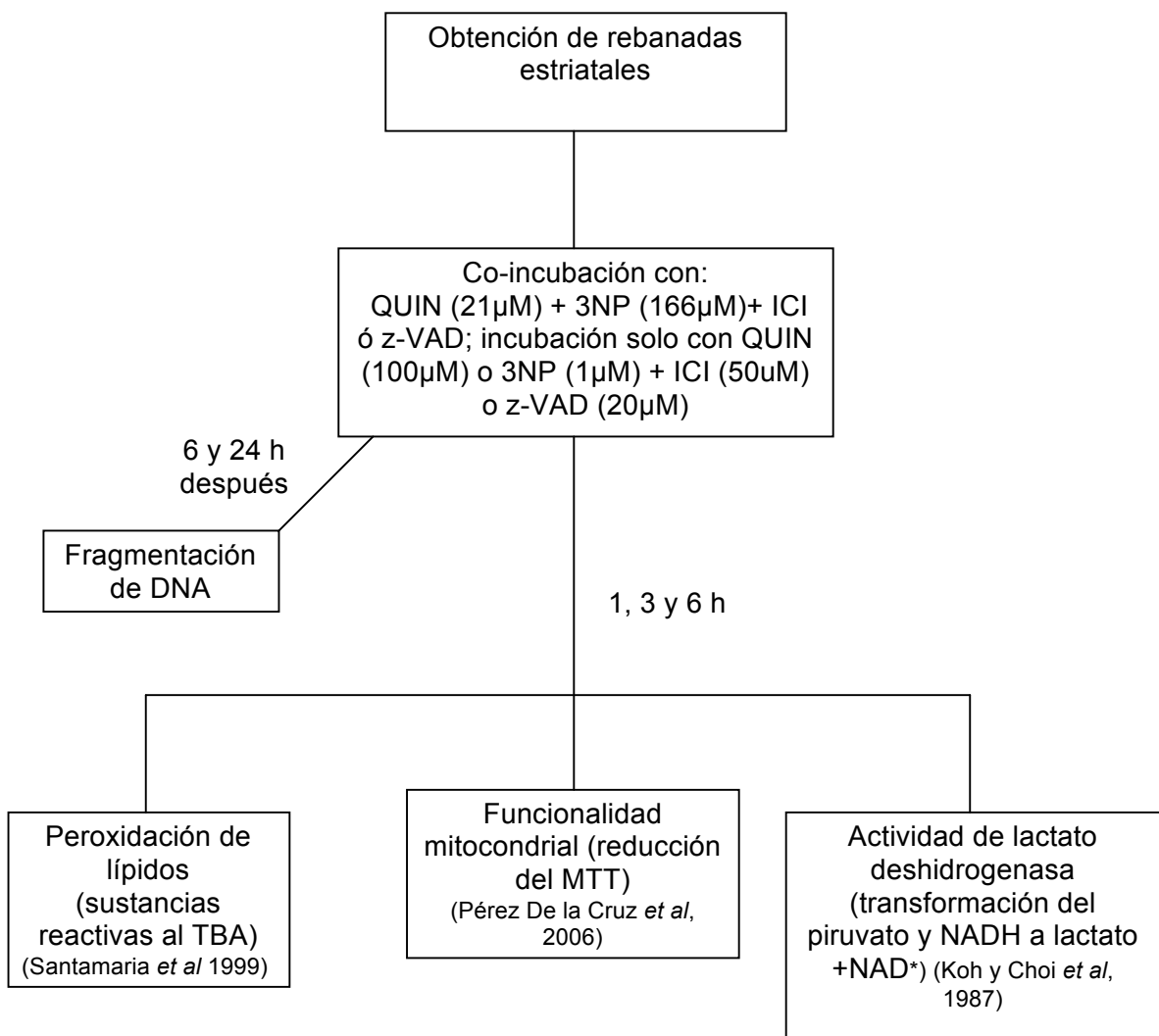
26.7 Fragmentación del DNA

Seis y 24 h después de la incubación de las rebanadas tratadas con las toxinas, éstas fueron incubadas con proteinasa K (60 μ g/mL) y SDS (2 %) por 48 h. Después, el DNA fue extraído y se le adicionó una mezcla de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló por 5 min y se centrifugó a 5,500 rpm x 10 min. Al sobrenadante obtenido se le agregaron 25 μ L de acetato de sodio (3 M) e isopropanol frío. Las muestras se almacenaron durante 24-48 h a -20°C para luego ser descongeladas y re-centrifugadas a 5,500 rpm por 15 min. El botón se lavó con etanol al 70 % y se resuspendió en 250 μ L de agua. Se agregaron 12.5 μ L de RNAsa (10mg/mL) y las muestras se incubaron a 37°C durante 30 min. Se determinó el contenido de DNA a 260 nm en un espectrofotómetro Génesis 8. Posteriormente, se corrió un gel de agarosa al 3% cargando 5 μ g de muestra en cada pozo.

26.8 Análisis estadístico

Todos los resultados fueron expresados como la media \pm S.E.M. Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey, usando el programa Prism 3.02 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Valores de $P < 0.05$ fueron considerados estadísticamente diferentes.

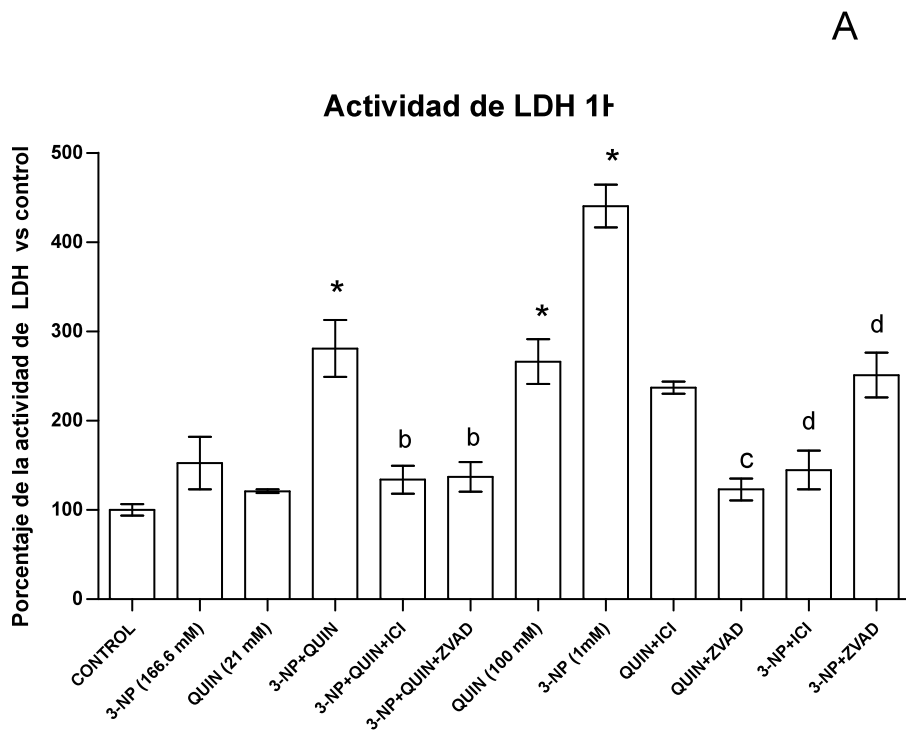
26.9 Diagrama de flujo



27. Resultados

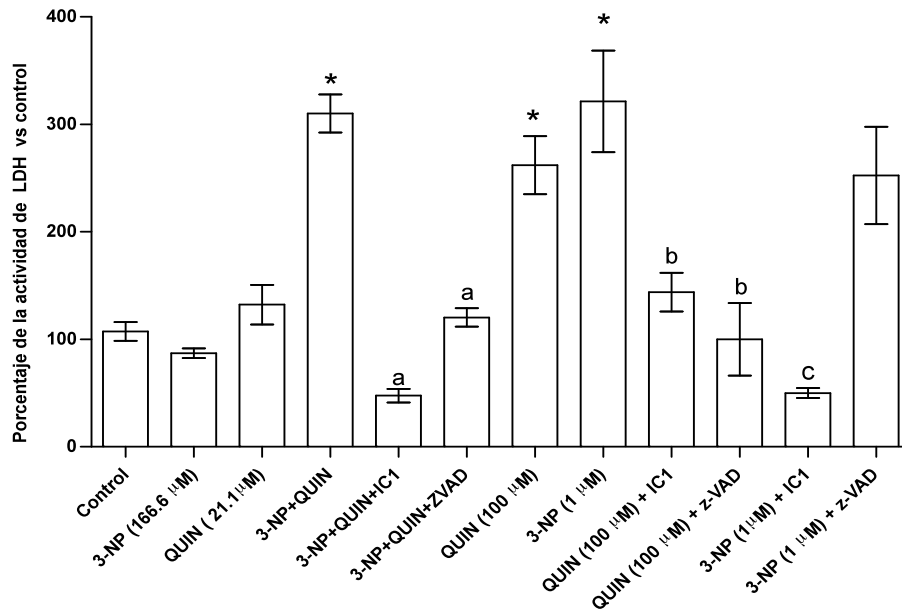
27.1 Efecto de los inhibidores de proteasas en el aumento de la actividad de LDH por el efecto sinérgico de QUIN + 3-NP

En la Figura 26A se observa un aumento en la actividad de LDH evocada tanto por la administración sub-tóxica de QUIN + 3-NP, como de QUIN y 3-NP a concentraciones tóxicas por separado, esto a 1 h después de la administración de estos agentes. Esta misma tendencia se puede observar en la figura 26B. A la primera hora de incubación podemos observar que tanto el z-VAD como el ICI son capaces de atenuar la actividad de LDH evocada por la co-administración de QUIN+3-NP y de 3-NP tóxico; sin embargo, para este mismo tiempo el z-VAD, pero no el IC1, atenuó la actividad de LDH evocada por concentraciones tóxicas de QUIN. A las 3 h (Fig. 26B) de incubación se observa que ambos inhibidores de proteasas disminuyen la actividad de LDH en el modelo sinérgico y el evocado por la administración tóxica de QUIN. En el caso de 3-NP tóxico únicamente el IC1 fue capaz de disminuir significativamente la actividad de esta enzima. A las 6 h de incubación (Fig. 26C), la liberación de LDH sólo fue incrementada en el modelo de co-administración de las toxinas y el de 3-NP a niveles tóxicos, y en ambos casos este marcador fue prevenido por ambos inhibidores de proteasas.



B

Actividad de LDH 3 h



C

LDH Activity 6HRS

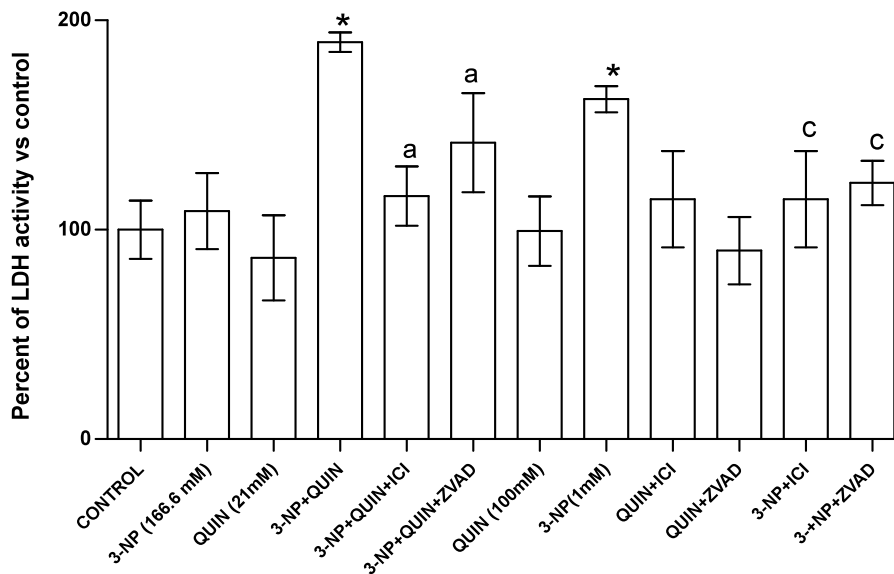
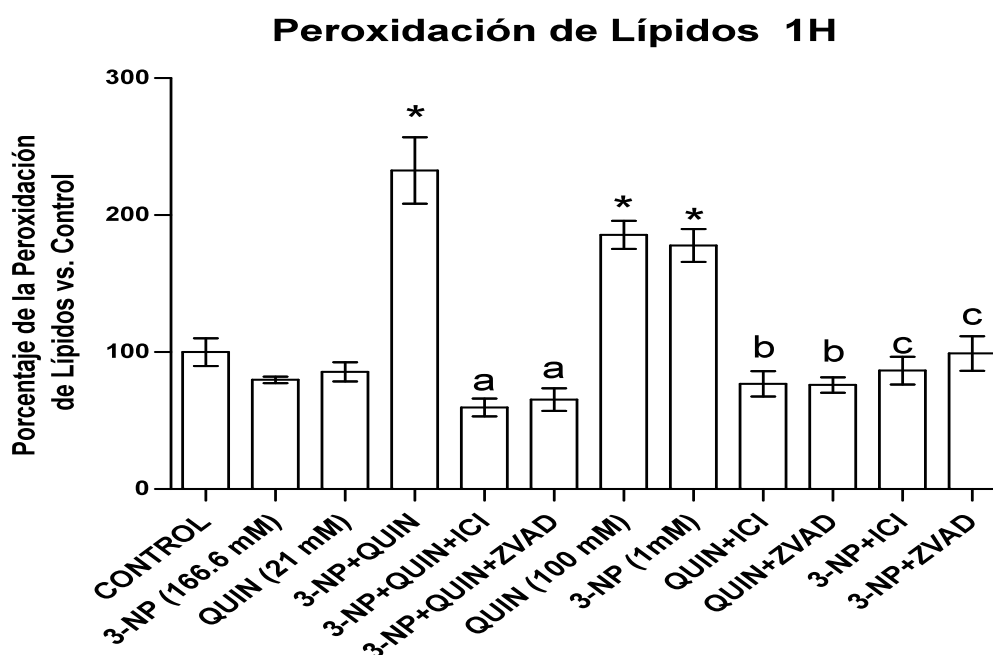


Figura 26. Efecto de los inhibidores de proteasas (IC1 y zVAD) en el aumento en la actividad de LDH evocada por QUIN+3-NP, QUIN_{tóxico}, 3-NP_{tóxico}. Se muestra la actividad de LDH a 1, 3 y 6 h (A, B y C, respectivamente) después de la exposición con las toxinas y los tratamientos con los inhibidores de proteasas. En ambas gráficas se presenta la media \pm SEM de seis experimentos por grupo. *P<0.01, significativamente diferente de control; ^aP<0.01, significativamente diferente de QUIN+3-NP, ^bP<0.01, significativamente diferente de QUIN_{tóxico}; ^cP<0.01, diferente significativamente de 3-NP_{tóxico}.

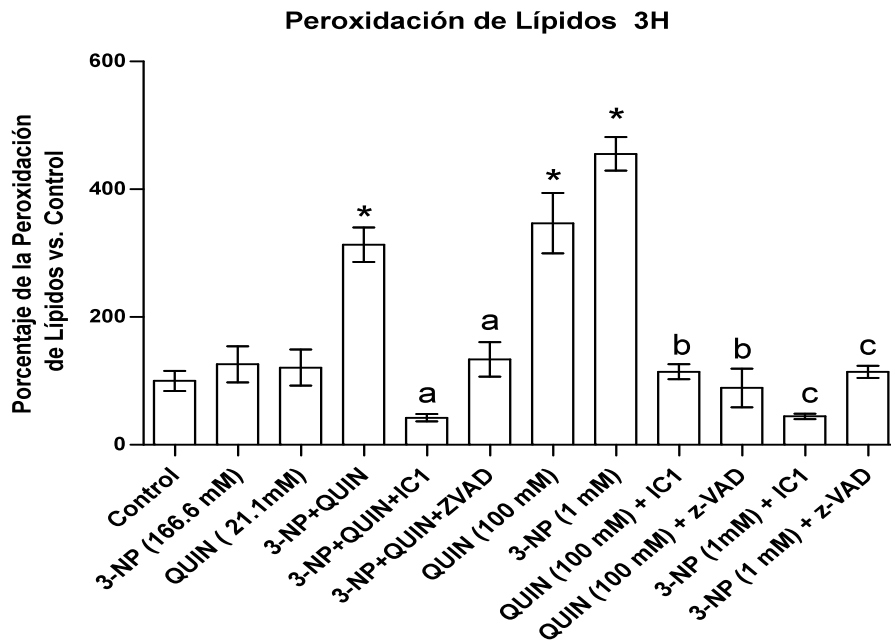
27.2 Efecto protector de z-VAD e IC1 en la PL evocada por QUIN y 3-NP a concentraciones tóxicas, y en un modelo de co-administración evocado por las mismas toxinas a concentraciones subtóxicas

El efecto de los inhibidores de proteasas en la PL evocada por QUIN y 3-NP a concentraciones tóxicas, y a concentraciones sub-tóxicas al ser administrados conjuntamente, se describe en la figura 27. En A podemos observar el aumento en la PL después de 1 h de exposición a QUIN+3-NP, QUIN_{tóxico} y 3-NP_{tóxico}. Se muestra un efecto protector por ambos inhibidores de proteasas en todos los modelos experimentales. A las 3 h de exposición con la toxinas, se observa un aumento considerable en los niveles de lípidos peroxidados en los tres modelos, y este marcador de daño oxidativo es atenuado por los inhibidores de proteasas, aunque el IC1 baja más allá de los niveles control para los casos de la co-administración de las toxinas y con 3-NP_{tóxicos}. En la figura C se observa el aumento de la PL evocado 6 h después de la incubación con las toxinas. El IC1 fue capaz de atenuar los niveles de PL tanto en el modelo de co-administración como en el de 3-NP_{tóxico}, pero para el caso del QUIN_{tóxico} únicamente el z-VAD disminuyó este marcador.

A



B



C

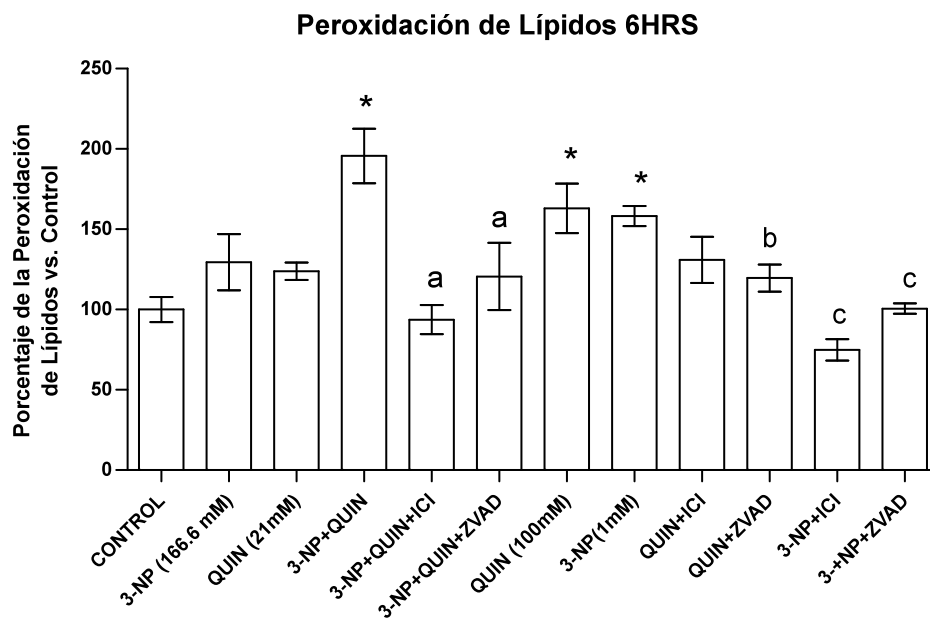
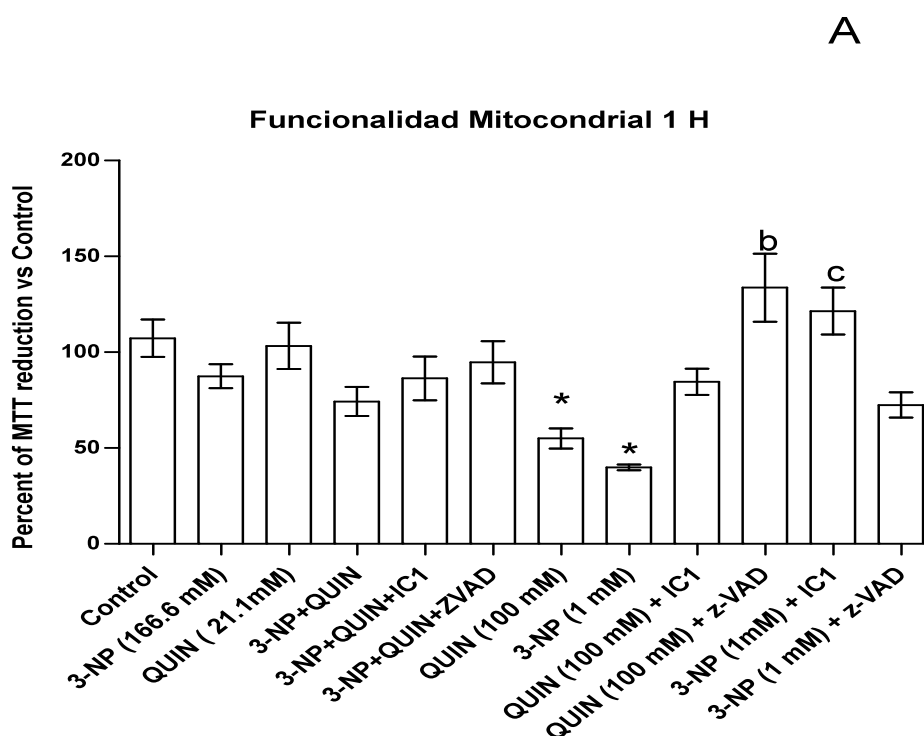


Figura 27. Efecto de z-VAD e IC1 en la PL evocada por QUIN + 3-NP, QUIN_{tóxico} y 3-NP_{tóxico}. Se muestra la PL a 1, 3 y 6 h (A, B y C, respectivamente) después de la exposición con las toxinas y los tratamientos con los inhibidores de proteasas. En ambas gráficas se presenta la media \pm SEM de seis experimentos por grupo. *P<0.01, significativamente diferente de control; ^aP<0.01, significativamente diferente de QUIN+3-NP; ^bP<0.01, significativamente diferente de QUIN_{tóxico}; ^cP<0.01, diferentes significativamente de 3-NP_{tóxico}.

27.3 Disfunción mitocondrial evocada por QUIN + 3-NP y por concentraciones tóxicas de estos agentes. Efecto atenuador de los inhibidores de proteasas.

En la figura 28, la reducción de MTT se consideró como un índice de funcionalidad mitocondrial. En A podemos observar que el QUIN_{tóxico} y el 3-NP_{tóxico} disminuyeron la capacidad reductora mitocondrial de MTT de manera significativa con respecto al control. El z-VAD sólo, para el caso de QUIN_{tóxico}, atenuó este marcador, mientras que el IC1 hizo lo propio para el caso de 3-NP_{tóxico}. En B se observa una disminución en la reducción de MTT ejercida por los tres modelos probados; el IC1 mostró una atenuación en este efecto para el caso de QUIN_{tóxico}, mientras que el z-VAD lo hizo para el caso de 3-NP_{tóxico}. Únicamente a las 6 h, el 3-NP disminuyó significativamente la reducción de MTT; sin embargo, el z-VAD aumentó este marcador en el modelo de co-administración y en el caso de QUIN_{tóxico}. Por su parte, el IC1 previno completamente la disminución en la reducción evocada por el 3-NP_{tóxico} (Fig. 28C).



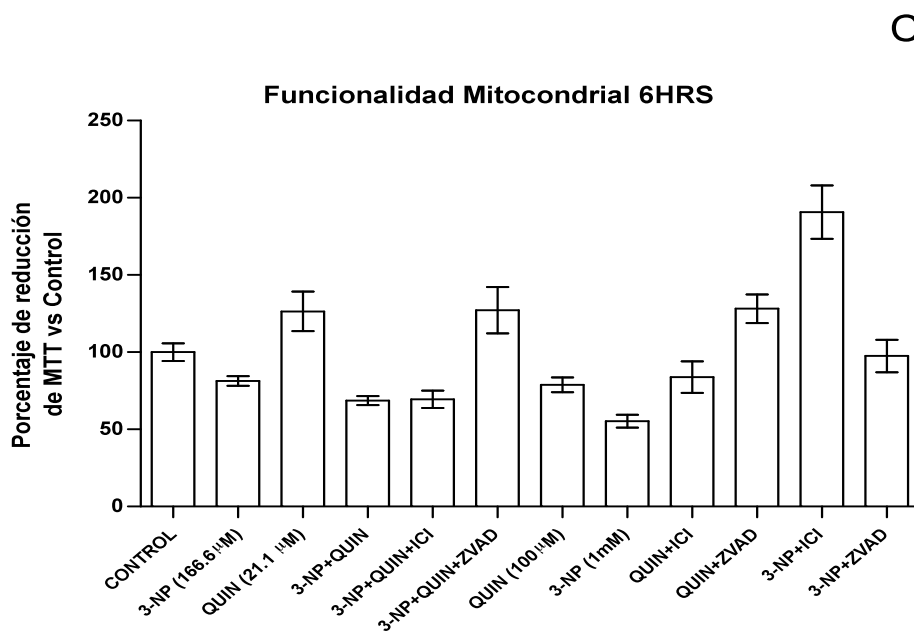
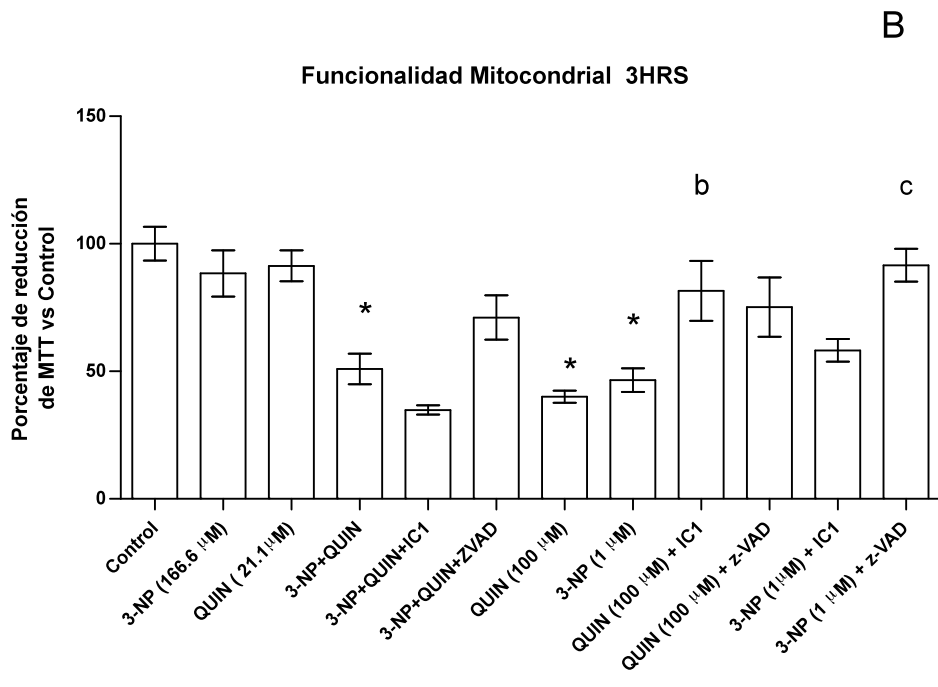
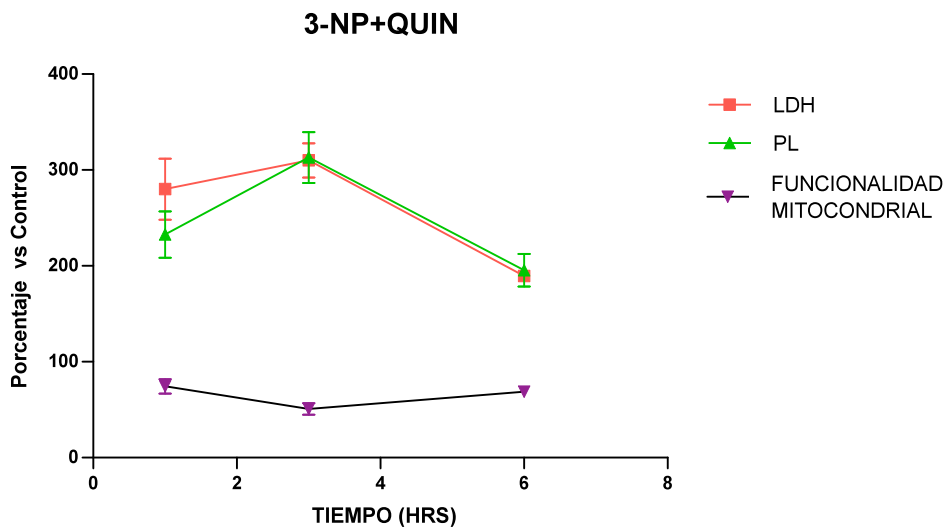


Figura 28. Efecto de los inhibidores de proteasas en la disfunción mitocondrial evocada por QUIN + 3-NP, QUIN_{tóxico} y 3-NP_{tóxico}. Se muestra la reducción de MTT a 1, 3 y 6 h (A, B y C, respectivamente) después de la exposición con las toxinas y los tratamientos con los inhibidores de proteasas. En ambas gráficas se presenta la media ± SEM de seis experimentos por grupo. *P<0.01, significativamente diferente de control; ^aP<0.01, significativamente diferente de QUIN + 3-NP; ^bP<0.01, significativamente diferente de QUIN_{tóxico}; ^cP<0.01, diferente significativamente de 3-NP_{tóxico}.

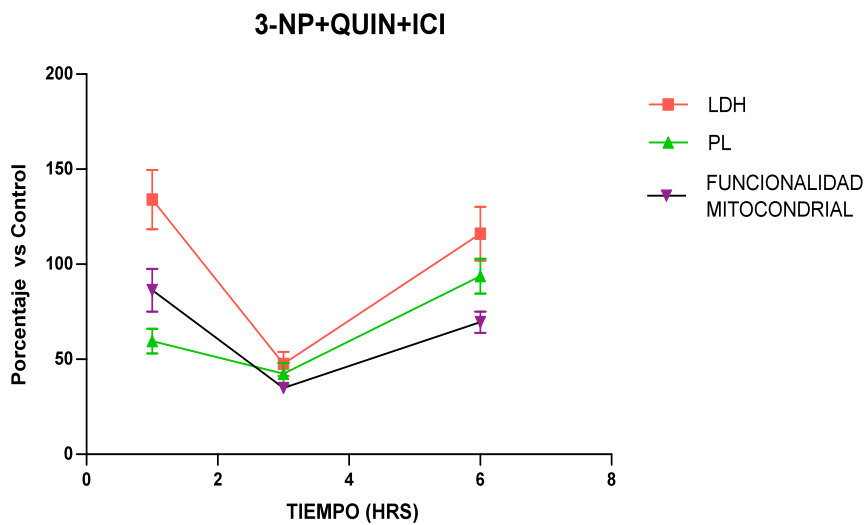
27.4 Correlación para el modelo de 3-NP + QUIN

En la figura 29 se muestran las gráficas de correlación a 1, 3 y 6 h después de la exposición a 3-NP + QUIN (A) evaluando la PL, la actividad de LDH y la funcionalidad mitocondrial. En B y en C se presenta el efecto del IC1 y z-VAD, respectivamente, en las alteraciones evocadas por la co-administración de 3-NP + QUIN en los diferentes marcadores evaluados (Tabla 5).

A



B



C

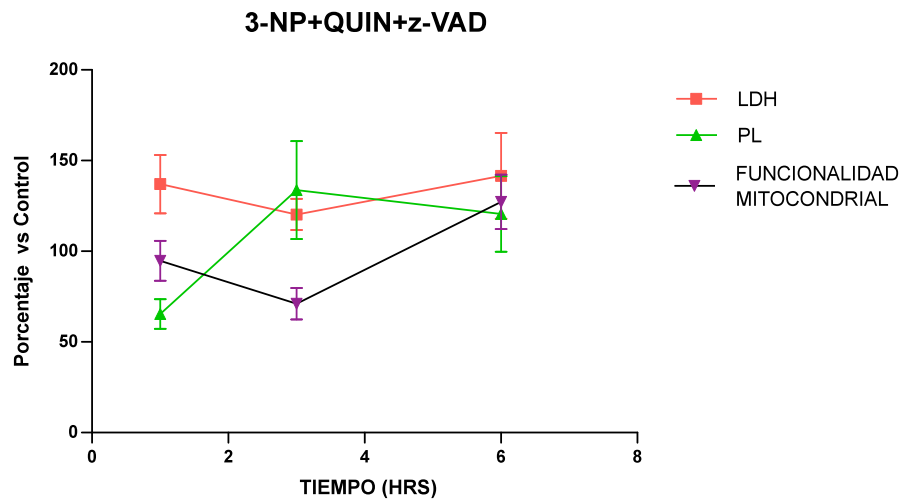


Figura 29. Gráficas de correlación para el modelo de 3-NP + QUIN.

PL	1 H	3H	6H
QUIN + 3-NP	232	313	195
QUIN + 3-NP + ICI	59.6	42	93
QUIN + 3-NP + Z-VAD	65.4	133	120

A

LDH	1 H	3H	6H
QUIN + 3-NP	281	310	189
QUIN + 3-NP + ICI	134	47	116
QUIN + 3-NP + Z-VAD	137	120	141

B

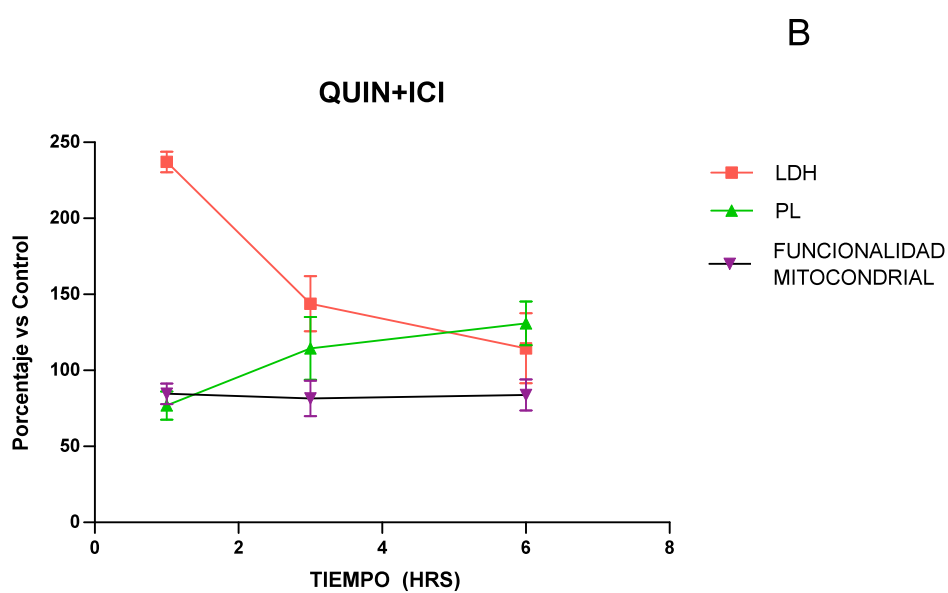
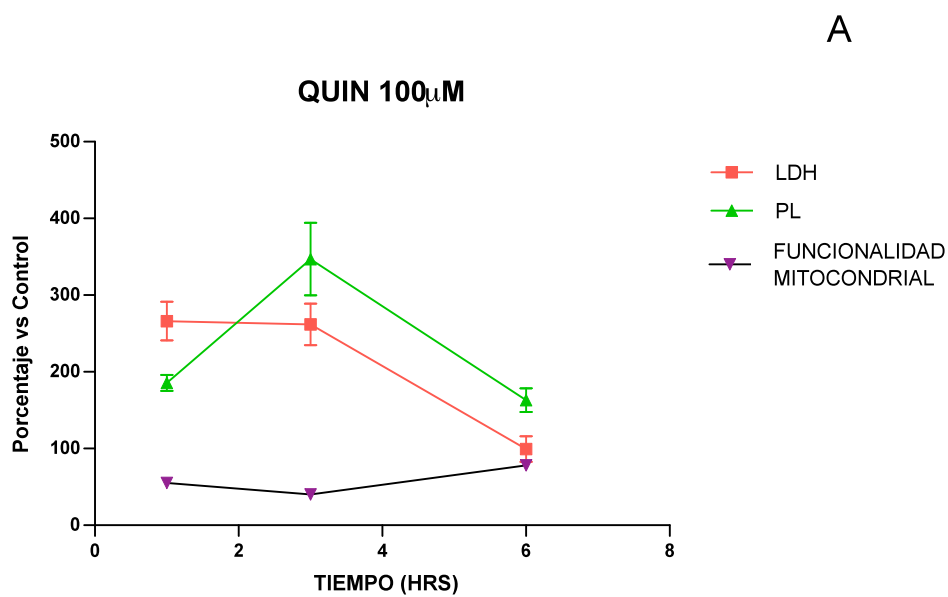
Funcionalidad mitocondrial	1 H	3H	6H
QUIN + 3-NP	74	50	68
QUIN + 3-NP + ICI	86	34	69
QUIN + 3-NP + Z-VAD	94	71	127

C

Tabla 5. Representación en porcentajes de las alteraciones presentadas a 1, 3 y 6 h de exposición a QUIN + 3-NP y los inhibidores de proteasas. En A, se presentan los efectos en la peroxidación de lípidos; en B, la actividad de LDH, y en C la funcionalidad mitocondrial.

27.5 Correlación para el modelo de QUIN_{tóxico}

En la figura 30 se muestran las gráficas de correlación a 1, 3 y 6 h después de la exposición a QUIN_{tóxico} (A) evaluando la PL, la actividad de LDH y la funcionalidad mitocondrial. En B y en C se presenta el efecto del IC1 y z-VAD, respectivamente, en las alteraciones evocadas por el QUIN_{tóxico} en los diferentes marcadores evaluados (Tabla 6).



C

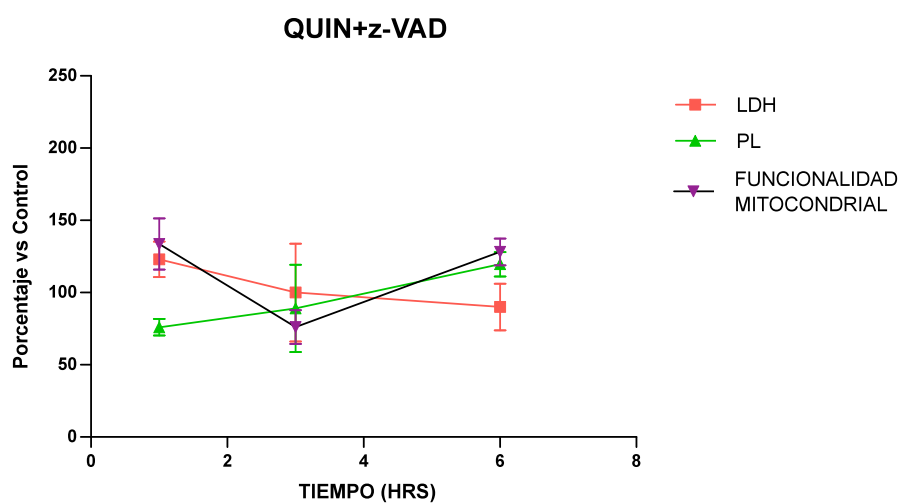


Figura 30. Gráficas de correlación para el modelo de QUIN_{tóxico}

PL	1 H	3 H	6 H
QUIN _{tóxico}	185	346	162
QUIN _{tóxico} + ICI	76	114	130
QUIN _{tóxico} + Z-VAD	76	89	119

A

LDH	1 H	3 H	6 H
QUIN _{tóxico}	266	261	99
QUIN _{tóxico} + ICI	237	143	114
QUIN _{tóxico} + Z-VAD	123	100	90

B

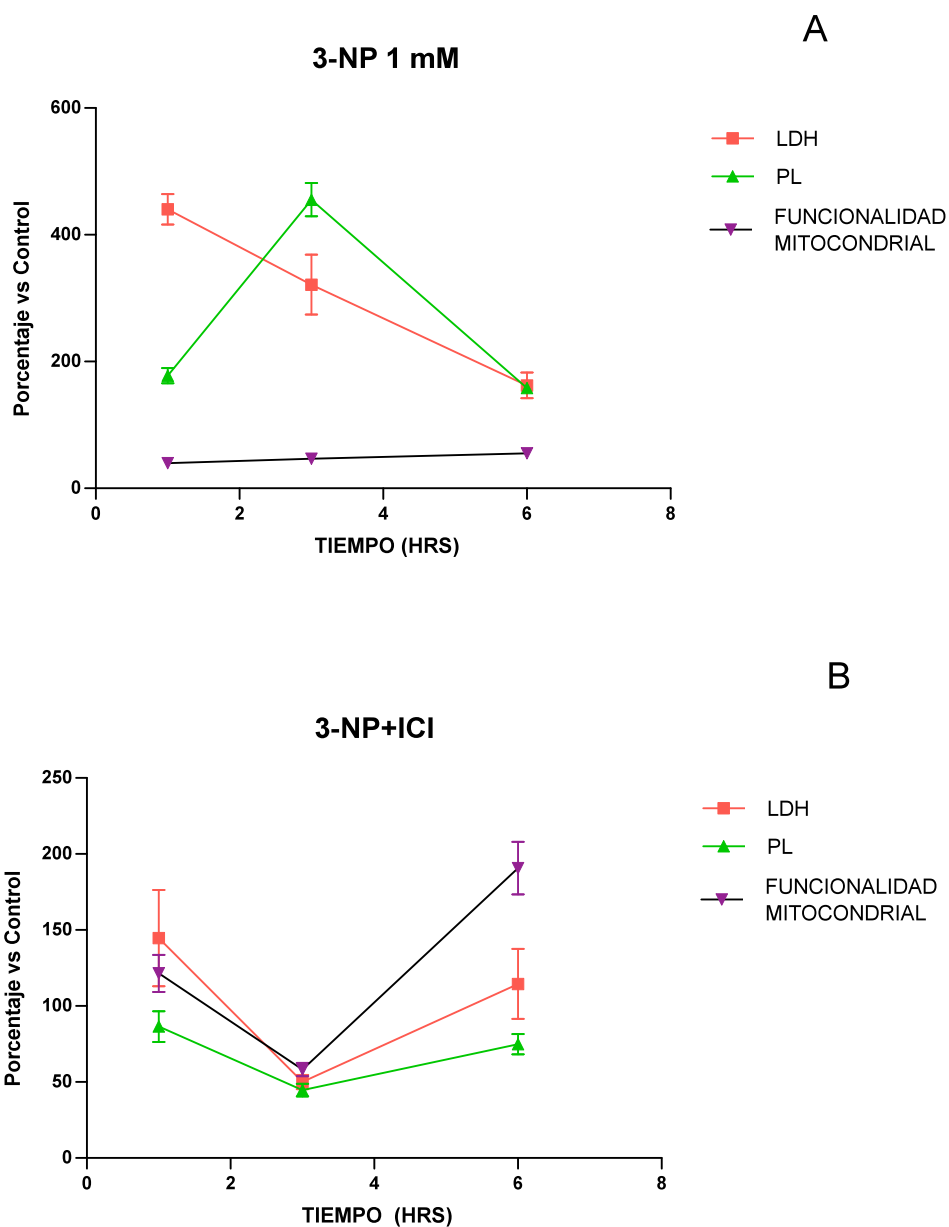
Funcionalidad Mitochondrial	1 H	3 H	6 H
QUIN _{tóxico}	55	40	78
QUIN _{tóxico} + ICI	84	81	83
QUIN _{tóxico} + Z-VAD	133	75	128

C

Tabla 6. Representación en porcentajes de las alteraciones presentadas a 1, 3 y 6 h de exposición a QUIN_{tóxico} y los inhibidores de proteasas. En A se presentan los efectos en la PL, en B la actividad de LDH, y en C la funcionalidad mitocondrial.

27.6 Correlación para el modelo de 3-NP_{tóxico}

En la Figura 31 se muestran las gráficas de correlación a 1, 3 y 6 horas después de la exposición a 3-NP_{tóxico} (A) evaluando la PL, actividad de LDH y la funcionalidad mitocondrial. En B y en C se presenta el efecto del IC1 y z-VAD, respectivamente, en las alteraciones evocadas por el 3-NP_{tóxico} en los diferentes marcadores evaluados (Tabla 7).



C

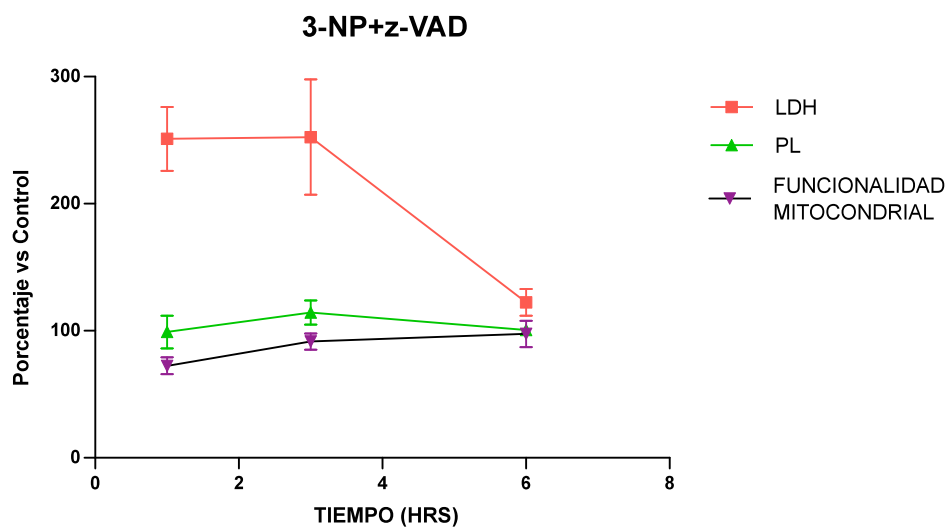


Figura 31. Gráficas de correlación para el modelo de 3-NP_{tóxico}

PL	1 H	3H	6H
3-NP_{tóxico}	177	455	158
3-NP_{tóxico} + ICI	86	44	74
3-NP_{tóxico} + Z-VAD	99	114	100

LDH	1 H	3 H	6 H
3-NP_{tóxico}	440	321	162
3-NP_{tóxico} + ICI	144	50	114
3-NP_{tóxico} + Z-VAD	251	252	122

Funcionalidad mitocondrial	1 H	3 H	6 H
3-NP_{tóxico}	39	46	55
3-NP_{tóxico} + ICI	121	58	190
3-NP_{tóxico} + Z-VAD	72	91	97

Tabla 7. Representación en porcentajes de las alteraciones presentadas a 1, 3 y 6 h de exposición a 3-NP_{tóxico} y los inhibidores de proteasas. En A se presentan los efectos en la PL, en B la actividad de LDH, y en C la funcionalidad mitocondrial.

27.7 Efecto protector de los inhibidores de proteasas sobre la degradación de DNA inducida por la co-administración de QUIN + 3-NP

En la Figura 32 se presenta el patrón de degradación del DNA a 6 y 24 h (A y B, respectivamente) después de la incubación con QUIN + 3-NP, así como el efecto de los inhibidores de proteasas sobre este marcador. Se puede observar que a las 6 h de incubación la coadministración de QUIN + 3NP no muestra tener ningún efecto sobre el DNA, mientras que a las 24 h se observa un patrón de degradación evocado por la co-administración (línea 5) y el cual es prevenido por ambos inhibidores de proteasas (línea 6 y 7).

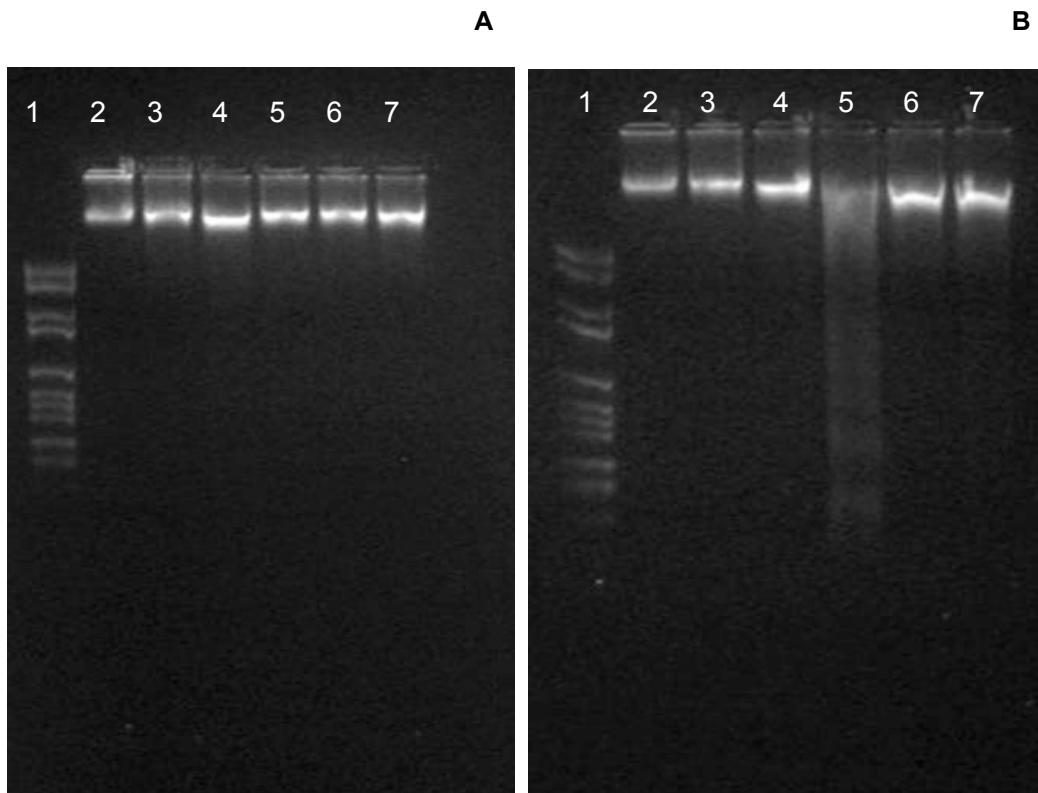


Figura 32. Efecto de los inhibidores de proteasas en la degradación de DNA inducida por la co-administación de QUIN + 3-NP. En A) se muestra el efecto 6 horas después de la incubación y en B) 24 horas después. Para ambos tiempos, en la línea 1 se presenta el marcador de peso molecular de 100 pb, en 2 se presenta el control, en 3 se presenta el QUIN_{subt}, en 4 se muestra el 3-NP_{subt}, en 5 se muestra la co-administración de QUIN + 3-NP, y en 6 y 7 se muestra el efecto de IC1 y z-VAD (respectivamente) sobre el patrón de degradación de QUIN + 3-NP.

28. Discusión

En este trabajo, a través del empleo de una preparación biológica preservada en un medio fisiológico adecuado (rebanadas estriatales), hemos abordado una aproximación a la caracterización de un posible papel de proteasas de naturaleza y acción diferencial (caspasas y calpainas) en tres distintos modelos de daño neuronal. En primera instancia, dicha preparación reviste ya una importancia mayor, debido a que muchos de los reportes que hasta ahora han abordado estos paradigmas, cuando se realizan bajo condiciones experimentales *in vitro*, optan por el empleo de los cultivos celulares (García & Massieu, 2003; Nars et al., 2003, Pellerin & Magistretti, 1994; Kasischke et al., 2004). La ventaja de usar rebanadas radica en que las rebanadas de tejido estriatal tiene un contenido “natural” de células gliales y neuronas, que en turno semeja más las condiciones de daño a un tejido neuronal íntegro, debido básicamente a que las proporciones de estos tipos celulares se mantienen (~ 90 % de células gliales vs. el remanente de células neuronales). Ahora bien, por qué esto es relevante y confiere a nuestra preparación una ventaja sobre los cultivos? Existen diversos elementos que pueden sustentar positivamente esta cuestión: 1) No solo las neuronas son susceptibles de ser atacadas por estos agentes tóxicos, pues si bien los mecanismos por los cuales las células gliales son afectadas aún no están del todo establecidos, hasta ahora se sabe que estas células también resienten los efectos de los agentes neurotóxicos (Schurr et al., 1994; Kasischke et al., 2004); 2) De igual manera, en términos de la posible contribución de la glia a la resistencia, plasticidad y/o neuroprotección, esta preparación proporciona un esquema más cercano a los posibles efectos obtenidos de experimentos *in vivo*, dado que se sabe que el contenido de células gliales en los cultivos es mínima (~10 %), tomándose incluso este criterio como un valor “aceptable” de contaminación de los cultivos (comunicación personal); 3) la obtención y el manejo de las rebanadas, en comparación con los cultivos, es en términos generales, mucho más sencillo, barato y representativo.

Los resultados obtenidos en este estudio reflejan que los tres modelos de toxicidad empleados generan cuadros de toxicidad compleja que involucra el daño oxidativo a lípidos insaturados de las membranas celulares, el compromiso metabólico a través de la disfunción mitocondrial y la muerte celular evidenciada por la liberación/actividad de la LDH, así como el daño al DNA. Todos estos procesos parecen ser dependientes, a juzgar por los resultados del empleo de los inhibidores de proteasas, de la activación de calpaínas y de caspasas. De enorme interés es el hecho de que estos patrones difieren entre los distintos modelos y los diferentes tiempos evaluados, sugiriendo así que aunque los paradigmas empleados comparten elementos comunes – posible facilitación excitotóxica por disminución del metabolismo energético, estrés oxidativo y consecuente muerte celular -, la ocurrencia y preponderancia de los mismos se dá de manera diferencial, estableciendo las bases de lo que bien puede representar un nuevo modelo para simular las alteraciones de la EH, el modelo sinérgico, el cual podría convocar mecanismos de señalización diferentes de los otros dos (por probar en posteriores estudios). A este respecto, previos estudios han demostrado la participación activa de las proteasas en modelos distintos de daño neuronal (Moore et al., 2002). Derivado de estos estudios, la propuesta de una acción mecanística diferencial, dependiente del insulto tóxico empleado se ha ido fortaleciendo. Por ejemplo, la conclusión del estudio de Moore y cols. (2002) - en el cual se probaron los efectos a nivel comparativo, de la estaurosporina, la ceramida, la captotequina, el H₂O₂ y el NMDA

– establece que, aunque todos los insultos tóxicos involucraron la activación de caspasas y calpainas, esta función fue expresada de manera diferencial y estímulo-dependiente. Como ejemplo, mientras que el tratamiento con H₂O₂ fue acompañado de la activación selectiva de las caspasas 1, 6 y 8, pero no de la 3, ninguna caspasa fue activada por el NMDA.

Por otra parte, si bien, la gran cantidad de datos obtenidos en este estudio ha hecho un tanto difícil una interpretación certera de los procesos que ocurren en estos modelos en términos de la preponderancia de los mecanismos asociados a las proteasas y su temporalidad, podemos afirmar que la información obtenida es potencialmente reveladora.

En detalle, el modelo con QUIN a concentraciones tóxicas generó un aumento significativo en los niveles de LP a los tres tiempos probados, con un pico de daño a las 3 h. La capacidad reductora mitocondrial fue disminuída en los tres tiempos probados, siendo el tiempo de 3 hrs de incubación el de efectos más pronunciados, en tanto que la actividad de LDH solamente aumentó a la 1 y 3 h de incubación. Estos resultados sugieren que la muerte celular producida por este modelo en tiempos cortos obedece a la formación temprana de especies reactivas y el compromiso energético, particularmente mostrando una confluencia de estos elementos a las 3 h. Siendo un modelo de excitotoxicidad y daño oxidativo agudos, el QUIN ha representado por mucho tiempo un agente cuyos mecanismos han sido ampliamente estudiados (Schwarcz et al., 1983; Santamaría et al., 2001; Iwahashi et al., 1999). Aunque la hipótesis predominante sobre sus procesos de daño se sigue orientando a la estimulación sostenida de receptores para NMDA (Olney et al., 1969; Stone & Perkins, 1981) y el consecuente daño celular por alteración en los niveles intracelulares de Ca²⁺ (Schwarcz et al., 1983; Matyja, 1997), no se pueden descartar evidencias que muestran que el QUIN también es capaz de ejercer toxicidad directamente a través de la formación de ERO/ERN (Goda et al., 1996; Rodríguez-Martínez et al., 2000; Behan et al., 1999; Santamaría et al., 2001) y/o de la alteración del metabolismo energético (Bordelon et al., 1997; Schuck et al., 2007; Ribeiro et al., 2006). Sean o no epifenómenos del mecanismo basal de daño, los resultados obtenidos en este estudio reflejan que la ocurrencia simultánea de estos elementos conllevan a la muerte celular temprana. En relación a los efectos de los inhibidores de proteasas, los resultados revelan que el IC1 previene totalmente el daño oxidativo inducido por el QUIN a los tres tiempos probados, mientras que la muerte celular por actividad de LDH fue atenuada a las 3 h y prevenida a las 6, pero no a la hora. La funcionalidad mitocondrial fue ligeramente atenuada a los 3 tiempos probados en este modelo. Para el caso del z-VAD, éste inhibidor de caspasas atenuó la PL y la actividad de LDH a los tres tiempos probados, mientras que la reducción del MTT fue totalmente prevenida a 1 y 6 h, y parcialmente a las 3 h. Estos resultados sugieren, en primera instancia que los procesos de daño oxidativo asociados a la muerte celular están mediados aparentemente por la activación simultánea de ambos tipos de proteasas, a juzgar por los efectos de sus inhibidores. Aunque el efecto del z-VAD fue más prominente que el del IC1, no podemos afirmar tajantemente que ésto se deba a una mayor participación de las caspasas en este modelo. Esto se debe a que, en primer lugar, carecemos aún de un correlato de función de las proteasas que demuestre una preponderancia de un tipo sobre otro (p.ej., empleando un sustrato específico de ellas como la fodrina); y en segundo lugar, se ha reportado que el z-VAD, si bien típicamente ha sido empleado para inhibir caspasas, también se ha visto que a ciertas concentraciones puede tener efectos

inhibitorios sobre calpaínas (Bizat et al., 1999). De hecho, se ha ligado más a las calpaínas al daño agudo que al crónico, obedeciendo esto más al patrón ejercido por QUIN.

Para el caso del modelo producido por 3-NP, se encontró que esta toxina produjo un aumento significativo en los niveles de lipoperoxidación a los tres tiempos probados, con un pico máximo de daño a las 3 h. La funcionalidad mitocondrial disminuyó en los tres tiempos probados de manera constante, en tanto que la actividad de LDH aumentó en todos los tiempos probados, teniendo un pico máximo a 1h de incubación. Estos datos demuestran que el compromiso energético de las células expuestas a la toxina conlleva a la formación de ERO y a la muerte celular, especialmente a tiempos tempranos. Nuestros hallazgos confirman estudios previos que muestran que a concentraciones >1 mM, el 3-NP es capaz de aumentar la liberación de LDH en cultivos corticales (Almeida et al. 2004), y reflejan que la inhibición de enzimas en la cadena de transporte de electrones conduce al incremento en la fuga de los mismos desde la mitocondria y la consecuente producción de ERO. Adicionalmente, los inhibidores de proteasas para este modelo revelaron que el inhibidor de calpains (ICI) es capaz de disminuir hasta por debajo de los niveles basales la PL en los tres tiempos probados, así como también de atenuar el aumento en la actividad de LDH a los tiempos evaluados, mientras que el estatus energético únicamente logra ser prevenido por el ICI a 1h y 6 h de incubación. Para el caso del inhibidor de caspasas (z-VAD), los resultados muestran que este agente es capaz de atenuar la PL a los tres tiempos probados; sin embargo, únicamente atenúa la actividad de la LDH y la disfunción mitocondrial a 1 y 3 h de incubación, siendo las 6 h después de la incubación el único tiempo que muestra protección total por el z-VAD en estos dos últimos marcadores. Estos resultados conducen a asumir la participación de ambas proteasas en el daño evocado por esta toxina, aunque al juzgar por el efecto de su inhibidor, las calpains parecen estar participando de una forma más activa. En un entorno teórico, estos hallazgos confirman estudios previos en los cuales se observa que el 3-NP aumenta la activación de caspasas 3, la actividad de calpains y la liberación de LDH tanto *in vitro* como *in vivo*, siendo las calpaínas las mayores efectoras de muerte neuronal en estos estudios (Almeida et al., 2004; Nars et al., 2003; Bizat et al., 2003a). En contraste, diversos estudios muestran que la activación de caspasas y/o calpains es un evento dependiente de las condiciones experimentales empleadas para este modelo tóxico; es decir, depende de las concentraciones de 3-NP empleadas, el tiempo de exposición, etc. (Almeida et al., 2004; Galas et al., 2004; Nars et al., 2003). Por ejemplo, a concentraciones menores (< 1 mM), se produce típicamente una muerte apoptótica mediada parcialmente por la activación selectiva de la caspasa-3, mientras que concentraciones mayores generan una muerte tanto apoptótica como necrótica, siendo las calpaínas las proteínas encargadas de modular dicho proceso (Almeida, 2004).

Por su parte, la co-administración de QUIN + 3-NP (modelo sinérgico) mostró un aumento en los niveles de lípidos peroxidados y en la actividad de LDH, así como una disminución en la capacidad reductora mitocondrial a los tres tiempos probados, siendo las 3 h el pico máximo de los efectos obtenidos por estas toxinas en los marcadores antes mencionados. Adicionalmente, el modelo fue capaz de inducir una degradación del DNA 24 h después de la incubación, pero no a las 6 h (dato no mostrado). La fragmentación del DNA ha sido interpretada en diferentes estudios como una aproximación a la muerte apoptótica, debido al corte específico en la estructura del DNA por acción de

las proteasas. El hecho de que en este trabajo hayamos obtenido un patrón de degradación y no uno de fragmentación, si bien no es evidencia contundente de la falta de procesos apoptóticos, si es una sugerencia de que, ya sea a través de calpaínas o caspasas, el mecanismo de muerte predominante es la necrosis, una cuestión que requiere confirmación experimental posterior. Estos datos también sugieren que el modelo generado por la condición QUIN + 3-NP produce un efecto sinérgico sobre el daño oxidativo, el déficit energético, el daño al DNA y la muerte celular. Estudios previos reportan que las alteraciones en el metabolismo energético en otros modelos sinérgicos o de facilitación producidos por las combinaciones de otras neurotoxinas hacen a las células más vulnerables a concentraciones normales de glutamato, causando así la muerte a través de procesos conocidos como “excitotoxicidad secundaria” (Massieu et al., 2000; Del Rio et al., 2007; Novelli et al., 1998); esta muerte celular resulta de la facilitación de la apertura del receptor para NMDA debido a que el compromiso energético disminuye la producción de ATP, el cual es necesario para mantener el potencial de membrana. La disminución en el ATP, en turno, será responsable de despolarización de la membrana por falta de actividad en las ATPasas, y con ello la apertura de los receptores para NMDA. Esto es apoyado por estudios que muestran que la co-administración de malonato a concentraciones subumbrales (en presencia de glutamato, NMDA o AMPA) incrementa la vulnerabilidad neuronal a los efectos excitotóxicos producidos por la estimulación de los receptores para NMDA (Greene & Greenamyre). Todas estas consideraciones van a favor de una estrecha relación entre el metabolismo energético y la excitotoxicidad, apuntando a la cuestión de que, muy probablemente, el Ca^{2+} de origen extracelular que cruza masivamente el poro asociado al receptor para NMDA sea el responsable mayoritario de dicha “excitotoxicidad secundaria”; sin embargo, recientemente Jaquard y colaboradores (2007) mostraron que en animales con alteraciones mitocondriales inducidas por 3-NP, y activación moderada de los receptores para NMDA por QUIN, el aumento sinérgico en la degeneración estriatal involucró primordialmente la desregulación del Ca^{2+} intracelular en ausencia de hipersensibilización del receptor para NMDA, lo cual, en primera instancia, sugiere que en este modelo en particular, y en contraste con las otras combinaciones de neurotoxinas ya descritas aquí, los mecanismos de toxicidad bien podrían implicar vías de señalización diferentes, que posteriormente se traduzcan en efectos distintos no solo a los mencionados modelos por combinación, sino incluso a los modelos tóxicos evocados por las toxinas probadas de manera independiente. Estos hallazgos son apoyados por un reporte reciente de nuestro grupo (fracción intermedia de esta tesis), en el cual mostramos que el Ca^{2+} intracelular juega un papel más importante en el daño oxidativo evocado en este paradigma en condiciones *in vitro*, pues su contribución a la lipoperoxidación fue mayor que aquella proveniente del calcio de origen extracelular.

En consecuencia, este modelo sinérgico es de gran importancia para estudiar otras vías diferentes a las ya propuestas por la sensibilización del receptor para NMDA, debido a alteraciones energéticas. Retomando esta discusión, diversos estudios han apoyado la hipótesis de que el efecto sinérgico observado al co-administrar una toxina mitocondrial junto con un agonista de receptor para NMDA es debido primordialmente a la hipersensibilización del receptor para NMDA. Por ejemplo, se ha observado que el QUIN (4 mM), junto con el malonato (400 mM), aumenta el volumen de lesión estriatal en animales infundidos por esta toxina, y este efecto es bloqueado por el antagonista de

receptor para NMDA (Bazzett et al., 2004). También se ha sugerido que la inhibición de los transportadores de glutamato aumenta la muerte neuronal evocada por 3-NP (García et al., 2001) por una mayor disponibilidad del neurotransmisor en el medio. Sin embargo, el grupo de Jaquard es el primero en mencionar que la co-administración subtóxica de QUIN + 3-NP conlleva a un aumento en los niveles de Ca^{2+} intracelular, un aumento en la actividad de calpains y en la muerte neuronal, lo cual, de acuerdo a sus resultados, es independiente de la corriente entrante de calcio mediada por el receptor para NMDA. A la luz de estos hallazgos, y considerando que la “facilitación” de la estimulación del receptor para NMDA puede no ser el mayor mecanismo tóxico en este modelo, surge la pregunta de qué es lo que hace a este modelo diferente a otros que emplean también análogos del glutamato e inhibidores del metabolismo energético? En este punto especulamos que la respuesta puede radicar en diferentes elementos inherentes específicamente a este modelo. En primer lugar, la naturaleza endógena del QUIN, comparada con aquella del glutamato, es diferente. Para el primero, un involucramiento directo de la síntesis de la toxina en las células gliales lo ubica topográficamente en dichas células (Pérez-De La Cruz et al., 2007). A este respecto, se sabe que la toxicidad del QUIN involucra la activación de las células gliales (Ryu et al., 2004), consecuentemente evocando elementos de neuroinflamación asociados a muerte necrótica. Incluso, las células gliales son susceptibles a la acción tóxica del QUIN, tanto como se ha reportado que lo son para el 3-NP (Fukuda et al., 1998), por lo que la contribución de dichos tipos celulares al patrón obtenido en este modelo no debe minimizarse, e incluso es motivo de estudio más detallado a la luz de la predominancia de los tipos celulares gliales en la preparación de rebanadas. Más aún, a diferencia del glutamato y otros análogos, la toxicidad del QUIN puede verse potenciada por metabolitos endógenos de la misma vía, tales como la 3-HK, en mecanismos que bien pueden ser independientes de la activación de receptores para NMDA (Guidetti & Schwarcz, 1999). De hecho, parte de la toxicidad del QUIN bien podría obedecer a elementos independientes de la activación de receptores para NMDA, dado que nuestro y otros grupos han demostrado que existe un componente citotóxico, que si bien es moderado en magnitud en relación al elemento excitotóxico típico, también puede estar contribuyendo al daño celular. Parte de estos mecanismos pueden obedecer a la capacidad pro-oxidante intrínseca del QUIN, que en turno, aunada al daño por el 3-NP puede generar un patrón distinto al de las toxinas por separado. Más aún, si la toxicidad del QUIN llega a involucrar a la 3-HK, ambos agentes bien podrían estimular aún más el componente pro-oxidante del QUIN bien caracterizado (Guidette & Schwarcz, 1999). De similar importancia es la posibilidad de que el QUIN sea capturado por las células gliales, probablemente compitiendo con algún transportador para aminoácidos (no probado) y genere sus efectos tóxicos intracelulares de manera independiente al receptor para NMDA, potenciando así al 3-NP, o viceversa. Cualquiera que sea el mecanismo, es indudablemente dependiente de proteasas y abre una línea nueva y prometedora de estudio para este nuevo modelo de la EH.

Finalmente, el z-VAD (inhibidor de caspasas) mostró en este modelo sinérgico una atenuación de los niveles de PL y LDH, así como una prevención casi total de la funcionalidad mitocondrial a los tres tiempos probados. El IC1 mostró una disminución hasta por debajo de los niveles basales de la PL a los tres tiempos evaluados. La actividad de LDH fue atenuada por este inhibidor a todos los tiempos evaluados, siendo las 3 h el tiempo al cual se alcanzó un efecto mayor. En cuanto a la reducción de

MTT, el IC1 únicamente fue capaz de atenuar la disminución en este marcador a 1h después de la incubación. Es importante mencionar que el efecto del IC1 fue mucho mayor que el ejercido por el z-VAD. Ambos inhibidores de proteasas previnieron la degradación de DNA 24 h después de la incubación con las toxinas. Estos resultados sugieren la participación de ambas proteasas en este nuevo modelo de daño neuronal, y son apoyados por el trabajo de Jaquard, en el cual se muestra que la alteración de la homeostasis de Ca^{2+} intracelular evocada por QUIN y 3-NP *in vivo* involucra un aumento en la actividad de calpainas. La recuperación que observamos en la funcionalidad mitocondrial en estos modelos bien podría ser debida a la nueva síntesis de enzimas mitocondriales, lo cual ha sido mostrado en el modelo de 3-NP (Brouillet et al., 1998).

Finalmente, la magnitud de los efectos de daño inducidos por el QUIN fue comparativamente menor a la producida por el 3-NP, el cual a su vez fue en términos generales más potente incluso que el modelo sinérgico. La enorme diferencia entre ellos es que, el modelo con 3-NP produjo mayores niveles de actividad de LDH, sugiriendo ésto que, a diferencia de los otros dos modelos, la activación de mecanismos de daño en éste conlleva más a la muerte celular. El significado específico de ésto radica en que algunos insultos tóxicos pueden favorecer la expresión de marcadores de daño, pero no llevar a la muerte debido a que las células pueden generar cierta resistencia por procesos de plasticidad y adaptación (caso del QUIN), pero otros comprometen a tal nivel el metabolismo celular, que es prácticamente imposible generar en tiempo estos procesos de resistencia (caso del 3-NP). Obviamente, esto requiere comprobación por estudios posteriores y evidencia morfológica.

Consideraciones finales

En resumen, este trabajo nos muestra que los tres modelos probados comparten mecanismos de daño pero de manera diferencial en magnitud, preponderancia y tiempo. Dado que la co-administración de QUIN+3-NP muestra ser un nuevo paradigma a estudiar es importante caracterizar las vías que están involucradas en el patrón de daño que evoca este modelo. Esto es, teniendo en cuenta que la desregulación en la homeostasis de Ca^{2+} en este modelo nos lleva a la activación de calpains, es importante saber si hay alguna retroalimentación positiva o negativa con la activación de caspasas, las cuales de acuerdo a nuestros datos también juegan un papel importante. Adicionalmente, ver si este modelo sinérgico comparte vías de señalización ya caracterizadas para cada una de las toxinas de manera individual, para el caso de 3-NP se ha caracterizado la activación de la vía calpains/cdk5 (Crespo-Biel et al., 2008) y la activación de la vía antioxidante Nrf2/OH-1 (Guzman-Beltran et al., 2008), la sobre regulación de BCL-2 (Dunschede et al., 2008); mientras que para el QUIN se ha observado un aumento en la actividad de la PARP, de JNK, de la caspasa 3, de P53 y de MARK (Napolitano et al., 2008; Garcia et al., 2002; Gavalda et al., 2008; Cao et al., 2005; Maldonado et al., 2005; Oo et al., 1999)

29. Conclusiones

- El efecto de la co-administración de ambas toxinas a concentraciones subtóxicas aumentó la PL, la disfunción mitocondrial y la actividad de LDH en rebanadas estriatales de rata, mostrando un efecto máximo a las 3 hrs. de incubación.
- Los inhibidores de proteasas disminuyeron la actividad de LDH y la PL de manera significativa en el modelo sinérgico, aunque a las 3 horas de incubación únicamente el z-VAD tiende a aumentar la funcionalidad mitocondrial.
- La co-incubación de las toxinas mostró un patrón de degradación de ADN que difiere de una fragmentación típica de apoptosis, misma que fue atenuada por el empleo de z-VAD y de IC1 de manera similar.
- Administrado de manera aislada, el QUIN aumentó la PL y la actividad de la LDH, y disminuyó sustancialmente la funcionalidad mitocondrial a 1 y 3 horas de incubación.
- Los inhibidores de proteasas (ambos) bloquearon eficazmente el efecto del QUIN en los marcadores probados y descritos en el punto anterior.
- A las concentraciones utilizadas de inhibidores, el z-VAD parece ser más eficaz al modular los marcadores evaluados en el modelo por QUIN
- Como se esperaba, la PL y la actividad de LDH aumentaron después de 1 y 3 horas de incubación con el 3-NP, mientras que la funcionalidad mitocondrial disminuyó a los tres tiempos probados.
- Los inhibidores de proteasas atenuaron la PL y la actividad de LDH, aunque el inhibidor de calpainas lo hizo de manera más significativa a todos los tiempos probados.
- La funcionalidad mitocondrial únicamente fue atenuada por el z-VAD a las 3 horas de incubación con la toxina.
- Nuestros resultados sugieren que el modelo sinérgico tiene mecanismos de acción diferentes a los implicados típicamente por las toxinas solas a concentraciones tóxicas, aunque los tres modelos comparten en mayor o menor medida los tres elementos probados.

30. Bibliografía

- Abdel-Hamid KM, Tymianski M. 1997. Mechanisms and effects of intracellular calcium buffering on neuronal survival in organotypic hippocampal cultures exposed to anoxia/aglycemia or to excitotoxins. *J Neurosci.* 17(10):3538-53.
- Abu-Soud H, Gachhui R, Raushel F, Stuehr D. 1997. The ferrous-dioxy complex of neuronal nitric oxide synthase. Divergent effects of L-arginine and tetrahydrobiopterin on its stability. *J Biol Chem* 272: 349-353.
- Adams JM, Cory S. 2002. Apoptosomes: engines for caspase activation. *Curr Opin Cell Biol.* 2002 Dec;14(6):715-20.
- Aikens J, Dix TA. 1991. Peroxy radical (HOO•) initiated lipid peroxidation: the role of fatty acid hydroperoxides. *J Biol Chem* 266:15091-15098.
- Albin RL, Young AB, Penney JB. 1989. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* 12:366-375.
- Albin RL, Greenamyre JT. 1992. Alternative excitotoxic hypotheses. *Neurology.* 1992 Apr;42(4):733-8.
- Alexander GE, Crutcher MD. 1990. Functional architecture of basal ganglia circuits: Neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci* 13:266-271.
- Alexi T, Hughes PE, Faull RL, Williams CE. 1998. 3-Nitropropionic acid's lethal triplet: cooperative pathways of neurodegeneration. *NeuroReport* 9: 57-64.
- Aleyasin H, Cregan SO, Iyirhiaro G, O'Hare MJ, Callaghan SM, Snack RS. 2004. Nuclear factor- κ B modulates the p53 response in neurons exposed to DNA damage. *J Neurosci* 24: 2963-2973.
- Almeida S, Domínguez A, Rodrigues L, Oliveira CR, Rego AC. 2004. FK506 prevents mitochondrial-dependent apoptotic cell death induced by 3-nitropropionic acid in rat primary cortical cultures. *Neurobiol Dis*, 17: 435-444.
- Alston TA, Mela L, Bright HJ. 1977. 3-Nitropropionate, the toxic substance of *Indigofera*, is a suicide inactivator of succinate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:3767-3771.
- Ambrose CM, Duyao MP, Barnes G, Bates PG, Lin SC, Srinidhi J, *et al.* 1994. Structure and expression of the Huntington's disease gene: evidence against simple inactivation due to an expanded CAG repeat, *Somat Cell Mol Genet* 20: 27-38.
- Anderson RC, MAjak W, Rassmussen MA, Callaway TR, Beier RC, Nisbet DJ, Allison MJ. 2005. Toxicity and metabolism of the conjugates of 3-nitropropanol and 3-nitropropionic acid in forages poisonous to livestock. *J Agric Food Chem* 23:2344-2350.
- Arbor A, DeJong. 1970. George Huntington (1850-1916). *The Founders of Neurology*, Editado por W Haymaker W y F Schiller. Segunda Edición 4523-456.
- Armstrong RC, Aja TJ, Hoang KD, Gaur S, Bai X, Alnemri ES, Litwack G, Karanewsky DS, Fritz LC, Tomaselli KJ. 1997. Activation of the CED3/ICE-related protease CPP32 in cerebellar granule neurons undergoing apoptosis but not necrosis. *J Neurosci.* 17(2):553-62.
- Asai A, Qiu J, Narita Y, Chi S, Saito N, Shinoura N, Hamada H, Kuchino Y, Kirino T. 1999. High level calcineurin activity predisposes neuronal cells to apoptosis. *J Biol Chem.* 274(48):34450-8.
- Aykac-Toker G, Bulgurcuoglu S, Kocak-Toker N. 2001. Effect of peroxyxynitrite on glutaredoxin. *Hum Exp Toxicol* 20: 373-376.
- Azzarelli A. 2000. Enfermedad de Huntington y degeneraciones de algunos núcleos subcorticales. *Neuropatología, diagnóstico y clínica.* Edimssa 603-620.
- Baghdiguian S, Martin M, Richard I, Pons F, Astier C, Bourg N, Hay RT, Chemaly R, Halaby G, Loiselet J, Anderson LV, Lopez de Munain A, Fardeau M, Mangeat P, Beckmann JS, Lefranc G. 1999. Calpain

- 3 deficiency is associated with myonuclear apoptosis and profound perturbation of the I κ B α /NF- κ B pathway in limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Nat Med.* 5(5):503-11.
- Bandyopadhyay U, Das D, Banerjee RK. 1999. Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis. *Curr Sci* 77:658-666
- Bazzett TJ, Falik RC, Becker JB, Albin RL. 1996. Synergistic effects of chronic exposure to subthreshold concentrations of quinolinic acid and malonate in the striatum. *Brain Research* 718: 228-232.
- Beal MF, Kowall NW, Ellison DW, Mazurek MF, Swartz KJ, Martin JB. 1986. Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. *Nature* 321:168-171.
- Beal MF. 1992. Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illnesses? *Ann Neurol* 31:119-130.
- Beal MF. 1994. Neurochemistry and toxin models in Huntington's disease. *Current Opinion in Neurology* 7: 542-547.
- Beal MF, Brouillet E, Jenkins BG, Ferrante RJ, Kowall NW, Miller JM, Storey E, Srivastava R, Rosen BR, Hyman BT. 1993. Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J Neurosci* 13:4181-4192.
- Beal MF, Ferrante R, Browne S, Matthews R, Kowall N, Brown RH. 1997. Increased 3-nitrotyrosine in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 42: 644-654.
- Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. 1990. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 1620-1624.
- Beckman JS, Carson M, Smith CD, Koppenol WH. 1993. ALS, SOD and peroxynitrite. *Nature* 364: 584.
- Beckman JS, Chen J, Ischiropoulos H, Crow JP. 1994. Oxidative chemistry of peroxynitrite. *Meth Enzymol* 223:229-240.
- Beckman JS, Estévez AG, Crow JP, Barbeito L. 2001. Superoxide dismutase and the death of motoneurons in ALS. *Trends Neurosci* 24: S15-S20.
- Benn SC and Woolf CJ. 2004. Adult neuron survival strategies- slamming on the brakes. *Nat Rev Neurosci.* 5 (9): 686-700
- Behan WMH, McDonald M, Darlington LG, Stone TW. 1999. Oxidative stress as a mechanism for quinolinic acid-induced hippocampal damage: protection by melatonin and deprenyl. *Br J of Pharmacol* 128: 1754-1760.
- Behrens MI, Koh J, Canzoniero LM, Sensi SL, Csernansky CA, Choi DW. 1995. 3-Nitropropionic acid induces apoptosis in cultured striatal and cortical neurons. *Neuroreport.* 6(3):545-8.
- Belle NA, Dalmolin GD, Fonini G, Rubin MA, Rocha JB. 2004. Polyamines reduce lipid peroxidation induced by different pro-oxidant agents. *Brain Res* 1008: 245-51
- Berridge MV, Tan AS. 1993. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys* 303(2):474-82.
- Bizat N, Galas MC, Jacquard C, Boyer F, Hermel JM, Brouillet E. 1999. Neuroprotective effect of z-VAD against the neurotoxin 3-nitropropionic acid involves inhibition of calpains.
- Bizat N, Hermel JM, Boyer F, Jacquard C, Créminon C, Ouary S, Escartin C, Hantraye P, Kajewski S, Brouillet E. 2003. Calpain is a major cell death effector in selective striatal degeneration induced in vivo by 3-nitropropionate: implications for Huntington's disease. *J Neurosci.* 23(12):5020-30. Erratum in: *J Neurosci.* 23(30):9960.
- Bizat N, Hermel JM, Humbert S, Jacquard C, Créminon C, Escartin C, Saudou F, Krajewski S, Hantraye P, Brouillet E. 2003b. In vivo calpain/caspase cross-talk during 3-nitropropionic acid-induced striatal

- degeneration: implication of a calpain-mediated cleavage of active caspase-3. *J Biol Chem*. 2003 Oct 31;278(44):43245-53.
- Bizat N, Galas MC, Jacquard C, Boyer F, Hermel JM, Schiffmann SN, Hantraye P, Blum D, Brouillet E. 2005. Neuroprotective effect of zVAD against the neurotoxin 3-nitropropionic acid involves inhibition of calpain. *Neuropharmacology*. 49(5):695-702.
- Bjorklund H, Olson L, Dahl D, Schwarcz R. 1986. Short- and long-term consequences of intracranial injections of the excitotoxin, quinolinic acid, as evidenced by GFA immunohistochemistry of astrocytes. *Brain Res* 371: 267-277.
- Blomgren K, Zhu C, Wang X, Karlsson JO, Leverin AL, Bahr BA, Mallard C, Hagberg H. 2001. Synergistic activation of caspase-3 by m-calpain after neonatal hypoxia-ischemia: a mechanism of "pathological apoptosis"? *J Biol Chem*, 276(13):10191-8.
- Bonfoco E, Krainc C, Ankarcrona M, Nicotera P, Lipton SA. 1995. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 7162-7166.
- Bonini MG, Radi R, Ferrer-Sueta G, Ferriera AM, Augusto O. 1999. Direct EPR detection of carbonate radical anion produced from peroxynitrite and carbon dioxide. *J Biol Chem* 274:10802-10806.
- Bordelon YM, Chesselet MF, Nelson D, Welsh F, Erecinska M. 1997. Energetic dysfunction in quinolinic acid-lesioned rat striatum. *J Neurochem* 69:1629-1639.
- Borlongan CV, Koutouzis TK, Freeman TB, Cahill DW, Sanberg PR. 1995a. Behavioral pathology induced by repeated systemic injections of 3-nitropropionic acid mimics the motoric symptoms of Huntington's disease. *Brain Res*. 697(1-2):254-7.
- Borlongan CV, Koutouzis TK, Randall TS, Freeman TB, Cahill DW, Sanberg PR. 1995b. Systemic 3-nitropropionic acid: behavioral deficits and striatal damage in adult rats. *Brain Res Bull*. 36(6):549-56.
- Borlongan CV, Koutouzis TK, Freeman TB, Hauser RA, Cahill DW, Sanberg PR. 1997. Hyperactivity and hypoactivity in a rat model of Huntington's disease: The systemic 3-nitropropionic acid model. *Brain Res Brain Res Protoc* 1:253-257.
- Branton D, Cohen CM, Tyler J. 1981. Interaction of cytoskeletal proteins on the human erythrocyte membrane. *Cell*, 24(1):24-32.
- Brennan WA, Bird ED, Aprille JR. 1985. Regional mitochondrial respiratory activity in Huntington's disease brain. *J Neurochem* 44: 1948-1950.
- Brignull HR, Morley JF, Garcia SM, Morimoto RI. 2006. Modeling polyglutamine pathogenesis in *C. elegans*. *Methods Enzymol* 412:256-282.
- Brouillet E, Hantraye P, Ferrante RJ, Dolan R, Leroy-Willig A, Kowall NW, Beal MF. 1995. Chronic mitochondrial energy impairment produces selective striatal degeneration and abnormal choreiform movements in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:7105-7109.
- Brouillet E, Condé F, Beal MF, Hantraye P. 1999. Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals. *Prog Neurobiol* 59: 427-468.
- Browne SE, Bowling AC, MacGarvey U, Baik MJ, Berger SC, Muqit MM, Bird ED, Beal MF. 1997. Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: Selective vulnerability of the basal ganglia. *Ann Neurol* 41:646-653.
- Browne SE, Beal MF. 2004. The energetics of Huntington's disease, *Neurochem Res* 29: 531-546.
- Burke JR, Enghild JJ, Martin ME, Jou YS, Myers RM, Roses AD, *et al.* 1996. Huntingtin and DRPLA proteins selectively interact with the enzyme GAPDH, *Nat Med* 2: 347-350.

- Burridge K, Kelly T, Mangeat P. 1982. Nonerythrocyte spectrins: actin-membrane attachment proteins occurring in many cell types. *J Cell Biol*, 95(2 Pt 1):478-86.
- Burton GW, Joyce A, Ingold KU. 1982. First proof that vitamin E is major lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma. *Lancet* 28:327-359.
- Butterworth J, Yates CM, Reynolds GP. 1985. Distribution of phosphate-activated glutaminase, succinic dehydrogenase, pyruvate dehydrogenase and gamma-glutamyl transpeptidase in post-mortem brain from Huntington's disease and agonal cases, *J Neurol Sci* 67: 161-171.
- Camacho A, Montiel T, Massieu L. 2007. Sustained metabolic inhibition induces an increase in the content and phosphorylation of the NR2B subunit of N-methyl-D-aspartate receptors and a decrease in glutamate transport in the rat hippocampus *in vivo*, *Neuroscience* 145: 873-886.
- Canu N, Dus L, Barbato C, Ciotti MT, Brancolini C, Rinaldi AM, Novak M, Cattaneo A, Bradbury A, Calissano P. 1998. Tau cleavage and dephosphorylation in cerebellar granule neurons undergoing apoptosis. *J Neurosci*;18(18):7061-74.
- Cao Y, Gu ZL, Lin F, Han R, Qin ZH. 2005. Caspase-1 inhibitor Ac-YVAD-CHO attenuates quinolinic acid-induced increases in p53 and apoptosis in rat striatum. *Acta Pharmacol Sin* 26: 150-154.
- Carlin RK, Bartelt DC, Siekevitz P. 1983. Identification of fodrin as a major calmodulin-binding protein in postsynaptic density preparations. *J Cell Biol*, 96(2):443-8.
- Carpenedo R, Pittaluga A, Cozzi A, Attucci S, Galli A, Raiteri M, Moroni F. 2001. Presynaptic kynurenate-sensitive receptors inhibit glutamate release. *Eur J Neurosci* 13(11):2141-7.
- Carragher NO, Frame MC. 2002. Calpain: a role in cell transformation and migration. *Int J Biochem Cell Biol* 34:1539-1543.
- Cattaneo E, Zuccato C, Tartari M. 2005. Normal huntingtin function: an alternative approach to Huntington's disease, *Nat Rev Neurosci* 6: 919-930.
- Cha JH, Kosinski CM, Kerner JA, Alsdorf SA, Mangiarini L, Davies SW, Penney JB, Bates GP, Young AB. 1998. Altered brain neurotransmitter receptors in transgenic mice expressing a portion of an abnormal human Huntington disease gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:6480-6485.
- Cheng EH, Kirsch DG, Clem RJ, Ravi R, Kastan MB, Bedi A, Ueno K, Hardwick JM. 1997. Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science*. 278(5345):1966-8.
- Chiarugi A, Meli E, Moroni F. 2001. Similarities and differences in the neuronal death processes activated by 3OH-kynurenine and quinolinic acid. *J Neurochem* 77: 1310-1318.
- Choe M, Jackson C, Yu BP. 1995. Lipid peroxidation contributes to age-related membrane rigidity. *Free Radic Biol Med* 18:977-984.
- Choi DW. 1988. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1(8):623-34.
- Choi JH, YU BP. 1995. Brain synaptosomal aging free radicals and membrane fluidity. *Free Radic Biol Med* 18:133-139.
- Chua BT, Guo K, Li P. 2000. Direct Cleavage by the calcium-activated protease calpain can lead to inactivation of casapases. *The Journal of Biological Chemistry* 275(7): 5131-5135.
- Clementi E, Brown GC, Feelisch M, Moncada S. 1998. Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 7631-7636.
- Coles CJ, Edmondson DE, Singer TP. 1979. Inactivation of succinate dehydrogenase by 3-nitropropionate. *J Biol Chem* 254:5161-5167.
- Conti F, Minelli A, DeBiasi S, Melone M. 1997. Neuronal and glial localization of NMDA receptors in the cerebral cortex. *Mol Neurobiol* 14: 1-18.

- Cooper AJ, Sheu KF, Burke JR, Strittmatter WJ, Blass JP. 1998. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase abnormality in metabolically stressed Huntington disease fibroblasts, *Dev Neurosci* 20: 462-468.
- Croall DE, DeMartino GN. 1991. Calcium-activated neutral protease (calpain) system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev.* 71(3):813-47.
- Crow JP. 2000. Peroxynitrite scavenging by metalloporphyrins and thiolates. *Free Radic Biol Med* 28:1487-1494.
- Cryns V, Yuan J. 1998. Proteases to die for. *Genes Dev* 12: 1551-1570.
- Curzon G. 1996. Brain tryptophan. Normal and disturbed control. *Adv Exp Med Biol* 398: 27-34.
- Cuzzocrea S, Zingarelli B, O'Connor M, Salman A, Szabo C. 1998. Effect of L-buthionine-(S, R)Sulphoximine, an inhibitor of gamma-glutamylcysteine synthetase on peroxynitrite and endotoxic shock-induced vascular failure. *Br J Pharmacol* 123: 525-537.
- Cuzzocrea S, Zingarelli B, Constantino G, Caputi AP. 1999. Beneficial effects of Mn(III)tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin (MnTBAP), a superoxide dismutase mimetic, in carrageenan-pleurisy. *Free Radic Biol Med* 26: 26-333.
- Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D. 2001. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev.* 135-59. Review.
- Cuzzocrea S, Mazzone E, Di Paola R, Esposito E, Macarthur H, Matuschak GM, Salvemini D. 2006. A role for nitric oxide-mediated peroxynitrite formation in a model of endotoxin-induced shock. *J Pharmacol Exp Ther.* 319(1):73-81.
- Darrel EG, Valery FT, Hongqi L, Wei W, Jinyang C. 2003. The calpain system. *Physiol Rev* 83: 731-801.
- Dawbarn D, De Quidt ME, Emson PC. 1985. Survival of basal ganglia neuropeptide Y-somatostatin neurons in Huntington's disease. *Brain Res* 340:251-260.
- Day BJ, Shawen S, Liochev SI, Crapo JD. 1995. A metalloporphyrin superoxide dismutase mimetic protects against paraquat-induced endothelial cell injury, in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* 275: 1227-1232.
- Day BJ, Fridovich I, Crapo JD. 1997. Manganic porphyrins possess catalase activity and protect endothelial cells against hydrogen peroxide-mediated injury. *Arch Biochem Biophys* 347: 256-262.
- Day BJ, Batinic-Haberle J, Crapo JD. 1999. Metalloporphyrins are potent inhibitors of lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med* 26: 730-736.
- Day BJ. 2004. Catalytic antioxidants: a radical approach to new therapeutics. *Drug Discov Today.* 9(13):557-66. Review.
- de Carvalho LP, Bochet P, Rossier J. 1996. The endogenous agonist quinolinic acid and the non endogenous homoquinolinic acid discriminate between NMDAR2 receptor subunits. *Neurochem Int* 28(4):445-52.
- Del Río P, Montiel T, Massieu L. 2007. Exacerbation of excitotoxic neuronal death induced during mitochondrial inhibition *in vivo*: relation to energy imbalance, *Neuroscience* 146: 1561-1570.
- Denicola A, Freeman BA, Trujillo M, Radi R. 1996. Peroxynitrite reaction with carbon dioxide/bicarbonate: kinetics and influence on peroxynitrite-mediated oxidations. *Arch Biochem Biophys* 333:49-58.
- Deng X, Ruvolo P, Carr B, May WS Jr. 2000. Survival function of ERK1/2 as IL-3-activated, staurosporine-resistant Bcl2 kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(4):1578-83.
- Desagher S, Osen-Sand A, Nichols A, Eskes R, Montessuit S, Lauper S, Maundrell K, Antonsson B, Martinou JC. Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol.* 1999,144(5):891-901.

- Dihné M, Block F, Korr H, Töpper R. 2001. Time course of glial proliferation and glial apoptosis following excitotoxic CNS injury. *Brain Res* 902: 178-189
- Dodd PR, Hardy JA, Oakley AE, Edwardson JA, Perry EK, Delaunoy JP. 1981. A rapid method for preparing synaptosomes: comparison with alternative procedures. *Brain Res* 226(1-2):107-18.
- Eastman CL, Guiliarte TR. 1989. Cytotoxicity of 3-hydroxykynurenine in a neuronal hybrid cell line. *Brain Research* 495: 225-231.
- Eguchi Y, Shimizu S, Tsujimoto Y. 1997. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res.* 57(10):1835-40.
- Emerich DF, Thanos CG, Goddard M, Skinner SJ, Geany MS, Bell WJ, Bintz B, Schneider P, Chu Y, Babu RS, Borlongan CV, Boekelheide K, Hall S, Bryant B, Kordower JH. 2006. Extensive neuroprotection by choroid plexus transplants in excitotoxin lesioned monkeys. *Neurobiol Dis* 23:471-480.
- Echtay KS. 2007. Mitochondrial uncoupling proteins--what is their physiological role? *Free Radic Biol Med.* 43(10):1351-71. Review.
- Ferrante RJ, Beal MF, Kowall NW, Richardson EP Jr, Martin JB. 1987a. Sparing of acetylcholinesterase-containing striatal neurons in Huntington's disease. *Brain Res* 411:162-166.
- Ferrante RJ, Kowall NW, Beal MF, Martin JB, Bird ED, Richardson EP Jr. 1987b. Morphologic and histochemical characteristics of a spared subset of striatal neurons in Huntington's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 46:12-27.
- Floris R, Piersma SR, Yang G, Jones P, Wever R. 1993. Interaction of myeloperoxidase with peroxynitrite. A comparison with lactoperoxidase, horseradish peroxidase and catalase. *Eur J Biochem.* 215(3):767-75.
- Foster AC, Vezzani A, French ED, Schwarcz R. 1984. Kynurenic acid blocks neurotoxicity and seizures induced in rats by the related brain metabolite quinolinic acid. *Neurosci Lett* 48(3):273-8.
- Franco JS, Huttenlocher A. 2005. Regulating cell migration: calpains make the cut. *J Cell Sci* 118: 3829-3838.
- Frei B, Stocker R, England L, Ames B. 1990. Ascorbate: the most effective oxidant in human blood plasma. *Adv Exp Med Biol* 264:155-163.
- Fukuda A, Deshpande SB, Shimano Y, Nishino H. 1998. Astrocytes are more vulnerable than neurons to cellular Ca²⁺ overload induced by a mitochondrial toxin, 3-nitropropionic acid. *Neuroscience.* 87(2):497-507.
- Furtado JC, Mazurek MF. 1996. Behavioral characterization of quinolinate-induced lesions of the medial striatum: Relevance for Huntington's disease. *Exp Neurol* 138:158-168.
- Galas MC, Bizat N, Cuvelier L, Bantubungi K, Brouillet E, Schiffmann SN, Blum D. 2004. Death of cortical and striatal neurons induced by mitochondrial defect involves differential molecular mechanisms. *Neurobiol Dis*, 15: 153-159.
- Galpern WR, Matthews RT, Beal MF, Isacson O. 1996. NGF attenuates 3-nitrotyrosine formation in a 3-NP model of Huntington's disease. *Neuroreport* 7(15-17):2639-42.
- García O, Massieu L. 2001. Strategies for neuroprotection against L-trans-2,4-pyrrolidine dicarboxylate-induced neuronal damage during energy impairment in vitro, *J Neurosci Res* 64: 418-428.
- Gardian G, Vecsei L. 2004. Huntington's disease: Pathomechanism and therapeutic perspectives. *J Neural Transm* 111:1485-1494.
- Gardner PR, Nguyen DD, White CW. 1996. Superoxide scavenging by Mn(II/III) tetrakis (1-methyl-4-pyridyl) porphyrin in mammalian cells. *Arch Biochem Biophys* 325: 20-28.

- Ghayur T, Hugunin M, Talanian RV, Ratnofsky S, Quinlan C, Emoto Y, Pandey P, Datta R, Huang Y, Kharbanda S, Allen H, Kamen R, Wong W, Kufe D. 1996. Proteolytic activation of protein kinase C delta by an ICE/CED 3-like protease induces characteristics of apoptosis. *J Exp Med.* 184(6):2399-404.
- Glennay JR Jr, Glennay P, Osborn M, Weber K. 1982. An F-actin- and calmodulin-binding protein from isolated intestinal brush borders has a morphology related to spectrin. *Cell*, 28(4):843-54.
- Goda K, Kishimoto H, Shimizu S, Hamane Y, Ueda M. 1996. Quinolinic acid and active oxygens. Possible contribution of active oxygens during cell death in the brain. *Adv Exp Med Biol* 398:247-254.
- Goldstein LE, Leopold MC, Huang X, Atwood CS, Saunders AJ, Hartshorn M, Lim JT, Faget KY, Muffat JA, Scarpa RC, Chylack LT Jr, Bowden EF, Tanzi RE, Bush AI. 2000. 3-Hydroxykynurenine and 3-hydroxyanthranilic acid generate hydrogen peroxide and promote alpha-crystallin cross-linking by metal ion reduction. *Biochemistry* 39(24):7266-75.
- Goldstein S, Cazapski G. 1998. Formation of peroxyxynitrate from the reaction of peroxyxynitrite with CO₂: Evidence for carbonate radical production. *J Am Chem Soc* 120:3458-3463.
- Grab DJ, Berzins K, Cohen RS, Siekevitz P. 1979. Presence of calmodulin in postsynaptic densities isolated from canine cerebral cortex. *J Biol Chem* 254(17):8690-6.
- Graber S, Maiti S, Halpain S. 2004. Capthepsin B-like proteolysis and MARCKS degradation in sub-lethal NMDA-induced collapse of dendrite spines. *Neuropharmacology* 47: 706-713.
- Gramsbergen JB, Hodgkins PS, Rassoulpour A, Turski WA, Guidetti P, Schwarcz R. 1997. Brain-specific modulation of kynurenic acid synthesis in the rat. *J Neurochem.* 69(1):290-8.
- Graveland GA, Williams RS, DiFiglia M. 1985. Evidence for degenerative and regenerative changes in neostriatal spiny neurons in Huntington's disease, *Science* 227: 770-773.
- Greene JG, Greenamyre JT. 1995. Characterization of the excitotoxic potential of the reversible succinate dehydrogenase inhibitor malonate. *J Neurochem* 64: 430-436.
- Greenacre SA, Ischiropoulos H. 2001. Tyrosine nitration: localization, quantification, consequences for protein function and signal transduction. *Free Radic Res* 34:541-581.
- Greene JG, Sheu SS, Gross RA, Greenamyre JT. 1998. 3-Nitropropionic acid exacerbates N-methyl-D-aspartate toxicity in striatal culture by multiple mechanisms, *Neuroscience* 84: 503-510.
- Griffiths GJ, Dubrez L, Morgan CP, Jones NA, Whitehouse J, Corfe BM, Dive C, Hickman JA. 1999. Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis. *J Cell Biol.* 144(5):903-14.
- Grilli M, Memo M. 1999. Possible role of NF- κ B and p53 in the glutamate-induced pro-apoptotic neuronal pathway. *Cell Death Differ* 6: 22-27.
- Gu M, Gash MT, Mann VM, Javoy-Agid F, Cooper JM, Schapira AH. 1996. Mitochondrial defect in Huntington's disease caudate nucleus. *Ann Neurol* 39:385-389.
- Guidetti P, Schwarcz R. 1999. 3-Hydroxykynurenine potentiates quinolinate but not NMDA toxicity in the striatum. *Eur J Neurosci* 11: 3857-3863.
- Guillemin GJ, Kerr SJ, Smythe GA, Smith DG, Kapoor V, Armati Pj, Croitoru J, Brew BJ. 2001. Kynurenine pathway metabolism in human astrocytes: a paradox for neuronal protection. *J Neurochem* 78: 842-853.
- Guillemin GJ, Brew BJ, Noonan CE, Takikawa O, Cullen KM. 2005. Indolamine 2,3-dioxygenase and quinolinic acid immunoreactivity in Alzheimer's disease hippocampus. *Neuropathol Appl Neurobiol* 31: 395-404.
- Gusella JF, Wexler NS, Conneally PM, Naylor SL, Anderson MA, Tanzi RE *et al.* 1983. A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease, *Nature* 306 234-238.

- Gutteridge JM, Halliwell B. 1990. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem Sci* 15:129-135.
- Ha HC, Snyder SH. 1999. Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion. *Proc Natl Acad Sci USA* 69: 13978-13982.
- Halliwell B, Gutteridge JM. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 219:1-14.
- Halliwell B. 1999. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end. *Free Radic Res* 31:261-272.
- Halliwell B, Gutteridge JM. 2001. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press. USA. pp. 36-104.
- Hamilton BF, Gould DH. 1987a. Nature and distribution of brain lesions in rats intoxicated with 3-nitropropionic acid: a type of hypoxic (energy deficient) brain damage. *Acta Neuropathol.* 72(3):286-97.
- Hamilton BF, Gould DH. 1987b. Correlation of morphologic brain lesions with physiologic alterations and blood-brain barrier impairment in 3-nitropropionic acid toxicity in rats. *Acta Neuropathol.* 74(1):67-74.
- Han Y, Weinman S, Boldogh I, Walker RK, Brasier AR. 1999. Tumor necrosis factor- α -inducible I κ B α proteolysis mediated by cytosolic m-calpain. A mechanism parallel to the ubiquitin-proteasome pathway for nuclear factor- κ B activation. *J Biol Chem* 274: 787-794.
- Hargreaves KM, Pardridge WM. 1988. Neutral amino acid transport at the human blood-brain barrier. *J Biol Chem* 263:19392-19397.
- Harper SP. 1992. *Huntington's Disease*, W.B. Saunders, Philadelphia pp. 127-141.
- Harris CM, Massey V. 1992. The reaction of reduced xanthine dehydrogenase with molecular oxygen. Reaction kinetics and measurement of superoxide radical. *J Biol Chem* 267:8370-8379.
- Hausladen A, Fridovich I. 1994. Superoxide and peroxynitrite inactivate aconitases, but nitric oxide does not. *J Biol Chem* 269(47):29405-8.
- Hedreen JC, Peyser CE, Folstein SE, Ross CA. 1991. Neuronal loss in layers V and VI of cerebral cortex in Huntington's disease. *Neurosci Lett* 133:257-261.
- Henderson LM, Hirsch HM. 1949. Quinolinic acid metabolism: Urinary excretion by the rat following tryptophan and 3-hydroxyanthranilic acid administration. *J Biol Chem* 181:667-675.
- Henshaw R, Jenks BG, Schulz IB, Ferrante RJ, Kowall NW, Rosen RB, Beal MF. 1994. Malonate produces striatal lesion by indirect NMDA receptor activation. *Brain Res* 647: 161-166
- Hilmas C, Pereira EF, Alkondon M, Rassoulpour A, Schwarcz R, Albuquerque EX. 2001. The brain metabolite kynurenic acid inhibits α 7 nicotinic receptor activity and increases non- α 7 nicotinic receptor expression: physiopathological implications. *J Neurosci.* 21(19):7463-73.
- Himwich HE. 1985. *Brain metabolism and cerebral disorders*. The William and Wilkins Co., Baltimore. 124-276.
- Hirata F, Hayaishi O. 1971. Possible participation of superoxide anion in the intestinal tryptophan 2,3-dioxygenase reaction. *J Biol Chem* 246(24):7825-6.
- Hodgson JG, Agopyan N, Gutekunst CA, Leavitt BR, LePiane F, Singaraja R, Smith DJ, Bissada N, McCutcheon K, Nasir J, Jamot L, Li XJ, Stevens ME, Rosemond E, Roder JC, Phillips AG, Rubin EM, Hersch SM, Hayden MR. 1999. A YAC mouse model for Huntington's disease with full-length mutant huntingtin, cytoplasmic toxicity, and selective striatal neurodegeneration. *Neuron* 23:181-192.

- Holbert S, Denghied I, Kiechle T. 2001. The Gln-Ala repeat transcriptional activator CA 150 interacts with huntingtin: Neuropathologic and genetic evidence for a role in Huntington's disease pathogenesis. *Proc Nat Acad Sci USA* 98: 1811-1816.
- Horton AA, Fairhurst S. 1987. Lipid peroxidation and mechanism of toxicity. *CRC Crit Rev Toxicol* 18:27-79.
- Hsu YT, Wolter KG, Youle RJ. 1997. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(8):3668-72.
- Hunt A, Patel AJ. 1990. Quinolinic acid promotes the biochemical differentiation of cerebellar granule neurons. *Neurosci Lett* 115: 318.
- Ignatowicz E, Vezzani AM, Rizzi M, D'Incalci M. 1991. Nerve cell death induced in vivo by kainic acid and quinolinic acid does not involve apoptosis. *Neuroreport* 2: 651-654.
- Imam ZS, Islam F, Itzhak Y, Slikker W, Ali FS. 2000. Prevention of dopaminergic neurotoxicity by targeting nitric oxide and peroxynitrite: implications for the prevention of methamphetamine-induced neurotoxic damage. *Brain Res* 837:15-21.
- Isacson O, Brundin P, Kelly PA, Gage FH, Bjorklund A. 1984. Functional neuronal replacement by grafted striatal neurones in the ibotenic acid-lesioned rat striatum. *Nature* 311:458-460.
- Ischiropoulos H, Zhu LC, Chen J, Tsai M, Martin JC, Smith CD, Beckman JS. 1992. Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys* 298: 431-437.
- Iwahashi H, Kawamori H, Fukushima K. 1999. Quinolinic acid, α -picolinic acid, fusaric acid, and 2,6-pyridinedicarboxylic acid enhance the Fenton reaction in phosphate buffer. *Chem Biol Interact* 118: 201-215.
- Jackson GR, Salecker I, Dong X, Yao X, Arnheim N, Faber PW, MacDonald ME, Zipursky SL. 1998. Polyglutamine-expanded human huntingtin transgenes induce degeneration of *Drosophila* photoreceptor neurons. *Neuron* 21:633-642.
- Jacquard C, Trioulier Y, Cosker F, Escartin C, Bizat N, Hantraye P, Cancela JM, Bonvento G, Brouillet E. 2006. Brain mitochondrial defects amplify intracellular [Ca²⁺] rise and neurodegeneration but not Ca²⁺ entry during NMDA receptor activation. *FASEB J.* 20(7):1021-3.
- Jana NR, Zemskov EA, Wang Gh, Nukina N. 2001. Altered proteasomal function due to the expression of polyglutamine-expanded truncated N-terminal huntingtin induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome release. *Hum Mol Genet.* 10: 1049-1059.
- Jänicke RU, Ng P, Sprengart ML, Porter AG. 1998. Caspase-3 is required for alpha-fodrin cleavage but dispensable for cleavage of other death substrates in apoptosis. *J Biol Chem* 273(25):15540-5.
- Jenkins BG, Rosas HD, Chen YC, Makabe T, Meyers R, MacDonald M *et al.* 1998. ¹H NMR spectroscopy studies of Huntington's disease: correlations with CAG repeat numbers, *Neurology* 50: 1357-1365.
- Jiménez A, Jordà EG, Verdaguer E, Pubill D, Sureda FX, Canudas AM, Escubedo E, Camarasa J, Camins A, Pallàs M. 2004. Neurotoxicity of amphetamine derivatives is mediated by caspase pathway activation in rat cerebellar granule cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 196(2):223-34.
- Kalosch BE, Jhamandas K, Beninger RJ, Boegman RJ. 1999. Modulation of quinolinic acid-induced depletion of striatal NADPH diaphorase and enkephalinergic neurons by inhibition of nitric oxide synthase. *Brain Res* 817: 151-162.
- Kakiuchi S, Sobue K, Fujita M. 1981. Purification of a 240 000 Mr calmodulin-binding protein from a microsomal fraction of brain. *FEBS Lett.* 14;132(1):144-8.
- Kells AP, Connor B. 2008. AAV-mediated expression of Bcl-xL or XIAP fails to induce neuronal resistance against quinolinic acid-induced striatal lesioning. *Neurosci Lett* 436(3):326-30.

- Kelly DP, Scarpulla RC. 2004. Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function, *Genes Dev* 18: 357–368.
- Kendall AL, David F, Rayment G, Torres EM, Annett LE, Dunnett SB. 2000. The influence of excitotoxic basal ganglia lesions on motor performance in the common marmoset. *Brain* 123 (Pt 7):1442-1458.
- Kehrer JP. 2000. Cause-effect of oxidative stress and apoptosis. *Teratology* 62:235-6.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 26(4):239-57.
- Kerr SJ, Armati PJ, Brew BJ. 1995. Neurocytotoxicity of quinolinic acid in human brain cultures. *J Neurovirol* 1: 375-380.
- Kessler M, Terramani T, Lynch G, Baudry M. 1989. A glycine site associated with N-methyl-D-aspartic acid receptors: characterization and identification of a new class of antagonists. *J Neurochem* 52(4):1319-28.
- Kim JP, Choi DW. 1987. Quinolinic acid neurotoxicity in cortical cell culture. *Neuroscience*. 1987 Nov;23(2):423-32.
- Kish S, Lopes-Cendes I, Guttman M, Furukawa Y, Pandolfo M, Rouleau GA *et al.* 1998. Brain glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity in human trinucleotide repeat disorders, *Arch Neurol* 55: 1299–1304.
- Kohler C, Okuno E, Flood PR, Schwarcz R. 1987. Quinolinic acid phosphoribosyltransferase: preferential glial localization in the rat brain visualized by immunocytochemistry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(10):3491-5.
- Kohler C, Eriksson LG, Okuno E, Schwarcz R. 1988. Localization of quinolinic acid metabolizing enzymes in the rat brain. Immunohistochemical studies using antibodies to 3-hydroxyanthranilic acid oxygenase and quinolinic acid phosphoribosyltransferase. *Neuroscience* 27(1):49-76.
- Koutouzis TK, Borlongan CV, Scorcia T, Creese I, Cahill DW, Freeman TB, Sanberg PR. 1994a. Systemic 3-nitropropionic acid: long-term effects on locomotor behavior. *Brain Res*. 646(2):242-6.
- Koutouzis TK, Borlongan CV, Freeman TB, Cahill DW, Sanberg PR. 1994b. Intrastratial 3-nitropropionic acid: a behavioral assessment. *Neuroreport*. 1994 Nov 21;5(17):2241-5.
- Krajewski S, Tanaka S, Takayama S, Schibler MJ, Fenton W, Reed JC. 1993. Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res*. 53(19):4701-14.
- Kretz-Remy C, Arrigo AP. 2001. Selenium: a key element that controls NF-kappa B activation and I kappa B alpha half life. *Biofactors* 4: 117-125.
- Kubbutat MH, Vousden KH. 1997. Proteolytic cleavage of human p53 by calpain: a potential regulator of protein stability. *Mol Cell Biol*. 1997 Jan;17(1):460-8.
- Kuhl DE, Phelps ME, Markham CH, Metter EJ, Riege WH, Winter J. 1982. Cerebral metabolism and atrophy in Huntington's disease determined by 18FDG and computed tomographic scan, *Ann Neurol* 12: 425–434.
- Kuwert T, Lange HW, Langen KJ, Herzog H, Aulich A, Feinendegen LE. 1990. Cortical and subcortical glucose consumption measured by PET in patients with Huntington's disease, *Brain* 113: 1405–1423.
- La-Fontaine M, Geddes JW, Banks A, Butterfield DA. 2000. 3-Nitropropionic acid induced in vivo protein oxidation in striatal and cortical synaptosomes: insights into Huntington's disease. *Brain Research* 858: 356-362.
- Lafon-Cazal M, Pietri S, Culcasi M, Bockaert J. 1993. NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity. *Nature* 364: 535-537.

- Lancel S, Tissier S, Mordon S, Marechal X, Depontieu F, Scherpereel A, Chopin C, Neviere R. 2004. Peroxynitrite decomposition catalysts prevent myocardial dysfunction and inflammation in endotoxemic rats. *J Am Coll Cardiol.* 43(12):2348-58.
- Lankiewicz S, Marc Luetjens C, Truc Bui N, Krohn AJ, Poppe M, Cole GM, Saido TC, Prehn JH. 2000. Activation of calpain I converts excitotoxic neuron death into a caspase-independent cell death. *J Biol Chem.* 275(22):17064-71.
- Lapin IP. 1978. Convulsions and tremor in immature rats after intraperitoneal injection of kynurenine and its metabolites. *Pharmacol Res Commun* 10(1):81-4.
- Lapin IP, Mirzaev SM, Ryzov IV, Oxenkrug GF. 1998. Anticonvulsant activity of melatonin against seizures induced by quinolinate, kainate, glutamate, NMDA, and pentylentetrazole in mice. *J Pineal Res* 24(4):215-8.
- Lawson LD. 1966. The composition and chemistry of garlic cloves and processed garlic. in: H.P. Koch, L.D. Lawson (Eds.), *The Science and Therapeutic Application of Allium sativum L. and Related Species*, Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 37-107.
- Lazebnik YA, Kaufmann SH, Desnoyers S, Poirier GG, Earnshaw WC. 1994. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature.* 371(6495):346-7.
- Leavitt BR, Raamsdonk JM, Shehadeh J, Fernandes H, Murphy Z, Graham RK, Wellington CL, Raymond LA, Hayden MR. 2006. Wild-type huntingtin protects neurons from excitotoxicity. *J Neurochem* 96:1121-1129.
- Lee WT, Yin HS, Shen YZ. 2002a. The mechanism of neuronal death by mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid: the roles of N-methyl-D-aspartate glutamate receptors and mitochondrial calcium overload. *Neuroscience* 112: 707-716.
- Lee WT, Itoh T, Pleasure D. 2002b. Acute and chronic alterations in calcium homeostasis in 3-nitropropionic acid-treated human NT2-N neurons. *Neuroscience.* 113(3):699-708.
- Lees GJ. 1993. The possible contribution of microglia and macrophages to delayed neuronal death after ischemia. *J Neurol Sci* 114(2):119-22.
- Lehnig M. 1999. Radical mechanisms of the decomposition of peroxynitrite and the peroxynitrite-CO(2) adduct and of reactions with L-tyrosine and related compounds as studied by (15)N chemically induced dynamic nuclear polarization. *Arch Biochem Biophys* 368(2):303-18.
- Levine J, Willard M. 1981. Fodrin: axonally transported polypeptides associated with the internal periphery of many cells. *J Cell Biol*, 90(3):631-42.
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91: 479-489.
- Li XJ, Charp AH, Nucifora FC. 1995. A huntingtin associated protein enriched in brain with implications for pathology. *Nature* 378: 398-402.
- Lin CH, Tallaksen-Greene S, Chien WM, Cearley JA, Jackson WS, Crouse AB, Ren S, Li XJ, Albin RL, Detloff PJ. 2001. Neurological abnormalities in a knock-in mouse model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 10:137-144.
- Lin A, Dibling B. 2002. The true face of JNK activation in apoptosis. *Aging Cell.* 1(2):112-6.
- Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, Lei SZ, Chen HSV, Sucher NJ, Loscalzo J, Singel DJ, Stamler JS. 1993. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 364: 626-632.

- Liu X, Luo X, Hu W. 1992. Studies on the epidemiology and etiology of moldy sugarcane poisoning in China. *Biomed Environ Sci* 5:161-177.
- Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. 1996. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*. 1996 Jul 12;86(1):147-57.
- Lledias F, Hansberg W. 2000. Catalase modification as a marker for singlet oxygen. *Methods Enzymol* 319 : 110-119.
- Lowe J, Lennox G, Leigh PN. 1997. Disorders of movement and system degenerations. Greenfield's *Neuropathology*, Londres, 6^a ed. 281-366.
- Lu T, Xu Y, Mericle MT, Mellgren RL. 2002. Participation of the conventional calpains in apoptosis. *Biochim Biophys Acta*. 1590-3
- Ludolph AC, He F, Spencer PS, Hammerstad J, Sabri M. 1991. 3-Nitropropionic acid-exogenous animal neurotoxin and possible human striatal toxin. *Can J Neurol Sci* 18:492-498.
- Luesse HG, Schiefer J, Spruenken A, Puls C, Block F, Kosinski CM. 2001. Evaluation of R6/2 HD transgenic mice for therapeutic studies in Huntington's disease: Behavioral testing and impact of diabetes mellitus. *Behav Brain Res* 126:185-195.
- MacDonald V, Halliday G. 2002. Pyramidal cell loss in motor cortices in Huntington's disease. *Neurobiol Dis* 10, 378-386.
- Mackensen GB, Patel M, Sheng H, Calvi CL, Batinic-Haberle I, Day BJ, Liang LP, Fridovich I, Crapo JD, Pearlstein RD, Warner DS. 2001. Neuroprotection from delayed postischemic administration of a metalloporphyrin catalytic antioxidant. *J Neurosci* 21(13):4582-92.
- Mangiarini L, Sathasivam K, Seller M, Cozens B, Harper A, Hetherington C, Lawton M, Trottier Y, Lehrach H, Davies SW, Bates GP. 1996. Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell* 87:493-506.
- Makropoulos V, Bruning T, Schulze-Osthoff K. 1996. Selenium-mediated inhibition of transcription factor NF-kappa B and HIV-1 LTR promoter activity. *Arch Toxicol* 70: 277-83.
- Maksimovic ID, Jovanovic MD, Colic M, Mihajlovic R, Micic D, Selakovic V, Ninkovic M, Malicevic Z, Rusic-Stojiljkovic M, Jovococ A. 2001. Oxidative damage and metabolic dysfunction in experimental Huntington's disease: selective vulnerability of the striatum and hippocampus. *Vojnosanit Pregl* 58: 237-242.
- Mangiarini L, Sathasivam K, Seller M, Cozens B, Harper A., Hetherington C, et al. 1996. Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell* 87: 493-506.
- Margos WF, Silverstein FS. 1995. The mitochondrial inhibitor malonate enhances NMDA toxicity in the neonatal rat striatum. *Developmental Brain Res* 88: 117-121.
- Martin RL, Lloyd HE, Cowan AI. 1994. The early events of oxygen and glucose deprivation: Setting the scene for neuronal death? *TINS* 17: 251-257.
- Massieu L, Gómez-Roman N, Montiel T. 2000. *In vivo* potentiation of glutamate-mediated neuronal damage after chronic administration of the glycolysis inhibitor iodoacetate, *Exp Neurol* 165: 257–267.
- Massieu L, Del Rio P, Montiel T. 2001. Neurotoxicity of glutamate uptake inhibition in vivo : correlation with succinate dehydrogenase activity and prevention by energy substrates. *Neuroscience* 106: 669-677.
- Massieu L, Haces ML, Montiel T, Hernandez-Fonseca K. 2003. Acetoacetato protects hippocampal neurons against glutamate-mediated neuronal damage during glycolysis inhibition. *Neuroscience* 120: 365-378.

- Massieu L, Moran J, Christen Y. 2004. Effect of Ginkgo biloba (EGb 761) on staurosporine-induced neuronal death and caspase activity in cortical cultured neurons. *Brain Res* 1002(1-2):76-85.
- Maus M, Marin P, Israel M, Glowinski J, Premont J. 1999. Pyruvate and lactate protect striatal neurons against N-methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity. *Eur J Neurosci* 11: 3215-3224.
- May JM, Cobb CE, Mendiratta S, Hill KE, Burk RF. 1998. Reduction of the ascorbyl free radical to ascorbate by the thioredoxin reductase. *J Biol Chem* 273:23039-23045.
- McDonnell TJ, Deane N, Platt FM, Nunez G, Jaeger U, McKearn JP, Korsmeyer SJ. 1989. bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell*. 57(1):79-88.
- McGeer EG, Singh E. 1984. Neurotoxic effects of endogenous materials: quinolinic acid, L-pyroglutamic acid, and thyroid releasing hormone (TRH). *Exp Neurol* 86(2):410-3.
- McGinnis KM, Gnegy ME, Park YH, Mukerjee N, Wang KK. 1999. Procaspase-3 and poly(ADP)ribose polymerase (PARP) are calpain substrates. *Biochem Biophys Res Commun*, 263(1):94-9.
- McGinnis KM, Gnegy ME, Wang KK. 1999b. Endogenous bax translocation in SH-SY5Y human neuroblastoma cells and cerebellar granule neurons undergoing apoptosis. *J Neurochem*. 72(5):1899-906
- McLin JP, Thompson LM, Steward O. 2006. Differential susceptibility to striatal neurodegeneration induced by quinolinic acid and kainate in inbred, outbred and hybrid mouse strains. *Eur J Neurosci* 24:3134-3140.
- Mejia-Toiber J, Montiel T, Massieu L. 2006. D-beta-hydroxybutyrate prevents glutamate-mediated lipoperoxidation and neuronal damage elicited during glycolysis inhibition. *Neurochem Res* 31: 1399–1408.
- Mikhailov V, Mikhailova M, Degenhardt K, Venkatachalam MA, White E, Saikumar P. 2001. Association of Bax and Bak homo-oligomers in mitochondria. Bax requirement for Bak reorganization and cytochrome c release. *J Biol Chem* 278(7):5367-76.
- Ming L. 1995. Moldy sugarcane poisoning—a case report with a brief review. *J Toxicol Clin Toxicol* 33:363-367.
- Misko TP, Highkin MK, Veenhuizen AW, Manning PT, Stern MK, Currie MG, Salvemini D. 1998. Characterization of the cytoprotective action of peroxynitrite decomposition catalysts. *J Biol Chem* 273: 15646-15653.
- Moroni F, Lombardi G, Moneti G, Aldinio C. 1984. The excitotoxin quinolinic acid is present in the brain of several mammals and its cortical content increases during the aging process. *Neurosci Lett*, 47:51-55.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65(1-2):55-63.
- Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B, Brown C, Mellor AL. 1998. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 281: 1191-1193.
- Murakami K, Ueda T, Morikawa R, Ito M, Haneda M, Yoshino M. 1998. Antioxidant effect of dipicolinic acid on the metal catalyzed lipid peroxidation and enzyme inactivation. *Biomed Res* 19: 205-208.
- Muscoli C, Salvemini D, Paolino D, Iannone M, Palma E, Cufari A, Rotiroli D, Perno CF, Aquaro S, Mollace V. 2002. Peroxynitrite decomposition catalyst prevents apoptotic cell death in a human astrocytoma cell line incubated with supernatants of HIV-infected macrophages. *BMC Neurosci*.16;3:13
- Nakagawa T, Yuan J. 2000. Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol*. 150(4):887-94.

- Nakai M, Qin ZH, Wang Y, Chase TN. 1999. Free radical scavenger OPC-14117 attenuates quinolinic acid-induced NF-kappaB activation and apoptosis in rat striatum. *Brain Res Mol Brain Res* 64: 59-68.
- Nakamura TA, Yamada K, Hasegawa T, Nabeshima T. 1995. Possible involvement of nitric oxide in quinolinic acid-induced convulsion in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 51: 309-12.
- Nakanishi S. 1992. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* 258: 597.
- Nakao N, Brundin P. 1997. Effects of alpha-phenyl-tert-butyl nitron on neuronal survival and motor function following intrastriatal injections of quinolinic acid or 3-nitropropionic acid. *Neuroscience*. 1997 Feb;76(3):749-61
- Nam E, Min LS, Eun KS, Seok JW, Maeng S, In IH. 2005. Melatonin protects against neuronal damage induced by 3-nitropropionic acid in rat striatum. *Brain Research* 1046: 90-96.
- Nasr P, Gursahani HI, Pang Z, Bondada V, Lee J, Hadley RW, Geddes JW. 2003. Influence of cytosolic and mitochondrial Ca²⁺, ATP, mitochondrial membrane potential, and calpain activity on the mechanism of neuron death induced by 3-nitropropionic acid. *Neurochem Int*, 43: 89-99.
- Nath R, Raser KJ, Stafford D, Hajimohammadreza I, Posner A, Allen H, Talanian RV, Yuen P, Gilbertsen RB, Wang KK. 1996a. Non-erythroid alpha-spectrin breakdown by calpain and interleukin 1 beta-converting-enzyme-like protease(s) in apoptotic cells: contributory roles of both protease families in neuronal apoptosis. *Biochem J* 319 (Pt 3):683-90.
- Nath R, Raser KJ, McGinnis K, Nadimpalli R, Stafford D, Wang KK. 1996b. Effects of ICE-like protease and calpain inhibitors on neuronal apoptosis. *Neuroreport* 8(1):249-55.
- Nath R, Raser KJ, Stafford D, Hajimohammadreza I, Posner A, Allen H, Talanian RV, Yuen P, Gilbertsen RB, Wang KK. 1996c. Non-erythroid alpha-spectrin breakdown by calpain and interleukin 1 beta-converting-enzyme-like protease(s) in apoptotic cells: contributory roles of both protease families in neuronal apoptosis. *Biochem J*, 319 (Pt 3):683-90.
- Newmeyer DD, Farschon DM, Reed JC. 1994. Cell-free apoptosis in *Xenopus* egg extracts: inhibition by Bcl-2 and requirement for an organelle fraction enriched in mitochondria. *Cell*. 79(2):353-64.
- Niesen C, Charlton MP, Carlen PL. 1991. Postsynaptic and presynaptic effects of the calcium chelator BAPTA on synaptic transmission in rat hippocampal dentate granule neurons. *Brain Res*. 555(2):319-25.
- Niki E, Yamamoto Y, Komuro E, Sato E. 1991. Membrane damage due to lipid oxidation. *Am J Clin Nutr* 53:2015-2055.
- Nicholson DW, Thornberry NA. 1997. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci*, 22(8):299-306.
- Nixon RA. 2003. The calpains in aging and aging-related diseases. *Ageing Res Rev*, 2(4):407-18.
- Noack H, Lindenau J, Rothe F, Asayama K, Wolf G. 1998. Differential expression of superoxide dismutase isoforms in neural and glial compartments in the course of excitotoxically mediated degeneration: relation to oxidative and nitrenergic stress. *Glia* 23: 285-297.
- Novelli A, Reilly JA, Lysko PG, Henneberry RC. 1988. Glutamate becomes neurotoxic via the N-methyl-D-aspartate receptor when intracellular energy levels are reduced, *Brain Res* 451: 205-212.
- Ohgoh M, Shimizu H, Ogura H, Nishizawa Y. 2000. Astroglial trophic support and neuronal cell death: influence of cellular energy level on type of cell death induced by mitochondrial toxin in cultured rat cortical neurons. *J Neurochem*. 75(3):925-33.
- Okamoto H, Yamamoto S, Nozaki M, Hayaishi O. 1967. On the submitochondrial localization of I-kynurenine-3-hydroxylase. *Biochem Biophys Res Commun* 8;26(3):309-14.

- Okuda S, Nishiyama N, Saito H, Katsuki H. 1998. 3-Hydroxykynurenine, an endogenous stress generator, causes neuronal cell death with apoptotic features and region selectivity. *J Neurochem* 70: 299-307.
- Okuno E, Kohler C, Schwarcz R. 1987. Rat 3-hydroxyanthranilic acid oxygenase: purification from the liver and immunocytochemical localization in the brain. *J Neurochem*. 49(3):771-80.
- Okuno E, Kido R. Kynureninase and kynurenine 3-hydroxylase in mammalian tissues. *Adv Exp Med Biol*. 1991;294:167-76.
- Olney JW. 1969. Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 164: 719-721.
- Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. 1993. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*. 4(4):609-19.
- Oury TD, Ho YS, Piantadosi CA, Crapo JD. Extracellular superoxide dismutase, nitric oxide, and central nervous system O₂ toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Oct 15;89(20):9715-9.
- Oury TD, Day BJ, Crapo JD. 1996. Extracellular superoxide dismutase: a regulator of nitric oxide bioavailability. *Lab Invest* 75:617-636.
- Palfi S, Ferrante RJ, Brouillet E, Beal MF, Dolan R, Guyot MC, Peschanski M, Hantraye P. 1996. Chronic 3-nitropropionic acid treatment in baboons replicates the cognitive and motor deficits of Huntington's disease. *J Neurosci* 16:3019-3025.
- Pang Z, Geddes JW. 1997. Mechanisms of cell death induced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid: acute excitotoxic necrosis and delayed apoptosis. *J Neurosci*. 17(9):3064-73.
- Patel M, Day BJ. 1999. Metalloporphyrin class of therapeutic catalytic antioxidants. *Trends Pharmacol Sci*. 20(9):359-64. Review.
- Paxinos G, Watson G. 1998. The rat brain in stereotaxic coordinates. New York: Academic Press.
- Pellerin L, Magistretti PJ. 1994. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 10625-10629.
- Pérez-De la Cruz V, González-Cortés C, Galván-Arzate S, Medina-Campos ON, Pérez-Severiano F, Ali SF, Pedraza-Cheverri J, Santamaría J. 2005. Excitotoxic brain damage involves early peroxynitrite formation in a model of Huntington's disease in rats: protective role of iron porphyrinate 5,10,15,20-Tetrakis (4-sulfonatophenyl) porphyrinate iron (III). *Neuroscience* 135(2): 463-474.
- Pérez-De La Cruz V, González-Cortés C, Pedraza-Chaverrí J, Maldonado PD, Andrés-Martínez L, Santamaría A. 2006. Protective effect of S-allylcysteine on 3-nitropropionic acid-induced lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction in rat brain synaptosomes. *Brain Res Bull*. 68(5):379-83.
- Pérez-Severiano F, Escalante B, Rios C. 1998. Nitric oxide synthase inhibition prevents acute quinolinate-induced striatal neurotoxicity. *Neurochem Res* 23: 1297-1302.
- Perkins MN, Stone TW. 1982. An iontophoretic investigation of the actions of convulsant kynurenes and their interaction with the endogenous excitant quinolinic acid. *Brain Research* 247: 184-187.
- Persichetti F., Ambrose C. M., Ge P., McNeil S. M., Srinidhi J., Anderson M. A., Jenkins B., Barnes G. T., Duyao M. P., Kanaley L., and . 1995. Normal and expanded Huntington's disease gene alleles produce distinguishable proteins due to translation across the CAG repeat. *Mol Med* 1, 374-383.
- Pettmann B, Henderson CE. 1998. Neuronal cell death. *Neuron*. 20(4):633-47.
- Pieper AA, Verma A, Zhang J, Snyder SH. 1999. Poly(ADP-ribose) polymerase, nitric oxide and cell death. *Trends Pharmacol Sci* 20: 171-181.
- Poderoso JJ, Carreras MC, Lisdero C, Riobo N, Schöper F, Boveris A. 1996. Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles. *Arch Biochem Biophys* 328: 85-92.

- Poeggeler B, Rassoulpour A, Guidetti P, Wu HQ, Schwarcz R. 1998. Dopaminergic control of kynurenate levels and N-methyl-D-aspartate toxicity in the developing rat striatum. *Dev Neurosci* 20(2-3):146-53.
- Pontremoli S, Melloni E, Viotti PL, Michetti M, Salamino F, Horecker BL. 1991. Identification of two calpastatin forms in rat skeletal muscle and their susceptibility to digestion by homologous calpains. *Arch Biochem Biophys*. 288(2):646-52.
- Pörn-Ares MI, Samali A, Orrenius S. 1998. Cleavage of the calpain inhibitor, calpastatin, during apoptosis. *Cell Death Differ*. 5(12):1028-33.
- Portera-Cailliau C, Hedreen JC, Price DL, Koliatsos VE. 1995. Evidence for apoptotic cell death in Huntington's disease and excitotoxic animal models. *J Neurosci* 15: 3775-3787.
- Portera-Cailliau C, Price DL, Martin LJ. 1997. Non-NMDA and NMDA receptor-mediated excitotoxic neuronal deaths in adult brain are morphologically distinct: further evidence for an apoptosis-necrosis continuum. *J Comp Neurol* 378: 88-104.
- Powers SK, Lennon SL. 1999. Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc* 58:10025-1033.
- Powers WJ, Videen TO, Markham J, McGee-Minnich L, Antenor-Dorsey JV, Hershey T, *et al*. 2007. Selective defect of *in vivo* glycolysis in early Huntington's disease striatum, *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 2945–2949.
- Putnam CD, Arvai AS, Bourne Y, Tainer JA. 2000. Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. *J Mol Biol* 296:295-309.
- Qin ZH, Chen RW, Wang Y, Nakai M, Chuang DM, Chase TN. 1999. NF- κ B nuclear translocation up-regulates c-Myc and p53 during N-methyl-D-aspartate receptor-mediated apoptosis. *J Neurosci* 19: 4023-4033.
- Qin Z, Wang Y, Chase TN. A caspase-3-like protease is involved in NF-kappaB activation induced by stimulation of N-methyl-D-aspartate receptors in rat striatum. *Brain Res Mol Brain Res*. 2000 Sep 15;80(2):111-22.
- Rachek LI, Musiyenko SI, Ledoux SP, Wilson GL. 2006. Palmitate induced mtDNA damage and apoptosis in L6 rat skeletal muscle cells. *Endocrinology* 148(1):293-9.
- Radi R, Rodriguez M, Castro L, Telleri R. 1994. Inhibition of mitochondrial electron transport by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys* 308:89-95.
- Radi R. 2000. Peroxynitrito: una década de investigación sobre la bioquímica y biología celular de un intermediario citotóxico. *Actas de Fisiología* 6: 123-130.
- Radi R, Peluffo G, Alvarez MN, Naviliat M, Cayota A. 2001. Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. *Free Radic Biol Med* 30(5):463-88.
- Ramaswamy S, McBride JL, Zhou L, Berry-Kravis EM, Brandon EP, Herzog CD, Gasmi M, Bartus RT, Kordower JH. 2004. Cognitive deficits in the N171-82Q transgenic mouse model of Huntington's disease. *Cell Transplant*. Special issue for the American Society for Neural Therapy and Repair.
- Ramaswamy S, McBride JL, Kordower JH. 2007. Animal Models of Huntington's Disease. *ILAR J* 48(4): 356-373.
- Rami A, Ferger D, Krieglstein J. 1997. Blockade of calpain proteolytic activity rescues neurons from glutamate excitotoxicity. *Neurosci Res* 27: 93-97.
- Rasmussen A. 2000. Huntington infantil y juvenil. In: Mateos Gómez H, ed. *Enfermedad de Huntington "Series del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez"*. México, DF. pp. 22–27.

- Raynaud F, Marcilhac A. 2006. Implication of calpain in neuronal apoptosis. A possible regulation of Alzheimer's disease. *FEBS J.* 273(15):3437-43.
- Rice-Evans C, Burdon R. 1993. Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. *Prog Lipid Res* 32:71-110.
- Reiner A, Albin RL, Anderson KD, D'Amato CJ, Penney JB, Young AB. 1988. Differential loss of striatal projection neurons in Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:5733-5737.
- Riedl SJ, Fuentes-Prior P, Renatus M, Kairies N, Krapp S, Huber R, Salvesen GS, Bode W. 2001. Structural basis for the activation of human procaspase-7. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98 (26): 14790-5.
- Riepe MW, Hori N, Ludolph AC, Carpenter DO. 1995. Failure of neuronal ion exchange, not potentiated excitation, causes excitotoxicity after inhibition of oxidative phosphorylation. *Neuroscience* 64:91-97.
- Riley DP. 1999. Functional mimics of superoxide dismutase enzymes as therapeutic agents. *Chem. Rev.* 99: 2573-2587.
- Rios C, Santamaría A. 1991. Quinolinic acid is a potent lipid peroxidant in rat brain homogenates. *Neuroch Res* 16: 1139-1143.
- Roberts RC, Du F, McCarthy KE, Okuno E, Schwarcz R. Immunocytochemical localization of kynurenine aminotransferase in the rat striatum: a light and electron microscopic study. *J Comp Neurol.* 1992 Dec 1;326(1):82-90.
- Roberts RC, McCarthy KE, Du F, Okuno E, Schwarcz R. 1995. 3-Hydroxyanthranilic acid oxygenase-containing astrocytic processes surround glutamate containing axon terminals in the rat striatum. *J Neurosci* 15: 1150-1161.
- Rodrigues CM, Stieers CL, Keene CD, Ma X, Kren BT, Low WC, Steer CJ. 2000. Tauroursodeoxycholic acid partially prevents apoptosis induced by 3-nitropropionic acid: evidence for a mitochondrial pathway independent of the permeability transition. *J Neurochem.* 75(6):2368-79.
- Rodriguez-Martinez E, Camacho A, Maldonado PD, Pedraza-Chaverri J, Santamaria D, Galvan-Arzate S, Santamaria A. 2000. Effect of quinolinic acid on endogenous antioxidants in rat corpus striatum. *Brain Res* 858:436-439.
- Rojas-Walker T, Tamir S, Ji H. 1995. Nitric oxide induces oxidative damage in addition to deamination in macrophage DNA. *Chem Res Toxicol* 8: 473-477.
- Roitberg BZ, Emborg ME, Sramek JG, Palfi S, Kordower JH. 2002. Behavioral and morphological comparison of two non-human primate models of Huntington's disease. *Neurosurgery* 51: 852-853.
- Rosen DR, Siddique T, Patterson D, et al. 1993. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362: 59-62.
- Rossato JI, Ketzer LA, Centuriao FB, Silva SJ, Ludtke DS, Zeni G, Braga AL, Rubin MA, Rocha JB. 2002. Antioxidant properties of new chalcogenides against lipid peroxidation in rat brain. *Neurochem Res* 27: 297-303.
- Rossato JI, Zeni G, Mello CF, Rubin MA, Rocha JB. 2002. Ebselen blocks the quinolinic acid-induced production of thiobarbituric acid reactive species but does not prevent the behavioral alterations produced by intra-striatal quinolinic acid administration in the rat. *Neurosci Lett* 318: 137-40.
- Ruddick JP, Evans AK, Nutt DJ, Lightman SL, Rook GA, Lowry CA. 2006. Tryptophan metabolism in the central nervous system: Medical implications. *Expert Rev Mol Med* 8:1-27.
- Rubbo H, Radi R, Trujillo M, Taleri R, Kalyanaraman B, Barnes S, Kirk M, Kikuchi M, Freeman BA. 1994. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. *J Biol Chem* 269:26066-26075.

- Ruvolo PP, Deng X, Carr BK, May WS. 1998. A functional role for mitochondrial protein kinase Calpha in Bcl2 phosphorylation and suppression of apoptosis. *J Biol Chem.* ;273(39):25436-42.
- Ryu JK, Kim SU, McLarnon JG. 2003. Neuroprotective effects of pyruvate in the quinolinic acid rat model of Huntington's disease. *Exp Neurol* 183: 700-704.
- Ryu JK, Kim SU, McLarnon JG. 2004. Blockade of quinolinic acid-induced neurotoxicity by pyruvate is associated with inhibition of glial activation in a model of Huntington's disease. *Exp Neurol* 187: 150-159.
- Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gorp M, van Loo G, Vandenabeele P. 2004. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 23(16):2861-74.
- Saido TC, Sorimachi H, Suzuki K. 1994. Calpain: new perspectives in molecular diversity and physiological-pathological involvement. *FASEB J.* 8(11):814-22.
- Saido TC, Kawashima S, Tani E, Yokota M. 1997. Up- and down-regulation of calpain inhibitor polypeptide, calpastatin, in postischemic hippocampus. *Neurosci Lett.* 1997 May 16;227(2):75-8.
- Saito K, Elce JS, Hamos JE, Nixon RA. 1993. Widespread activation of calcium-activated neutral proteinase (calpain) in the brain in Alzheimer disease: a potential molecular basis for neuronal degeneration. *Proc Natl Acad Sci* 90: 2628-2632.
- Salvemini D, Masferrer JL. 1996. Interactions of nitric oxide with cyclooxygenase: In vitro, ex vivo, and in vivo studies. *Methods Enzymol* 269: 1225.
- Salvemini D, Wang Z, Stern KM, Currie GM, Misko T. 1998. Peroxynitrite decomposition catalysts: Therapeutics for peroxynitrite-mediated pathology. *Pharmacology* 95:2659-2663.
- Sanberg PR, Calderon SF, Giordano M, Tew JM, Norman AB. 1989. The quinolinic acid model of Huntington's disease: Locomotor Abnormalities. *Exp Neurol* 105: 45-53.
- Sánchez-Carbente MR, Massieu L. 1999. Transient inhibition of glutamate uptake *in vivo* induces neurodegeneration when energy metabolism is impaired, *J Neurochem* 72: 129–138.
- Santamaría A, Santamaría D, Diaz-Muñoz M, Espinoza-Gonzalez V, Rios C. 1997. Effects of N-omega-nitro-L-arginine and L-arginine on quinolinic acid-induced lipid peroxidation. *Toxicol Lett* 93: 117-124.
- Santamaria A, Rios C. 1993. MK-801, an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, blocks quinolinic acid-induced lipid peroxidation in rat corpus striatum. *Neurosci Lett* 159(1-2):51-4.
- Santamaria A, Galvan-Arzate S, Lisy V, Ali SF, Duhart HM, Osorio-Rico L, Rios C, St'astny F. 2001. Quinolinic acid induces oxidative stress in rat brain synaptosomes. *Neuroreport* 12: 871-874.
- Santamaría A, Jiménez-Capdevile ME, Camacho A, Rodríguez-Martínez E, Flores A, Galvan-Arzate S. 2001a. In vivo hydroxyl radical formation after quinolinic acid infusion into rat corpus striatum. *Neuroreport* 12: 2693-2696.
- Santamaria A, Salvatierra-Sanchez R, Vazquez-Roman B, Santiago-Lopez D, Villeda-Hernandez J, Galvan-Arzate S, Jimenez-Capdeville ME, Ali SF. 2003. Protective effects of the antioxidant selenium on quinolinic acid-induced neurotoxicity in rats: in vitro and in vivo studies. *J Neurochem* 86(2):479-88.
- Santiago-Lopez D, Vazquez-Roman B, Perez-de La Cruz V, Barrera D, Rembao D, Salinas-Lara C, Pedraza-Chaverri J, Galvan-Arzate S, Ali SF, Santamaria A. 2004. Peroxynitrite decomposition catalyst, iron metalloporphyrin, reduces quinolinate-induced neurotoxicity in rats. *Synapse* 54: 233-238.
- Sarin A, Adams DH, Henkart PA. 1993. Protease inhibitors selectively block T cell receptor-triggered programmed cell death in a murine T cell hybridoma and activated peripheral T cells. *J Exp Med.* 178(5):1693-700.

- Sauer H, Warttenberg M, Hescheler J. 2001. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem* 11:173-186.
- Sazonowa TG, Matskevich AA, Arkhipenko YV. Calpains: physiological and pathophysiological significance. *Pathophysiology* 1999; 6:91-102.
- Scattoni ML, Valanzano A, Popoli P, Pezzola A, Reggio R, Calamandrei G. 2004. Progressive behavioural changes in the spatial open-field in the quinolinic acid rat model of Huntington's disease. *Behav Brain Res*. 2004 Jul 9;152(2):375-83.
- Schaich KH. 1992. Metals and lipid oxidation. *Lipids* 27:209-218.
- Schilling G, Becher MW, Sharp AH, Jinnah HA, Duan K, Kotzuc JA, Slunt HH, Ratovitski T, Cooper JK, Jenkins NA, Copeland NG, Price DL, Ross CA, Borchelt DR. 1999. Intranuclear inclusions and neuritic aggregates in transgenic mice expressing a mutant N-terminal fragment of huntingtin. *Hum Mol Genet* 8:397-407.
- Schipke CG, Ohlemeyer C, Matyash M, Nolte C, Kettenmann H, Kirchhoff F. 2001. Astrocytes of the mouse neocortex express functional N-methyl-D-aspartate receptors. *FASEB J* 2001: 00-0439fje.
- Schmidt W, Wolf G, Calka J, Schmidt HH. 1995. Evidence for bidirectional changes in nitric oxide synthase activity in the rat striatum after excitotoxically (quinolinic acid) induced degeneration. *Neuroscience*. 1995 Jul;67(2):345-56.
- Schuck PF, Tonin A, Ferreira GC, Rosa RB, Latini A, Balestro F, Perry MLS, Wannmacher CMD, Wyse AT, Wajner M. 2006. In vitro effect of quinolinic acid on energy metabolism in brain of young rats. *Neurosci Res* (In press).
- Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S, Peter ME. 1998. Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem*. 1998 Jun 15;254(3):439-59.
- Schurr A, Payne RS, Miller JJ, Rigor BM. 1997. Brain lactate, not glucose, fuels the recovery of synaptic function from hypoxia upon reoxygenation: an in vitro study. *Brain Res* 744: 105-111.
- Schwarcz R, Whetsell WO, Mangano RM. 1983. Quinolinic acid: an endogenous metabolite that causes axon-sparing lesions in rat brain. *Science* 219: 316-318.
- Schwarcz R, Okuno E, White RJ, Bird ED, Whetsell WO Jr. 1988. 3-Hydroxyanthranilate oxygenase activity is increased in the brains of Huntington disease victims. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:4079-4081.
- Schwartz PJ, Reaume A, Scott R, Coyle JT. 1998. Effects of over- and under-expression of Cu,Zn-superoxide dismutase on the toxicity of glutamate analogs in transgenic mouse striatum. *Brain Res* 789: 32-9.
- Sei Y, Fossom L, Goping G, Skolnick P, Basile AS. 1998. Quinolinic acid protects rat cerebellar granule cells from glutamate-induced apoptosis. *Neurosci Lett* 241: 180
- Selemon LD, Rajkowska G, Goldman-Rakic PS. 2004. Evidence for progression in frontal cortical pathology in late-stage Huntington's disease. *J Comp Neurol* 468:190-204.
- Shaulian E, Karin M. 2002. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol*. 4(5):E131-6.
- Shear DA, Dong J, Haik-Creguer KL, Bazzett TJ, Albin RL, Dunbar GL. 1998. Chronic administration of quinolinic acid in the rat striatum causes spatial learning deficits in a radial arm water maze task. *Exp Neurol* 150:305-311.
- Shear DA, Dong J, Gundy CD, Haik-Creguer KL, Dunbar GL. 1998b. Comparison of intrastriatal injections of quinolinic acid and 3-nitropropionic acid for use in animal models of Huntington's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 1998 Oct;22(7):1217-40.

- Sheline CT, Behrens MM, Choi DW. 2000. Zinc-induced cortical neuronal death: contribution of energy failure attributable to loss of NAD⁺ and inhibition of glycolysis. *J Neurosci* 20: 3139-3146.
- Shi Y, Melnikov VY, Schrier RW, Edelstein CL. 2000. Downregulation of the calpain inhibitor protein calpastatin by caspases during renal ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Renal Physiol*. 279(3):F509-17.
- Shimanovich R, Groves TJ. 2001. Mechanisms of peroxynitrite decomposition catalyzed by FeTMPDS, a bioactive sulfonated iron porphyrin. *Arch Biochem Biophys* 387:307-317.
- Shin JY, Fang ZH, Yu ZX, Wang CE, Li SH, Li XJ. 2005. Expression of mutant huntingtin in glial cells contributes to neuronal excitotoxicity. *J Cell Biol* 171:1001-1012.
- Siesjo BK. 1981. Cell damage in the brain: a speculative synthesis. *J Cereb Blood Flow Metab* 1: 155-185.
- Siman R, Baudry M, Lynch G. 1984. Brain fodrin: substrate for calpain I, an endogenous calcium-activated protease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984 Jun;81(11):3572-6.
- Simpkins KL, Guttmann RP, Dong Y, Chen Z, Sokol S, Neumar RW, Lynch DR. 2003. Selective activation induced cleavage of the NR2B subunit by calpain. *J Neurosci* 23: 11322-11331.
- Singal SA, Briggs AP, Sydenstricker VP, Littlejohn JM. 1946. The effect of tryptophane on the urinary excretion of nicotinic acid in rats. *J Biol Chem* 166:573-579.
- Sorimachi H, Ishiura S, Suzuki K. 1997. Structure and physiological function of calpains. *Biochem J*, 328: 721-732.
- Soneja A, Drews M, Malinski T. 2005. Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative stress in wound healing. *Pharmacol Reports* 57: 108-119.
- Southgate GS, Daya S, Potgieter D. 1998. Melatonin plays a protective role in quinolinic acid-induced neurotoxicity in the rat hippocampus. *J Chem Neuroanat* 14: 151-156.
- Springer JE, Azbill RD, Nottingham SA, Kennedy SE. 2000. Calcineurin-mediated BAD dephosphorylation activates the caspase-3 apoptotic cascade in traumatic spinal cord injury. *J Neurosci*. 2000 Oct 1;20(19):7246-51.
- Squier MK, Cohen JJ . 1997. Calpain, an upstream regulator of thymocyte apoptosis. *J Immunol*. 158(8):3690-7.
- Srivastava P, Russo J, Mgbonyebi OP, Russo IH. 1998. Growth inhibition and activation of apoptotic gene expression by human chorionic gonadotropin in human breast epithelial cells. *Anticancer Res*. 18(6A):4003-10.
- Stack EC, Kubilus JK, Smith K, Cormier K, Del Signore SJ, Guelin E, Ryu H, Hersch SM, Ferrante RJ. 2005. Chronology of behavioral symptoms and neuropathological sequela in R6/2 Huntington's disease transgenic mice. *J Comp Neurol* 490:354-370.
- St'astny F, Hinoi E, Ogita K, Yoneda Y. 1999. Ferrous iron modulates quinolinate-mediated [3H]MK-801 binding to rat brain synaptic membranes in the presence of glycine and spermidine. *Neurosci Lett* 262: 105-8.
- Stern MK, Jensen MP, Kramer K. 1996. Peroxynitrite decomposition catalysts. *J Am Chem Soc* 118:8735-8736.
- Stípek S, Stastny F, Platenik J, Crkovská J, Zima T. 1997. The effect of quinolinate on rat brain lipid peroxidation is dependent on iron. *Neurochem Int* 30: 233-237.
- Stone TW, Perkins MN. 1981. Quinolinic acid: a potent endogenous excitant at amino acid receptors in CNS. *Eur J Pharmacol* 72: 411-412.
- Stone TW, Connick JH, Winn P, Hastings MH, English M. 1987. Endogenous excitotoxic agents. *Ciba Found Symp*. 1987;126:204-20. Review.
- Stone TW. 1993. Neuropharmacology of quinolinic and kinurenic acids. *Pharmacol Rev* 45: 309-379.

- Stone TW, Behan WM, MacDonald M, Darlington LG. 2000. Possible mediation of quinolinic acid-induced hippocampal damage by reactive oxygen species. *Amino Acids* 9: 275-81.
- Stone TW. 2001. Endogenous neurotoxins from tryptophan. *Toxicol* 39: 61-73.
- Stone TW, Darlington LG. 2002. Endogenous kinurenines as targets for drug discovery and development. *Nature Rev Drug Discovery* 1: 609-620.
- Struys-Ponsar C, Florence A, Gauthier A. 1994. Ultrastructural changes in brain parenchyma during normal aging and in animal models of aging. *J Neural Transm Suppl* 44: 111-132.
- Strong TV, Tagle DA, Veldes JM, Elmer LW, Boehm K, Swaroop M, Kaatz KW, Collins FS, Albin RL. 1993. Widespread expression of the human and rat Huntington's disease gene in brain and nonneural tissues. *Nat Genet* 5: 259-265.
- Sultana R, Poon HF, Cai J, Pierce WM, Merchant M, Klein JB, Markesbery WR, Butterfield DA. 2006. Identification of nitrated proteins in Alzheimer's disease brain using a redox proteomics approach. *Neurobiol Dis* 22: 76-87.
- Susel Z, Engber TM, Kuo S, Chase TN. 1991. Prolonged infusion of quinolinic acid into rat striatum as an excitotoxic model of neurodegenerative disease. *Neurosci Lett* 121: 234-238.
- Szabó C, Day BJ, Salzman AL. 1996. Evaluation of the relative contribution of nitric oxide and peroxynitrite to the suppression of mitochondrial respiration in immunostimulated macrophages using a manganese mesoporphyrin superoxide dismutase mimetic and peroxynitrite scavenger. *FEBS Lett* 381(1-2):82-6.
- Szabo C, Mabley JG, Moeller SM, Shimanovich R, Pacher P, Virag L, Soriano FG, Van Duzer JH, Williams W, Salzman AL, Groves JT. 2002. Part I: pathogenetic role of peroxynitrite in the development of diabetes and diabetic vascular complications: studies with FP15, a novel potent peroxynitrite decomposition catalyst. *Mol Med* 8:571-580.
- Szabó C, Ischiropoulos H, Radi R. 2007. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. 662-80. Review
- Tabrizi SJ, Cleeter MW, Xuereb J, Taanman JW, Cooper JM, Schapira AH. 1999. Biochemical abnormalities and excitotoxicity in Huntington's disease brain, *Ann Neurol* 45: 25-32.
- Tan Y, Wu C, De Veyra T, Greer PA. 2006. Ubiquitous calpains promote both apoptosis and survival signals in response to different cell death stimuli. *J Biol Chem*. 281(26):17689-98.
- Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GH, Goeddel DV. (1993) A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell*; 74 (5): 845-853.
- Tavares RG, Tasca CI, Santos CE, Alves LB, Ponciuncla LO, Emanuelli T, Souza DO. 2002. Quinolinic acid stimulates synaptosomal glutamate release and inhibits glutamate uptake into astrocytes. *Neurochem Int* 40: 621-627.
- Tenneti L, Lipton SA. 2000. Involvement of activated caspase-3-like proteases in N-methyl-D-aspartate-induced apoptosis in cerebrocortical neurons. *J Neurochem* 74: 134-142.
- Teunissen CE, Markerink-van Ittersum M, de Bruijn C, Steinbusch HW, de Vente J. 2002a. Evaluation of 3-nitrotyrosine as a marker for 3-nitropropionic acid-induced oxidative stress in Lewis and Wistar rats and strain-specific whole brain spheroid cultures. *Brain Res*. 2002 Mar 22;931(1):5-20.
- Teunissen CE, Mulder M, de Vente J, von Bergmann K, De Bruijn C, Steinbusch HW, Lütjohann D. 2002b. Concentrations of different sterols in the striatum and serum of 3-nitropropionic acid-treated Wistar and Lewis rats. *Neurochem Res*. 2001 Nov;26(11):1237-44.
- The Huntington's Disease Collaborative Research Group. 1993. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes, *Cell* 72 971-983.

- Thiyagarajan M, Kaul CL, Sharma SS. 2004. Neuroprotective efficacy and therapeutic time window of peroxynitrite decomposition catalysts in focal cerebral ischemia in rats. *Br J Pharmacol* 142(5):899-911.
- Thomas SR, Mohr D, Stocker R. 1994. Nitric oxide inhibits indoleamine-2,3-dioxygenase activity in interferon-gamma primed mononuclear phagocytes. *J Biol Chem* 269: 14457-14464.
- Thompson KA, McArthur JC, Wesselingh SL. 2001. Correlation between neurological progression and astrocyte apoptosis in HIV-associated dementia. *Ann Neurol* 49: 745-752.
- Thornberry NA, Lazebnik Y. 1998. Caspases: enemies within. *Science*. 281(5381):1312-6.
- Túnez I, Montilla P, Muñoz MC, Feijoo M, Salcedo M. 2004. Protective effect of melatonin on 3-nitropropionic acid-induced oxidative stress in synaptosomes in an animal model of Huntington's disease. *J Pineal Res* 37: 252-256.
- Túnez I, Muñoz MC, Montilla M. 2005. Treatment with dehydroepiandrosterone prevents oxidative stress induced by 3-nitropropionic acid in synaptosomes. *Pharmacology* 74: 113-118.
- Turmaine M, Raza A, Mahal A, Mangiarini L, Bates GP, Davies SW. 2000. Nonapoptotic neurodegeneration in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:8093-8097.
- van Dellen A, Welch J, Dixon RM, Cordery P, York D, Styles P, Blakemore C, Hannan AJ. 2000. N-acetylaspartate and DARPP-32 levels decrease in the corpus striatum of Huntington's disease mice. *Neuroreport* 11:3751-3757.
- Vanags DM, Pörn-Ares MI, Coppola S, Burgess DH, Orrenius S. 1996. Protease involvement in fodrin cleavage and phosphatidylserine exposure in apoptosis. *J Biol Chem*, 271(49):31075-85.
- Vasquez-Vivar J, Hogg N, Martasek P, Karoui H, Pritchard KA, Kalyanaraman B. 1999. Tetrahydrobiopterin-dependent inhibition of superoxide generation from neuronal nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 274: 26736-26742.
- Vaux DL, Cory S, Adams JM. 1988. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*. 335(6189):440-2.
- Vazey EM, Chen K, Hughes SM, Connor B. 2006. Transplanted adult neural progenitor cells survive, differentiate and reduce motor function impairment in a rodent model of Huntington's disease. *Exp Neurol* 199:384-396.
- Vender AD. 1975. The kynurenine pathway of tryptophan catabolism. In John Wiley and Sons (Eds.), *Aminoacid metabolism*, John Wiley and Sons, USA pp 172-177.
- Vezzani A, Sangalli L, Wu HQ, Schwarcz R. 1987. ATP as a marker of excitotoxin-induced nerve cell death in vivo. *J Neural Transm* 70(3-4):349-56.
- Villa PG, Henzel WJ, Sensenbrenner, Henderson CE, Pettmann B. 1998. Calpain inhibitors, but not caspase inhibitors, prevent actin proteolysis and DNA fragmentation during apoptosis. *J Cell Sci* 111: 713:722.
- Virag L, Szabo E, Gergely P, Szabo C. 2003. Peroxynitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention. *Toxicol Lett* 140-141:113-24.
- Vís JC, de Boer-van Huizen RT, Verbeek MM, de Waal RM, ten Donkelaar HJ, Kremer B. 2002. 3-Nitropropionic acid induces cell death and mitochondrial dysfunction in rat corticostriatal slice cultures. *Neurosci Lett*. 2002 Aug 23;329(1):86-90.
- Vonsattel JP, Myers RH, Stevens TJ, Ferrante RJ, Bird ED, Richardson EP. 1985. Neuropathological classification of Huntington's disease, *J Neuropathol Exp Neurol* 44: 559-577.

- Waelter S, Boeddrich A, Lurz R, Scherzinger E, Lueder G, Lehrach H, Wanker EE. 2001. Accumulation of mutant huntingtin fragments in aggresome-like inclusion bodies as a result of insufficient protein degradation. *Mol Biol Cell* 12: 1393-1407.
- Wang KK, Posmantur R, Nadimpalli R, Nath R, Mohan P, Nixon RA, Talanian RV, Keegan M, Herzog L, Allen H. 1998. Caspase-mediated fragmentation of calpain inhibitor protein calpastatin during apoptosis. *Arch Biochem Biophys* 356(2):187-96.
- Wang KK, Posmantur R, Nath R, McGinnis K, Whitton M, Talanian RV, Glantz SB, Morrow JS. 1998 b. Simultaneous degradation of alphaII- and betaII-spectrin by caspase 3 (CPP32) in apoptotic cells. *J Biol Chem* 273(35):22490-7.
- Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S. 1992 Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 356 (6367):314-7.
- Waterhouse NJ, Finucane DM, Green DR, Elce JS, Kumar S, Alnemri ES, Litwack G, Khanna K, Lavin MF, Watters DJ. 1998. Calpain activation is upstream of caspases in radiation-induced apoptosis. *Cell Death Differ*. 5(12):1051-610.
- Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ. 2001. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*. 292(5517):727-30.
- Weston CR, Davis RJ. The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Genet Dev*. 2002 Feb;12(1):14-21.
- Whetsell WO Jr., Schwarcz R. 1989. Prolonged exposure to submicromolar concentrations of quinolinic acid causes excitotoxic damage in organotypic cultures of rat corticostriatal system. *Neurosci Lett* 97: 271.
- Wolf J. 1974. Studies on tryptophan metabolism in man. *Scand J Clin Lab Invest* 136: 1-186.
- Wolf BB, Goldstein JC, Stennicke HR, Beere H, Amarante-Mendes GP, Salvesen GS, Green DR. 1999. Calpain functions in a caspase-independent manner to promote apoptosis-like events during platelet activation. *Blood*, 94(5):1683-92.
- Wolfensberger M, Amsler U, Cuénod M, Foster AC, Whetsell WO Jr, Schwarcz R. 1983. Identification of quinolinic acid in rat and human brain tissue. *Neurosci Lett* 41: 247-252.
- Wood DE, Thomas A, Devi LA, Berman Y, Beavis RC, Reed JC, Newcomb EW. 1998. Bax cleavage is mediated by calpain during drug-induced apoptosis. *Oncogene*, 17(9):1069-78.
- Wu H, Lozano G. 1994. NF- κ B activation of p53: a potential mechanism for suppressing cell growth in response to stress. *J Biol Chem* 269: 20067-20074.
- Wu AS, Kiaei M, Aguirre N, Crow JP, Calingasan NY, Browne SE, Beal MF. 2003. Iron porphyrin treatment extends survival in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 85(1):142-50.
- Wullner U, Young AB, Penney JB, Beal MF. 1994. 3-Nitorpropionic acid toxicity in the striatum. *J Neurochem* 65(5): 1772-1781.
- Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. 1980. Cell Death : the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68: 251-306.
- Wyllie AH, Beattie GJ, Hargreaves AD. 1981. Chromatin changes in apoptosis. *Histochem J*. 13(4):681-92.
- Wyllie AH. 1988. Apoptosis: cell death in tissue regulation. *J Pathol*. 153(4):313-6.
- Yamakua F, Taka H, Fujimura T, Murayama K. 1998. Inactivation of human manganese-superoxide dismutase by peroxynitrite is caused by exclusive nitration of tyrosine 34 to 3-nitrotyrosine. *J Biol Chem* 273:14085-14089.

- Yamamoto K, Ichijo H, Korsmeyer SJ. 1999. BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. *Mol Cell Biol.* 19(12):8469-78.
- Yamashima T, Tonchev AB, Tsukada T, Saido TC, Imajoh-Ohmi S, Momio T, Kominami E. 2003. Sustained calpain activation associated with lysosomal rupture executes necrosis of the postischemic CA1 neurons in primates. *Hippocampus* 13: 791-800.
- Yu BP. 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 74:139-162.
- Yu ZX, Li SH, Evans J, Pillarsetti A, Li H, Li XJ. 2003. Mutant huntingtin causes context-dependent neurodegeneration in mice with Huntington's disease. *J Neurosci* 23:2193-2202.
- Zhao M, Eaton JW, Brunk UT. 2001. Bcl-2 phosphorylation is required for inhibition of oxidative stress-induced lysosomal leak and ensuing apoptosis. *FEBS Lett.* 509(3):405-12.
- Zhang Y, Dawson VL, Snyder SH. 1994. Nitric oxide activation of poly(ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity. *Science* 263: 687-689
- Zhivotovsky B, Gahm A, Orrenius S. 1997. Two different proteases are involved in the proteolysis of lamin during apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 233(1):96-101.
- Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. 1997. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell.* 90(3):405-13.

Targeting oxidative/nitrogenic stress ameliorates motor impairment, and attenuates synaptic mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation in two models of Huntington's disease

Verónica Pérez-De La Cruz^{1,*}, Diana Elinos-Calderón¹, Yolanda Robledo-Arratia¹, Omar N. Medina-Campos², José Pedraza-Chaverri², Syed F. Ali³ and Abel Santamaría^{1,3,*}

Running title: **Oxidative/nitrogenic stress, motor alterations and neuroprotection**

¹Laboratorio de Aminoácidos Excitadores, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía *Manuel Velasco Suárez*, S.S.A., México D.F. 14269, México.

²Departamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 04510, México.

³Neurochemistry Laboratory, Division of Neurotoxicology, National Center for Toxicological Research/Food and Drug Administration, Jefferson, AR 72079, U.S.A.

♣Programa de Doctorado en Biología Experimental, UAM-I, México. CONACYT-scholarship holder 200241.

*Send reprint request to Abel Santamaría. Laboratorio de Aminoácidos Excitadores, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía *Manuel Velasco Suárez*, Insurgentes Sur 3877, México D.F. 14269, México. Tel.: (+5255)5606-3822 (X2013); E-mail address: absada@yahoo.com

Abstract

In this study, we reproduced two toxic models resembling some motor/kinetic deficits of Huntington's disease induced by bilateral intrastriatal injections of either quinolinic acid (QUIN, 120 nmol/ μ l per side) or 3-nitropropionic acid (3-NP, 250 nmol/ μ l per side) to rats. Motor skills (including total distance walked/traveled and total horizontal and vertical activities) were evaluated in a box-field system at one and seven days post-lesion. In order to investigate whether these alterations were associated with the oxidative/nitroergic stress evoked by the nitrogen reactive species peroxynitrite (ONOO^-) in the striatum, some rats were pretreated with the ONOO^- decomposition catalyst iron porphyrinate (Fe(TPPS), 10 mg/kg, i.p.) 120 min prior to the toxins infusion. With the aim to further characterize some possible mechanisms by which motor tasks were affected and/or preserved, biochemical analysis of peroxidative damage to lipids and mitochondrial dysfunction were both assessed in synaptic membranes isolated from the striata of QUIN-, 3-NP- and/or Fe(TPPS)-treated animals. Our results show that targeting oxidative/nitroergic stress by Fe(TPPS) in these toxic models results in amelioration of motor deficits linked to inhibition of peroxidative damage and recovery of mitochondrial function in synaptic membranes. Based on these findings, we hypothesize that the protection of the biochemical markers analyzed by Fe(TPPS) reflects the possible preservation of the functional status of the nerve tissue by limiting the deleterious actions of ONOO^- , further accounting for integrative motor functions to be partially recovered.

Key words: Motor/kinetic deficits; Peroxynitrite; Huntington's disease models; Oxidative/nitroergic stress; Iron porphyrinate, antioxidant defense.

Introduction

Huntington's disease (HD), a neurodegenerative disorder linked to selective degeneration of striatal neurons, is characterized by dementia and choreiform movements [16]. An active role of a mutated form of the protein huntingtin, as well as excitotoxic events involving N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor overactivation and energy metabolism disruption, have been implicated as mechanisms triggering neuronal cell death in this inheritable disease [24].

Different phenotypic models of HD in rodents have been described in literature [2,25], most of them based on the capability of some neurotoxins to resemble those behavioral, morphological, neurochemical and even molecular (through the characterization of signaling pathways) features of HD. Among them, the intrastriatal infusion of the glutamate analogue quinolinic acid (QUIN), as well as the intrastriatal or intraperitoneal injection of the micotoxin and energy metabolism depletory agent 3-nitropropionic acid (3-NP), are widely employed up to these days [2]. While 3-NP is a neurotoxin that produces selective atrophy of striatal and cortical neurons, QUIN has the advantage that it represents a model more closely related with the etiology of HD given that this toxin is an endogenous metabolite of tryptophan at the kynurenine pathway (Stone, 1993) already characterized to play a role during the early low-grade HD [7], besides of being also involved in some other neurological disorders such as hepatic encephalopathy, AIDS-dementia complex, etc. [9]. Of note, several reports testing behavioral/motor alterations after the intrastriatal infusion of these toxicants describe asymmetric changes proportional to the extension of the striatal tissue damage [27,28]; however, when developing these models for behavioral assessments, it should be considered that a model of bilateral intrastriatal lesion is more closely related with the pathological condition of HD than an unilateral infusion, thus allowing a

simultaneous impairment of this brain region at both hemispheres. In this regard, 3-NP has the advantage that it readily crosses the blood-brain barrier, so when given intraperitoneally to animals this condition equally affect both hemispheres while avoids the invasiveness of a topic infusion, but still there is no control on how much of the toxicant reaches the brain. Therefore, the bilateral striatal infusion of moderate doses of these agents represents a useful tool to study motor activity. Interestingly, only few reports in literature are available mentioning this strategy in laboratory animals [23], and less of them seem to explore this condition in rodents [13,26]. Here we compared this experimental condition in both models in order to correlate motor impairment with biochemical changes occurring in striatal tissue.

On the other hand, since both 3-NP and QUIN are capable of producing toxic patterns by recruiting excitotoxicity, energy metabolism impairment, oxidative/nitregic stress, inflammatory processes and further cell death through reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS) formation [5,17,19,27], the active participation of nitric oxide (NO) and activated NO synthases (NOS) has been suggested as a key factor for triggering major expressions of tissue damage. In this regard, it is known that NO reacts with high affinity with superoxide anion, thereby producing the highly toxic and pro-apoptotic RNS peroxynitrite (ONOO^-) [10,12]. In turn, ONOO^- reacts with several biomolecules, thus affecting their structure and function. In addition, ONOO^- triggers inflammatory processes and contributes directly to neurodegenerative events [30]. In a previous report, we demonstrated that a pretreatment of rats with the ONOO^- decomposition catalyst 5,10,15,20-tetrakis (4-sulfonatophenyl)porphyrinate iron (III) (Fe(TPPS)) significantly reduces the excitotoxic and oxidative damage induced by QUIN in the rat nervous system, thereby evidencing an active role of nitregic stress exerted through ONOO^- formation in

the toxic pattern evoked by QUIN [19]. In that report, a behavioral approach to characterize protection was assessed through the evaluation of asymmetric circling behavior challenged by apomorphine, since animals were unilaterally lesioned with QUIN into the right striatum. More recently, we showed that targeting nitrenergic stress with the same protective agent also results in a considerable reduction of inflammatory markers induced by QUIN in rat striatal tissue at a morphological level [6]. However, it seems clear that still a gross behavioral correlation of protection is needed in this model in order to support the preventive actions that targeting nitrenergic stress may represent through the achievement of major integrative motor/kinetic functions to be preserved. Moreover, since to our knowledge, the only report showing protection of Fe(TPPS) on the toxic model produced by 3-NP belongs to our group, and it was carried out under in vitro conditions, a motor/kinetic link is also needed in this model. Furthermore, it is necessary to correlate the motor impairment produced by these toxins - and probably prevented by Fe(TPPS) – with biochemical markers in the brain in order to involve mechanisms potentially influencing the behavioral patterns monitored.

For all these purposes, in this work we evaluated whether the motor disturbances produced by two neurotoxins largely used as phenotypic models of HD are able to resemble the kinetic impairment observed in the human disorder, as well as the possible participation of ONOO⁻ (through a pretreatment with Fe(TPPS)) in the course of these motor/kinetic deficits elicited either by QUIN or 3-NP, both infused intrastrially to rats in a bilateral scheme of administration. Those criteria evaluated here considered markers of motor activity and included total distance walked/traveled, and horizontal and vertical movements. In addition, aberrant behavior was correlated with changes in some biochemical markers of striatal damage, such as oxidative stress and mitochondrial

dysfunction. Our results suggest that the hypokinetic patterns produced by these models resembles the late stages of HD and may be linked to functional changes in nerve tissue due to early ROS formation and mitochondrial dysfunction. Similarities [13] and discrepancies [26] with previous reports are discussed.

Materials and Methods

Reagents

QUIN, 3-NP, malondialdehyde (MDA), and thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) were all obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Fe(TPPS) (catalogue # 341492) was purchased from Calbiochem (San Diego, CA, USA). All other reagents were obtained from other known commercial sources. Deionized water obtained from a Direct-Q UV 3 system (Millipore, MA, USA) was used for preparation of solutions.

Animals

Male Wistar bred-in-house rats (280-320 g) were used throughout the study. For all experimental purposes, animals were housed five-per cage in acrylic box cages and provided with a standard commercial rat chow diet (Laboratory rodent diet 5001, PMI Feeds Inc., Richmond, IN, USA) and water *ad libitum*. Housing room was maintained under constant conditions of temperature (25 ± 3 °C), humidity (50 ± 10 %) and lighting (12 h light/dark cycles). A total number of 48 rats was used throughout the study. All procedures with animals were carried out according to the *National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* and the local guidelines on the ethical use of animals from the Health Ministry of Mexico. During the experiments, all efforts were made to minimize animal suffering. For experimental groups and procedures, animals were randomly selected.

Experimental design and drug administration scheme

Drugs were administered strictly according to our previous reports [6,19]. Briefly, animals were randomly grouped into four experimental groups (eight rats per group), each group corresponding to one of the following treatments: I) Control (or Sham); II) Fe(TPPS) alone; III) QUIN alone; IV) 3-NP alone; V) Fe(TPPS) + QUIN; and VI) Fe(TPPS) + 3-NP.

Rats from all groups were anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) and 30 min later infused for 2 min with a bilateral intrastriatal injection of 1 μ l of either QUIN (120 nmol/ μ l per side; Groups III and V), 3-NP (250 nmol/ μ l per side; Groups IV and VI), or saline (Groups I and II) at the following stereotaxic coordinates: 0.5 mm anterior to bregma, \pm 2.6 mm lateral to bregma and 4.5 mm ventral to the dura [18]. Sham group (Group I) and rats administered with QUIN or 3-NP alone (Groups III and IV, respectively) received saline solution i.p. (pH 7.4) prior to the stereotaxic procedure. Fe(TPPS) was dissolved in isotonic saline solution and administered two hours before the intrastriatal infusion of QUIN (Group V), 3-NP (Group VI), or saline (Group II). Fe(TPPS) was given as a single injection at a dose (10 mg/kg, i.p.) previously reported to be protective in the toxic model produced by QUIN [6,19], as well as other neurotoxic models (Imam et al., 2000), and nearly above that pre-calculated dose for iron porphyrinates to completely scavenge ONOO⁻ (6 mg/kg) [3]. Groups of treated animals were evaluated for the analysis of their kinetic patterns and further killed by decapitation for analytical purposes at two times, 24 hours and 7 days post-lesion.

In this work, the striatum was chosen as the target brain region for QUIN and 3-NP because of its enriched amount of N-methyl-D-aspartate receptors, which in turn are particularly susceptible to be over-activated, either directly or indirectly by both toxins. In addition, the high basal redox activity of this region provides major substrates for oxidative and nitrosative reactions, further leading to oxidative cell damage [6].

Evaluation of motor activity in rats

Rats from all treatment groups were evaluated in regard to their motility patterns, according to the method recently described by us [27]. Briefly, their motor/kinetic activity was recorded in a Versamax Animal Activity Monitor and Analyzer (AccuScan

Instruments, Inc, Columbus, Ohio, USA) for 60 min at 24 h and 7 days post-lesion. The device is able to detect movements in different directions since animals under evaluation often cross virtual lines projected by movement detectors; then, these movements are recorded as counts. In addition, the device is capable of following the precise trajectory and distance of animals walking by these sensors. Thus, the collected criteria from this device included total distance walked/traveled, as well as total horizontal and vertical activities. Consequently, the results were expressed either as total distance walked or traveled (cm) in 60 min, or as total counts per 60 min, respectively. Moreover, although an evaluation period of 60 min is considered an adequate time for animals to display quantifiable motor activity, a brief period of adaptation to the device should be considered. Therefore, in order to reduce false recordings and bias, all animals were habituated in the device during three sessions of 10 min each, one session per day, prior to surgical procedures.

Preparation of crude synaptosomal P2 fractions

Synaptosomal fractions were obtained from the striatal tissues of treated animals by differential centrifugations, using a method previously described by us [8,20]. Briefly, immediately after evaluated in regard to their motor activity, animals were decapitated and their brains were rapidly removed and preserved on ice for few seconds until the striata were dissected out and homogenized in sucrose (0.32 M). Homogenates were centrifuged at $1073 \times g$ for 10 min, and supernatants were then re-centrifuged at $17,172 \times g$ for 15 min. The resultant pellets were resuspended in 40 mL HEPES buffer (NaCl 0.1 M, NaH_2PO_4 0.001 M, NaHCO_3 0.005 M, CaCl_2 0.001 M, glucose 0.006 M, HEPES 0.01 M, pH 7.4). Synaptosomal fractions were preserved at $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ until the analytical procedures were performed.

Measurement of lipid peroxidation

LP was estimated in synaptosomal fractions by the thiobarbituric acid (TBA) assay, according to a previous report of our group [20]. Aliquots of 250 μ L containing the synaptosomal fractions were added with 250 μ l of the TBA reagent (0.75 g TBA+ 15 g trichloroacetic acid + 2.54 mL HCl) and the final mixtures were heated at 94 °C for 30 min. Then, samples were kept on ice for 5 min and centrifuged at 3000 \times g for 15 min. The optical density from the supernatants was measured in a ThermoSpectronic Genesys 8 spectrophotometer at a wavelength of 532 nm. Final concentrations of TBA-reactive substances (TBARS) were calculated by interpolation in a standard curve of malondialdehyde and corrected by the content of protein per sample [15]. Results were expressed as nanomoles of TBARS per milligram protein.

Estimation of mitochondrial function

Mitochondrial function was evaluated by the MTT reduction assay, according to a previous report of our group [20]. This method is currently employed as an index of the functional status of the respiratory chain as the formation of formazan salts occurs through the action of mitochondrial dehydrogenases in viable cells or cell fractions. Aliquots of 400 μ l containing the synaptosomes were added with 8 μ l of MTT (5 mg/mL) and mixtures were incubated at 37 °C for 60 min. Quantification of formazan was made by the estimation of optical density in a ThermoSpectronic Genesys 8 spectrophotometer at a wavelength of 570 nm. Results were expressed as the percentage of MTT reduction with respect of control values.

Superoxide dismutase activity assay

Total SOD activity was assessed by a competitive inhibition assay previously reported by us [8,21], using a xanthine/xanthine oxidase system to reduce nitroblue tetrazolium (NBT), which served as the indicator reagent. Briefly, the mixture reaction contained 0.122 mM

EDTA, 30.6 mM NBT, 0.122 mM xanthine, 0.006% bovine serum albumin and 49 mM sodium carbonate, all final concentrations. Tissue samples were homogenized in 9 ml/g tissue 50 mM phosphate buffer (pH 7.0)/Triton X-100 (1%). Five hundred microliters of striatal homogenates were added to 2.45 ml of the mixture described above, and then 50 ml of xanthine oxidase (2.8 U/l, final concentration) were added and incubated at 27 8C for 30 min. Reactions were stopped with 1 ml of 0.8 mM cupric chloride, and optical density was recorded at 560 nm. The amount of striatal protein that inhibited 50% of maximal NBT reduction was defined as one unit of SOD activity. Results were expressed as units of SOD activity per mg protein. For these experimental procedures, protein concentrations were measured according to Lowry and coworkers [15].

Statistical analysis

All results were expressed as mean values \pm one SEM. Statistical differences among groups from all assessments were analyzed by one-way ANOVA, followed by Tukey's test for multiple comparisons (GraphPad Prism 5.0). Levels of significance were set at $P < 0.05$ for all tests.

Results

Effects of Fe(TPPS) on the QUIN- and 3-NP-induced motor/kinetic deficits in rats

Data of motor/kinetic assessments collected from QUIN-, 3-NP- and/or Fe(TPPS)-treated rats are shown in Figures 1, 2 and 3. For all three cases, in A we present results from day 1 post-lesion, whereas in B, results from day 7 post-lesion are shown.

In Figure 1, the total distance walked/traveled by animals, recorded in 60 min, is represented. At both times tested, baseline of distance walked/traveled (in Sham) ranged 4000-6000 cm. Significant hypokinetic patterns were displayed by QUIN-treated rats at 1 and 7 days post-lesion (-38 % and -60 % of Control, respectively). The motor dysfunction produced by 3-NP to rats was more intense than that generated by QUIN at both times tested. 3-NP reduced motor activity in animals by -79 % for 24 h post-lesion, and -64 % for 7 days post-lesion, as compared with Sham animals. For both cases (toxins), and at both times tested, Fe(TPPS) was able to reduce, in a moderate manner, the hypokinetic patterns (-15 % and -45 % of Control for QUIN, and -57 % and -46 % of Control for 3-NP, at 1 and 7 days post-lesion, respectively). The only significant protective effect exerted by Fe(TPPS) was found on the QUIN-induced hypokinesia at 24 h, where the ONOO- catalyst recovered motility almost up to Control levels, thus suggesting that the early formation of this species in the QUIN toxic model might be directly responsible for the early behavioral changes observed, an observation based on a previous report of our group demonstrating the early formation of ONOO- in this model and its deleterious consequences [19]. When administered alone, Fe(TPPS) had no effect on this marker at both times tested (data not shown).

Figure 2 summarizes the results on the assessment of horizontal activity at 1 and 7 days post-lesion. Baseline of this marker ranged 5000-6500 counts in 60 min of evaluation. Moderate depletions of this marker were found in those animals treated with QUIN and 3-

NP at 24 h post-lesion, and those treated with QUIN at 7 days post-lesion. Of note, although the horizontal activity displayed by those animals treated with 3-NP at 7 days post-lesion revealed a moderate tendency to hyperkinesia, this effect was not statistically different of Sham animals. In regard to Fe(TPPS), this agent was unable to prevent the QUIN- and 3-NP-induced alterations in horizontal activity at both times tested.

Data on the assessment of vertical activity from QUIN-, 3-NP-, and/or Fe(TPPS)-treated animals at 1 and 7 days post-lesion are represented in Figure 3. Baseline of vertical activity ranged 2000-3000 counts in 60 min of evaluation. QUIN exerted a significant reduction in vertical activity in rats at both times tested (-54 % and -81 % of Control at 1 and 7 days post-lesion, respectively). Similarly, 3-NP produced a pronounced hypokinetic pattern at both times tested (-90 % and -85 % of Control at 1 and 7 days post-lesion, respectively), but with the difference that the reduction in this marker produced by 3-NP was more intense than that of QUIN at 24 h post-lesion. For the QUIN toxic model, the hypokinetic patterns were significantly worsened at 7 days post-lesion. Significant prevention of this decreased activity was produced by pretreatment of rats with Fe(TPPS) against QUIN at 24 h post-lesion (-17 % of Control), and against 3-NP at 7 days post-lesion (-48 % of Control), while no significant protection was exerted by the porphyrinate on QUIN effects at 7 days post-lesion (-65 % of Control), nor on the 3-NP-induced hypokinetic pattern at 24 h post-lesion (-63 % of Control). This is suggestive of a more pronounced toxic action of ONOO- at early times in the QUIN toxic model, and a late toxic effect of this species in the 3-NP toxic model. Fe(TPPS) alone, administered to animals, exerted no effect on vertical activity as compared with Sham rats at both times tested (data not shown).

Effects of Fe(TPPS) on the QUIN- and 3-NP-induced striatal lipid peroxidation in rat synaptosomal fractions

Figure 4 shows data on the peroxidative damage to lipids collected from QUIN-, 3-NP- and/or Fe(TPPS)-treated rats. In A, results from day 1 post-lesion; in B, results from day 7 post-lesion. TBARS formation was used as an accurate index for assessment of oxidative damage to lipids in striatal synaptic membranes from QUIN- and 3-NP-lesioned rats. When compared with Sham animals, LP was significantly enhanced by QUIN at 1 and 7 days post-lesion (50 % and 114 %, respectively), whereas 3-NP was able to significantly enhance TBARS formation only at post-lesion day 7 (100 %), but not at day 1 (23 %), thereby supporting a late toxic effect of 3-NP, establishing an important mechanistic difference with the toxic model evoked by QUIN. Pretreatment of rats with Fe(TPPS) completely inhibited the LP induced by QUIN (-2.5 % and 4 % of Control, at days 1 and 7 post-lesion, respectively) and 3-NP (9 % of Control at day 7 post-lesion), thus emphasizing the fact that the late toxic pattern evoked by 3-NP, in contrast to that of QUIN, is dependent also on the late oxidative actions of ONOO⁻. When given alone to animals, Fe(TPPS) had no effect on TBARS formation when compared with Sham animals (4 % and -3 % at 1 and 7 days post-lesion, respectively).

Effects of Fe(TPPS) on the QUIN- and 3-NP-induced striatal mitochondrial dysfunction in rat synaptosomal fractions

Figure 5 presents data on the mitochondrial reductive capacity obtained from QUIN-, 3-NP- and/or Fe(TPPS)-treated rats. In A, results from day 1 post-lesion; in B, results from day 7 post-lesion. MTT reduction was employed as an approach to evidence changes in mitochondrial function in striatal synaptic membranes from QUIN- and 3-NP-lesioned animals. Baseline of mitochondrial activity was set at 100 %. As expected, both toxins significantly decreased the reductive capacity of mitochondria at both times tested (-25 % and -43 % of Control for QUIN, and -32 % and -40 % of Control for 3-NP at 1 and 7 days

post-lesion, respectively). These effects were prevented by Fe(TPPS) pretreatment to QUIN-lesioned animals at 1 and 7 days post-lesion (8 % and -10 % of Control, respectively), but in the case of the 3-NP-lesioned animals, Fe(TPPS) recovered the reductive capacity of mitochondria only at day 1 post-lesion (6 % of Control), exerting only a moderate recovery at 7 days post-lesion (-25 % of Control). The latter is interpreted by us as indicative of a mitochondrial metabolism compromised at such level by 3-NP at 7 days post-lesion, that at least this marker is difficult to recover by Fe(TPPS), even though ONOO- might be still exerting cell damage at the late time, as suggested by those findings from the assessment of lipid peroxidation. Once again, Fe(TPPS) alone had no effect on MTT reduction as compared with Control at both times tested (-4 % and -2 % of Control at 1 and 7 days post-lesion, respectively).

Effects of Fe(TPPS), QUIN and 3-NP on the total SOD activity in the rat striatum

Figure 6 presents data on the total SOD activity collected from QUIN-, 3-NP- and/or Fe(TPPS)-treated rats. In A, results from day 1 post-lesion; in B, results from day 7 post-lesion. Inhibition of NBT reduction in a xanthine/xanthine oxidase system was employed as the indicator of SOD activity in striatal tissues from QUIN- and 3-NP-lesioned animals. Baseline of SOD activity under these experimental conditions was found around 12 Units for both times tested. No significant changes were detected in tissues collected from QUIN-treated animals when compared to Sham rats at 1 or 7 days post-lesion. 3-NP induced a moderate decrease in SOD activity only at 24 h post-lesion, and Fe(TPPS) recovered SOD activity in these animals back to basal levels. The apparent lack of SOD activity in these models should not be considered as unequivocal evidence of a lack of a role of this enzyme in the tested models. This issue is discussed in the following section.

Discussion

The most relevant findings of this work revealed that the bilateral intrastriatal infusions of either QUIN or 3-NP produce significant motor/kinetic deficits. These alterations, in turn,

may be linked to detrimental changes in synaptic membranes compromising the function of nerve cells up to the point they are unable to integrate major kinetic functions, thus expressing hypokinetic patterns. The motor alterations evidenced in our study by the toxicants QUIN and 3-NP were seen at both early (24 h post-lesion) and late (7 days post-lesion) toxic challenges, thereby suggesting a persistent toxic effect of both agents in time, and they comprised total distance walked/traveled – which is probably the most accurate index of motility among all tested here – and vertical activity – likely indicating exploratory behavior -. Thus, since the synaptic functions depending on the integrity of membrane were affected by oxidative damage - through lipid peroxidation - as well as a deficient mitochondrial function – through a compromised reductive capacity -, we hypothesize that in both models, these biochemical changes can be accounting for the aberrant kinetic patterns observed. Additional to these alterations, we have recently described morphological and histochemical changes in the striatal tissue of QUIN-lesioned animals [6] that matched with the time-course of changes observed in this work, strongly suggesting that biochemical and behavioral disturbances in these models are indubitably accompanied by tissue damage. Thus, in spite of the evidence collected here, it seems plausible to consider that biochemical and morphological changes mediated by ROS and RNS formation, excitotoxicity through NMDA receptor over-activation, and mitochondrial dysfunction, might be all involved in “killing” sufficient nerve cells to make difficult for the lesioned animals to maintain motor functions to an optimum level.

Of note, our bilateral injection models were able to reproduce previous findings of another group [13], where the specific bilateral infusion of 3-NP at higher doses produced hypoactive patterns of spontaneous locomotor activity. In more detail, these authors found that seven days following bilateral infusion of 500 and 750 nmol of 3-NP, Sprague-Dawley

rats developed deficits in both locomotor behavior and passive avoidance, thus supporting the hypoactive component evoked by this toxicant that we also found in this study, regardless the fact that we used a bilateral infusion of a much lower dose (250 nmol). In contrast, our results are in disagreement with those reported by Shear and coworkers [26], who described that two weeks after the bilateral infusions of QUIN (200 nmol) and 3-NP (700 nmol), the lesioned rats displayed an increase in motor activity, but only QUIN produced this effect for two more weeks. These changes were accompanied, according to the authors, by impairment in balance beam task, learning, and significant striatal atrophy. Then, based on their findings, authors concluded that QUIN produced more moderated lesions corresponding to the early symptoms of HD, while 3-NP produced more intense changes corresponding to both later symptoms and juvenile onset of HD. Although we do not have a solid explanation for these discrepancies, the differences in the results of Shear's study with ours, and those from Koutouzis' group, could be related, for instance, with several variables involved in the same investigations, such as the animal strain used, the doses employed (ours were, again, much lower) and/or the methods considered for evidencing altered motor tasks (i.e., the performance in specific devices and the tests selected in each study). Moreover, although Roitberg and coworkers [23] also described hyperactive patterns in bilaterally QUIN-lesioned male *Cebus apella* monkeys, in contrast to what occurred with rats in Shear's study, the striatal lesions produced by QUIN in monkeys were much stronger than those evoked by 3-NP, thereby emphasizing that the use of these paradigms under different experimental conditions can - and will - result in contrasting results. Nonetheless, whatever the predominant mechanism underlying the specific behavioral alterations in these paradigms, altogether, these discrepancies are relevant as they raised the question of how much these bilateral lesion models resemble

behavioral components also seen in HD. Therefore, derived from collected evidence from our group and others, it seems that these acute models are capable, under the specific conditions employed in this protocol, of reproducing the late hypokinetic stage of HD. More studies detailing the precise nature of these observations are needed.

In regard to the apparent lack of an active role of SOD in these models, although in this study we did not find significant changes in total SOD activity at both times tested, nor in the Fe(TPPS)-treatment condition, an involvement of this enzyme should not be discarded at all since there are reports in literature demonstrating that SOD activity can be affected by these toxicants in the course of few hours [1,22]. Thus, some considerations should be taken into account to explain this lack of effect: 1) since both models were produced through a bilateral injection of the toxicants, and this condition implied a reduction of the administered doses, these lower concentrations were apparently insufficient to produce changes in SOD activity. Therefore, lower doses of the toxicants might, in turn, be responsible for adaptative or compensatory responses at the striatum, probably inducing a resistance of the attacked tissue to preserve the basal activity or integrity of SOD; 2) not excluded from the first consideration, it should be considered also that the post-lesion times at which total SOD activity were evaluated are longer than those of other reports [1,22], so even when at the tested times we found only a moderate decrease of SOD activity for the case of 3-NP at 24 h post-lesion, such effect might be reflecting an early depletion of SOD activity. In conclusion, both doses and times of evaluation might be critical for the lack of changes for SOD activity obtained in this study. Therefore, we might probably just look at the adaptative phase of the enzyme, with no major changes in its activity after stabilization.

Of further consideration, for those specific behavioral and biochemical markers that exhibited different magnitude when comparing the early effects of QUIN and 3-NP (at 24 h

post-lesion) - and despite the obvious explanation for these effects that the primary target of the first toxicant is over-activation of NMDA receptors, and the later preferentially targets mitochondrial functions - since both agents recruit NMDA receptor-mediated excitotoxicity, the differential effects could be also explained by recent evidence demonstrating that 3-NP toxicity involves non-classical excitotoxic mechanisms as this toxin, in contrast to QUIN, has been shown to exhibit a kynurenic acid-resistant NMDA-dependent toxic pattern that is independent of the glycine site [4]. This relevant finding accounts to explain how primary pathways of the two toxins might diverge during the first stages of toxicity, further leading to different toxic features.

On the other hand, we have recently demonstrated that the unilateral intrastriatal infusion of QUIN to Wistar rats is capable to produce toxic events currently characterized by NMDA receptor overactivation, circling behavior, lipid peroxidation, mitochondrial dysfunction, depleted GABA levels, and activation of pro-inflammatory components in a ONOO⁻-dependent manner [6,19]. Interestingly, the deleterious actions of the QUIN-induced ONOO⁻-mediated toxicity described in these reports were attenuated by the well-known ONOO⁻ decomposition catalyst, the iron porphyrinate Fe(TPPS), thereby supporting the concept that this species is actively participating in the pattern of toxicity elicited by QUIN. A further contribution of the present study is the suggestion that ONOO⁻ is also inducing biochemical alterations at a synaptic level that might be leading to further motor disturbances in the toxic model evoked by a bilateral administration of QUIN, as the pretreatment of rats with Fe(TPPS) attenuated or prevented the mentioned markers. In addition, our present results demonstrate for the first time that the use of this agent constitutes an important protective strategy against nitroergic stress induced by 3-NP, thus emphasizing the therapeutic potential of porphyrinates as neuroprotective agents in models

of neurodegenerative disorders. We based all these considerations on the fact that Fe(TPPS), an iron-based water-soluble porphyrinate, is known to act as a selective ONOO⁻ decomposition catalyst through the isomerization of ONOO⁻ exclusively to nitrate. In addition, Fe(TPPS) has been shown to readily cross the blood-brain barrier [11,12]. Of note, the protective properties of Fe(TPPS) have been recently associated with the reduction of IκB-α degradation - an inhibitor factor of the nuclear transcription factor NF-κB which is currently involved in apoptotic cell death – at a myocardial level [14]. If Fe(TPPS) is acting by this mechanism, or by other means, to reduce the QUIN- and 3-NP-induced neurotoxicity and motor impairment remains to be elucidate in further studies.

In summary, the formation of ONOO⁻ is relevant for the study of experimental models of those motor dysfunctions found in HD patients since this species is commonly formed as the result of augmented oxidative and nitrenergic activity, as well as neurodegenerative events, and its current biomarker 3-nitrotyrosine has been shown to be enhanced during the progression of neurotoxic processes in neurodegenerative disorders [31]. For these reasons, targeting nitrenergic stress, as we did in this study, represents a promising tool for the design of therapeutic alternatives for these disorders.

Acknowledgements

This work was supported by CONACyT-México Grant 48370-Q (A.S.) and DGAPA PAPIIT (IN 207007 (JP)).

References

- [1] Binienda Z, Simmons C; Hussain S; Slikker W Jr; Ali SF. Effect of acute exposure to 3-nitropropionic acid on activities of endogenous antioxidants in the rat brain. *Neurosci Lett* 1998;251: 173-176.
- [2] Borlongan CV; Koutouzis TK; Sanberg PR. 3-Nitropropionic acid animal model and Huntington's disease. *Neurosci Biobehav Rev* 1997;21: 289-293.
- [3] Crow JP. Peroxynitrite scavenging by metalloporphyrins and thiolates. *Free Radic Biol Med* 2000;28: 1487-1494.
- [4] Fatokun AA, Smith RA. Stone TW. Resistance to kynurenic acid of the NMDA receptor-dependent toxicity of 3-nitropropionic acid and cyanide in cerebellar granule neurons. *Brain Res* 2008;1215: 200-207.
- [5] Galpern WR. Matthews RT, Beal MF, Isacson O. NGF attenuates 3-nitrotyrosine formation in a 3-NP model of Huntington's disease. *Neuroreport* 1996;7: 2639-2642.
- [6] González-Cortés C. Salinas-Lara C, Gómez-López MA, Tena-Suck ML, Pérez-De La Cruz V, Rembao-Bojorquez D, Pedraza-Chaverrí J, Gómez-Ruiz C, Galván-Arzate S, Ali SF, Santamaría A. Iron porphyrinate Fe(TPPS) reduces brain cell damage in rats intrastrially lesioned by quinolinate. *Neurotoxicol Teratol* 2008;30: 510-519.
- [7] Guidetti P, Luthi-Carter RE, Augood SJ, Schwarcz R. Neostriatal and cortical quinolinate levels are increased in early grade Huntington's disease. *Neurobiol Dis* 2004;17: 455-461.
- [8] Herrera-Mundo MN, Silva-Adaya D, Maldonado PD, Galván-Arzate S, Andrés-Martínez L, Pérez-De La Cruz V, Pedraza-Chaverrí J, Santamaría A. S-Allylcysteine prevents the rat from 3-nitropropionic acid-induced hyperactivity, early markers of oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Neurosci Res* 2006;56: 39-44.

- [9] Heyes MP, Saito K, Crowley JS, Davis LE, Demitrack MA, Der M, Dilling LA, Elia J, Kruesi MJ, Lackner A, Larsen SA, Lee K, Leonard HL, Markey SP, Martin A, Milstein S, Mouradian MM, Pranzatelli MR, Quearry BJ, Salazar A, Smith M, Strauss SE, Sunderland T, Swedo SW, Tourtellotte WW. Quinolinic acid and kynurenine pathway metabolism in inflammatory and non-inflammatory neurological disease. *Brain* 1992;115: 1249-1273.
- [10] Imam SZ, Ali SF. Aging increases the susceptibility to methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity in rats: correlation with peroxynitrite production and hyperthermia. *J Neurochem* 2001;78: 1-10.
- [11] Imam SZ, Islam F, Itzhak Y, Slikker Jr W, Ali SF. Prevention of dopaminergic neurotoxicity by targeting nitric oxide and peroxynitrite: implications for the prevention of methamphetamine-induced neurotoxic damage. *Ann NY Acad Sci* 2000;914: 157-171.
- [12] Imam SZ, Newport GD, Itzhak Y, Cadet JL, Islam F, Slikker W Jr, Ali SF. Peroxynitrite plays a role in methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity: evidence from mice lacking neuronal nitric oxide synthase gene or over expressing copper-zinc superoxide dismutase. *J Neurochem* 2001;76: 745-749.
- [13] Koutouzis TK, Borlongan CV, Freeman TB, Cahill DW, Sanberg PR. Intrastratial 3-nitropropionic acid: a behavioral assessment. *Neuroreport* 1994;5: 2241-2245.
- [14] Lancel S, Tissier S, Mordon S, Marechal X, Depontieu F, Scherpereel A, Chopin C, Neviere R. Peroxynitrite decomposition catalysts prevent myocardial dysfunction and inflammation in endotoxemic rats. *J Am Coll Cardiol* 2004;43: 2348-2358.
- [15] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193: 265-275.

- [16] Martin JB, Gusella JF. Huntington's disease: pathogenesis and management. *N Engl J Med* 1986;315: 1267-1276.
- [17] Noack H, Lindenau J, Rothe F, Asayama K, Wolf G. Differential expression of superoxide dismutase isoforms in neuronal and glial compartments in the course of excitotoxicity mediated neurodegeneration: relation to oxidative and nitregeric stress. *Glia* 1998;23: 285-297.
- [18] Paxinos G, Watson G. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. New York: Academic Press, 1998. 256 pp.
- [19] Pérez-De La Cruz V, González-Cortés C, Galván-Arzate S, Medina-Campos ON, Pérez-Severiano F, Ali SF, Pedraza-Chaverrí J, Santamaría A. Excitotoxic brain damage involves early peroxynitrite formation in a model of Huntington's disease in rats: protective role of iron porphyrinate 5,10,15,20-tetrakis (4-sulfonatophenyl)porphyrinate iron (III). *Neuroscience* 2005;135: 463-474.
- [20] Pérez-De La Cruz V, González-Cortés C, Pedraza-Chaverrí J, Maldonado PD, Andrés-Martínez L, Santamaría A. Protective effect of *S*-allylcysteine on 3-nitropropionic acid-induced lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction in rat brain synaptosomes. *Brain Res Bull* 2006;68: 379-383.
- [21] Pérez-Severiano F, Rodríguez-Pérez M, Pedraza-Chaverrí J, Maldonado PD, Medina-Campos ON, Ortiz-Plata A, Sánchez-García A, Villeda-Hernández J, Galván-Arzate S, Aguilera P, Santamaría A. *S*-Allylcysteine, a garlic-derived antioxidant, ameliorates quinolinic acid-induced neurotoxicity and oxidative damage in rats. *Neurochem Int* 2004;45: 1175–1183.

- [22] Rodríguez-Martínez E, Camacho A, Maldonado PD, Pedraza-Chaverri J, Santamaría D, Galván-Arzate S, Santamaría A. Effect of quinolinic acid on endogenous antioxidants in rat corpus striatum. *Brain Res* 2000;858: 436-439.
- [23] Roitberg BZ, Emborg ME, Sramek JG, Palfi S, Kordower JH. Behavioral and morphological comparison of two nonhuman primate models of Huntington's disease. *Neurosurgery* 2002;50: 137-145.
- [24] Santamaría A, Jiménez ME. Oxidative/nitrosative stress, a common factor in different neurotoxic paradigms: an overview. *Curr. Topics Neurochem* 2005;4: 1-20.
- [25] Schwarcz R, Foster AC, French ED, Whetsell WO Jr, Köhler C. Excitotoxic models for neurodegenerative disorders. *Life Sci* 1984;35: 19-32.
- [26] Shear DA, Dong J, Gundy CD, Haik-Creguer KL, Dunbar GL. Comparison of intrastriatal injections of quinolinic acid and 3-nitropropionic acid for use in animal models of Huntington's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1998;22: 1217-1240.
- [27] Silva-Adaya D, Pérez-De La Cruz V, Herrera-Mundo MN, Mendoza-Macedo K, Villeda-Hernández J, Binienda Z, Ali SF, Santamaría, A. Excitotoxic damage, disrupted energy metabolism, and oxidative stress in the rat brain: antioxidant and neuroprotective effects of L-carnitine. *J Neurochem* 2008;105: 677-689.
- [28] Song J, Lee ST, Kang W, Park JE, Chu K, Lee SE, Hwang T, Chung H, Kim M. Human embryonic stem cell-derived neural precursor transplants attenuate apomorphine-induced rotational behavior in rats with unilateral quinolinic acid lesions. *Neurosci Lett* 2007;423: 58-61.
- [29] Stone TW. Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids. *Pharmacol Rev* 1993;45: 309-379.

- [30] Torreilles F, Salman-Tabcheh S, Guérin M, Torreilles J. Neurodegenerative disorders: the role of peroxynitrite. *Brain Res Brain Res Rev* 1999;30: 153–163.
- [31] van der Veen RC, Hinton DR, Incardonna F, Hofman FM. Extensive peroxynitrite activity during progressive stages of central nervous system inflammation. *J Neuroimmunol* 1997;77: 1-7.

Consent Statement

All authors of the present manuscript declare no conflicts of interest at all in regard to any issue related with this study. In addition, all persons involved gave their informed consent prior to their inclusion in the study. Under full agreement, and on behalf of all authors, the corresponding author signs this form.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Abel Santamaría', is written over a large, horizontal, oval-shaped scribble.

Dr. Abel Santamaría

Figure Legends

Figure 1. Fe(TPPS) slightly ameliorated the QUIN- and 3-NP-induced deficient kinetic behavior in rats. This figure presents results of a kinetic marker of motor activity assessed as the total distance walked or traveled by rats intrastrially infused with saline (Sham), QUIN or 3-NP. Animals were pretreated with vehicle (PBS) or Fe(TTPS) (10 mg/kg, i.p.) and 120 min later, they received a bilateral intrastriatal infusion of vehicle (PBS), QUIN (120 nmol/ μ l per side) or 3-NP (250 nmol/ μ l per side). Motor activities were recorded at 1 (A) and 7 days (B) post-lesion. Data represent mean values \pm SEM of n = 8 rats per group. ^aP<0.05, statistically different of Sham (Control). One-way ANOVA followed by Tukey's test for multiple comparisons.

Figure 2. No significant effects on horizontal motor activity were exerted by QUIN, neither by 3-NP, nor by Fe(TPPS) in rats. This figure shows results of a kinetic marker of motor activity assessed as the total number of horizontal movements displayed by rats intrastrially infused with saline (Sham), QUIN or 3-NP. Animals were pretreated with vehicle (PBS) or Fe(TTPS) (10 mg/kg, i.p.) and 120 min later, they received a bilateral intrastriatal infusion of vehicle (PBS), QUIN (120 nmol/ μ l per side) or 3-NP (250 nmol/ μ l per side). Motor activities were recorded at 1 (A) and 7 days (B) post-lesion. Data represent mean values \pm SEM of n = 8 rats per group. ^aP<0.05, statistically different of Sham (Control). One-way ANOVA followed by Tukey's test.

Figure 3. Fe(TPPS) attenuated the QUIN- and 3-NP-induced decreased vertical motor activity in rats. This figure presents results of a kinetic marker of motor activity assessed as

the total number of vertical movements displayed by rats intrastrially infused with saline (Sham), QUIN or 3-NP. Animals were pretreated with vehicle (PBS) or Fe(TPPS) (10 mg/kg, i.p.) and 120 min later, they received a bilateral intrastriatal infusion of vehicle (PBS), QUIN (120 nmol/ μ l per side) or 3-NP (250 nmol/ μ l per side). Motor activities were recorded at 1 (A) and 7 days (B) post-lesion. Data represent mean values \pm SEM of n = 8 rats per group. ^aP<0.05, statistically different of Sham (Control); ^bP<0.05, statistically different of QUIN alone; ^cP<0.05, statistically different of 3-NP alone. One-way ANOVA followed by Tukey's test for multiple comparisons.

Figure 4. Fe(TPPS) prevented the quinolinate (QUIN)- and 3-nitropropionate (3-NP)-induced lipid peroxidation in striatal synaptosomal P2 fractions. The figure shows results of LP assessed as the quantification of the thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) in striatal synaptosomes from rats intrastrially infused with saline (Sham), QUIN or 3-NP. Animals were pretreated with vehicle (PBS) or Fe(TPPS) (10 mg/kg, i.p.) and 120 min later, they received a bilateral intrastriatal infusion of vehicle (PBS), QUIN (120 nmol/ μ l per side) or 3-NP (250 nmol/ μ l per side). Synaptosomal fractions were obtained at 1 (A) and 7 days (B) post-lesion. Data represent mean values \pm SEM of n = 8 rats per group. ^aP<0.05, statistically different of Sham (Control); ^bP<0.05, statistically different of QUIN alone; ^cP<0.05, statistically different of 3-NP alone. One-way ANOVA followed by Tukey's test for multiple comparisons.

Figure 5. Fe(TPPS) reverted the QUIN- and 3-NP-induced mitochondrial dysfunction in striatal synaptosomal P2 fractions. The figure presents results of mitochondrial function assessed as the quantification of MTT reduction in striatal synaptosomes from rats

intrastriatally infused with saline (Sham), QUIN or 3-NP. Animals were pretreated with vehicle (PBS) or Fe(TPPS) (10 mg/kg, i.p.) and 120 min later, they received a bilateral intrastriatal infusion of vehicle (PBS), QUIN (120 nmol/ μ l per side) or 3-NP (250 nmol/ μ l per side). Synaptosomal fractions were obtained at 1 (A) and 7 days (B) post-lesion. Data represent mean values \pm SEM of n = 8 rats per group. ^aP<0.05, statistically different of Sham (Control); ^bP<0.05, statistically different of QUIN alone; ^cP<0.05, statistically different of 3-NP alone. One-way ANOVA followed by Tukey's test for multiple comparisons.

Figure 6. No changes were produced by Fe(TPPS), neither by QUIN, nor by 3-NP, on the total SOD activity in rat striatal tissue from rats at 1 and 7 days post-lesion. The figure shows results of total SOD activity assessed as the number of arbitrary units of NBT reduction in striatal tissues from rats intrastriatally infused with saline (Sham), QUIN or 3-NP. Animals were pretreated with vehicle (PBS) or Fe(TPPS) (10 mg/kg, i.p.) and 120 min later, they received a bilateral intrastriatal infusion of vehicle (PBS), QUIN (120 nmol/ μ l per side) or 3-NP (250 nmol/ μ l per side). Striatal tissues were collected at 1 (A) and 7 days (B) post-lesion. Data represent mean values \pm SEM of n = 8 rats per group. One-way ANOVA.

Figure 1

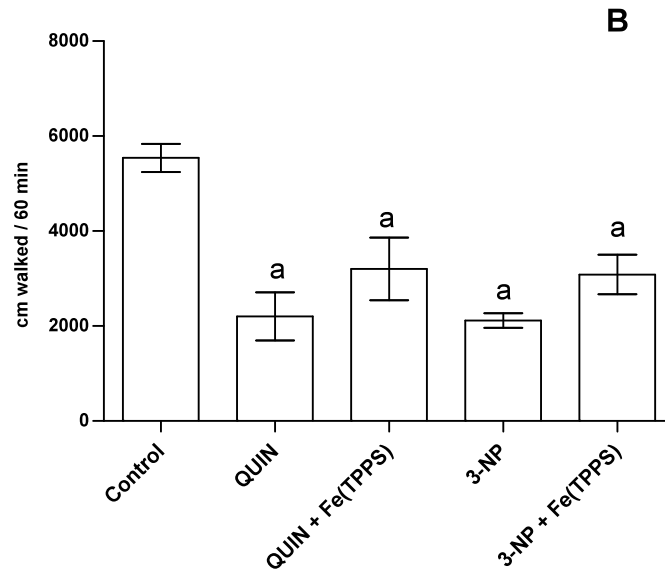
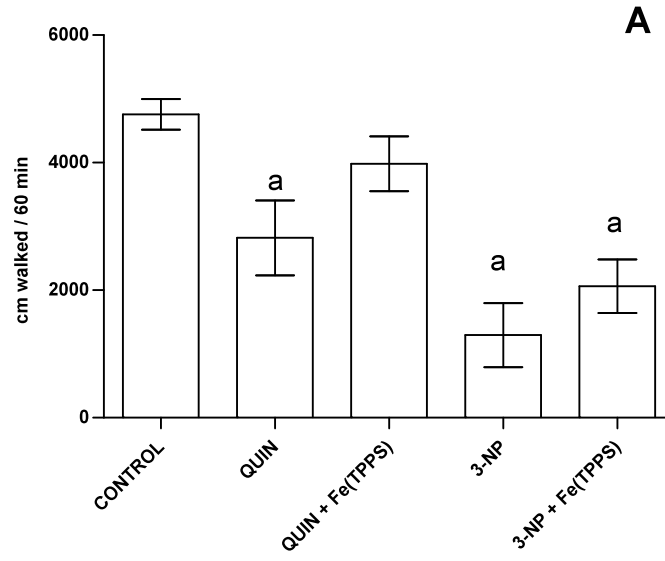


Figure 2

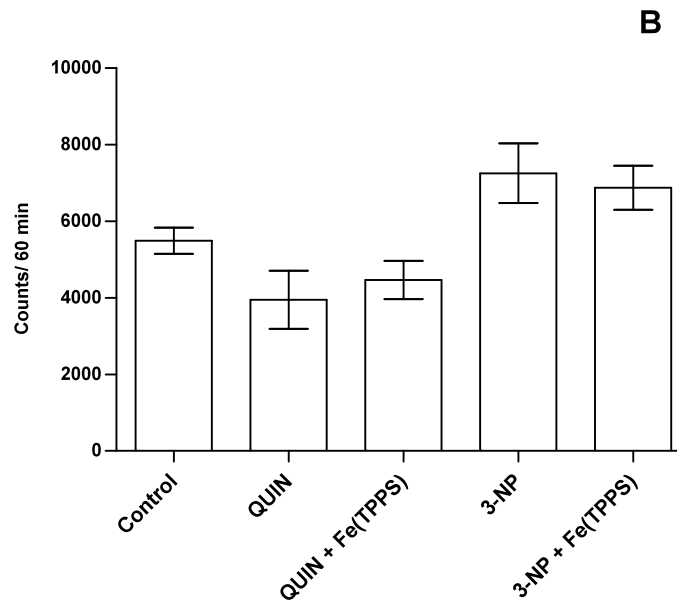
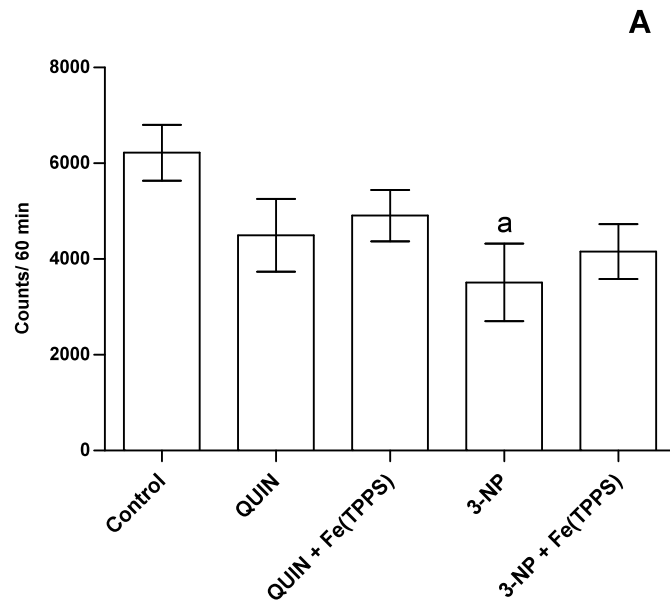


Figure 3

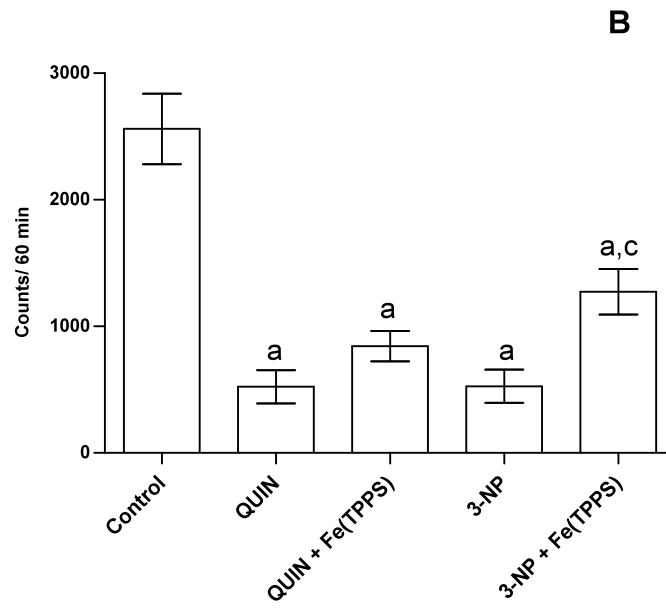
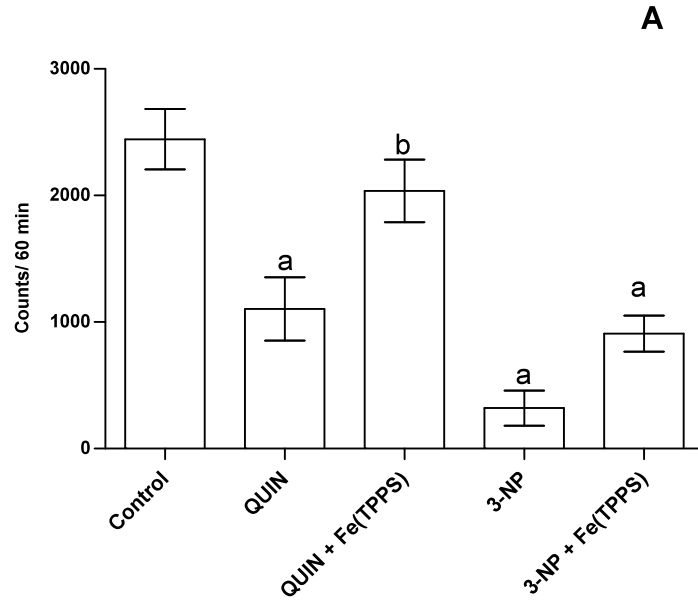


Figure 4

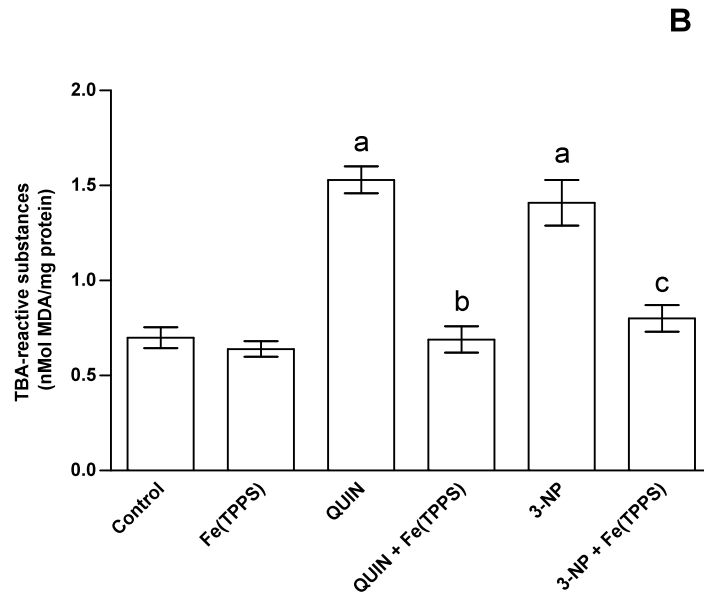
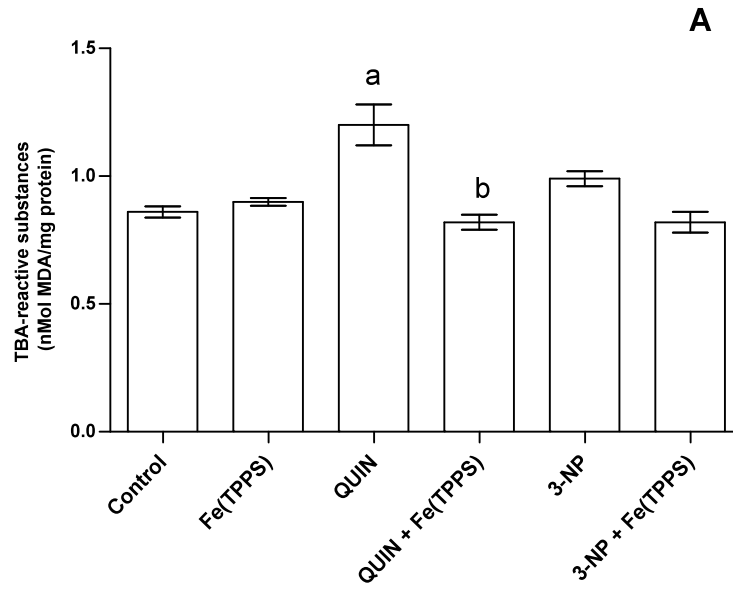


Figure 5

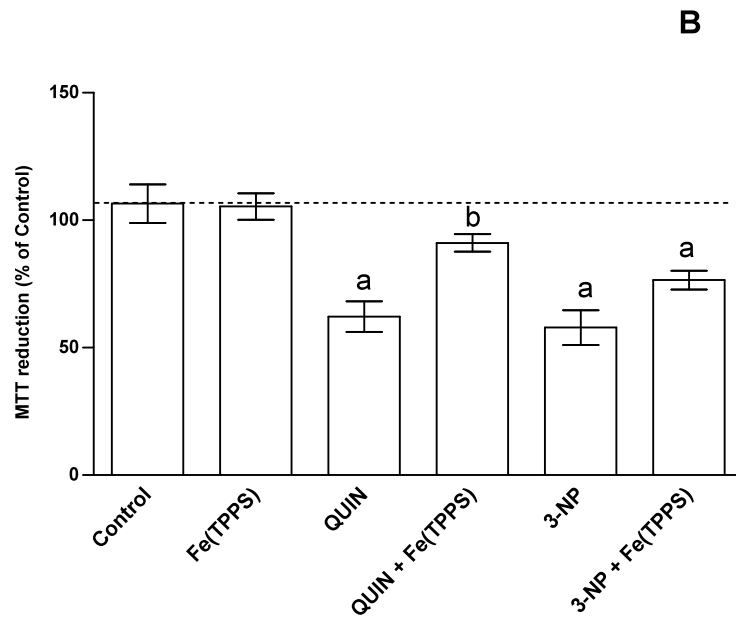
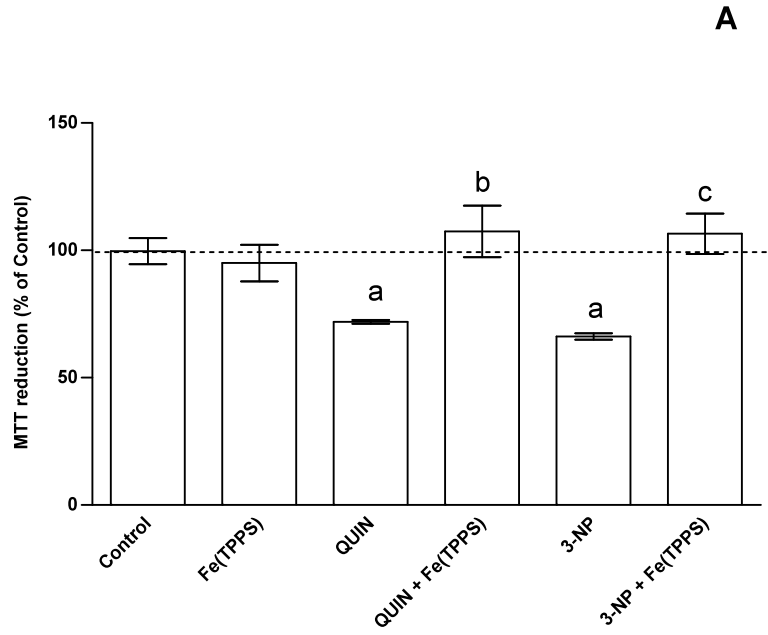
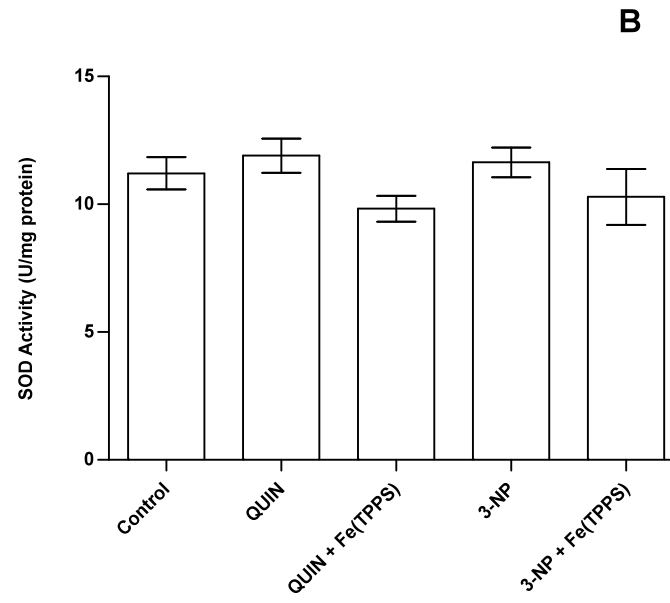
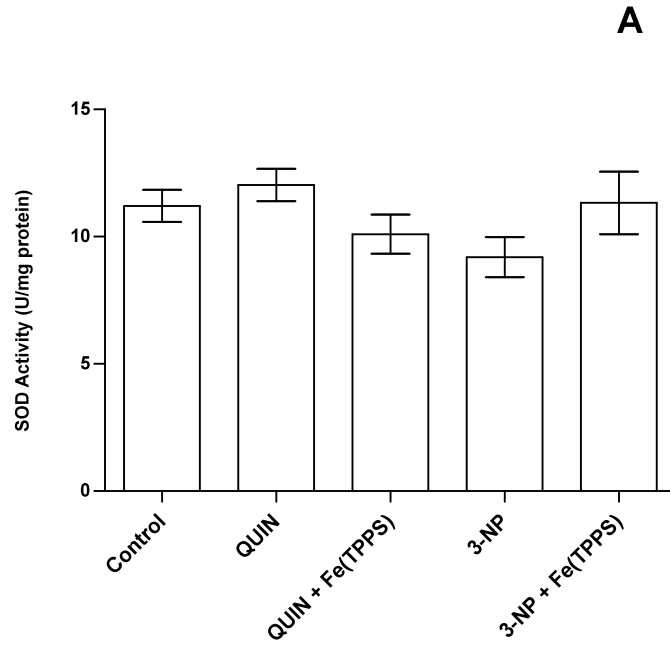


Figure 6



Cytoplasmic calcium mediates oxidative damage in an excitotoxic/energetic deficit synergic model in rats

Verónica Pérez-De La Cruz,^{1,2} Mina Konigsberg,² José Pedraza-Chaverri,³ Nieves Herrera-Mundo,¹ Mauricio Díaz-Muñoz,⁴ Julio Morán,⁵ Teresa Fortoul-van der Goes,⁶ Adrián Rondán-Zárate,⁶ Perla D. Maldonado,⁷ Syed F. Ali⁸ and Abel Santamaría,^{1,8}

¹Laboratorio de Aminoácidos Excitadores, and ⁷Laboratorio de Patología Vasculare Cerebral, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, S.S.A., México D.F. 14269, México

²Departamento de Ciencias de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. A.P. 55–535, C.P. 09340, México D.F., México

³Departamento de Biología, Facultad de Química, ⁵Departamento de Neurociencias, and ⁶Departamento de Biología Celular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 04510, México

⁴Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Instituto de Neurobiología, Campus UNAM-Juriquilla, Querétaro 76230, QRO, Mexico

⁸Neurochemistry Laboratory, Division of Neurotoxicology, National Center for Toxicological Research/Food and Drug Administration, Jefferson, AR 72079, USA

Keywords: 3-nitropropionic acid, cytoplasmic Ca²⁺, lipid peroxidation, quinolinate, synergism

Abstract

Excessive calcium is responsible for triggering different potentially fatal metabolic pathways during neurodegeneration. In this study, we evaluated the role of calcium on the oxidative damage produced in an *in vitro* combined model of excitotoxicity/energy deficit produced by the co-administration of quinolinate and 3-nitropropionate to brain synaptosomal membranes. Synaptosomal fractions were incubated in the presence of subtoxic concentrations of these agents (21 and 166 μM , respectively). In order further to characterize possible toxic mechanisms involved in oxidative damage in this experimental paradigm, agents with different properties – dizocilpine, acetyl L-carnitine, iron porphyrinate and S-allylcysteine – were tested at increasing concentrations (10–1000 μM). Lipid peroxidation was assessed by the formation of thiobarbituric acid-reactive substances. For confirmatory purposes, additional fractions were incubated in parallel in the presence of the intracellular calcium chelator 1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid-acetoxymethyl ester (BAPTA-AM). Under physiological conditions of extracellular calcium availability, synaptosomes exposed to both toxins displayed an increased lipoperoxidation (76% above controls), and this effect was partially attenuated by the tested agents as follows: dizocilpine = iron porphyrinate > acetyl L-carnitine > S-allylcysteine. When the incubation medium was deprived of calcium, the lipoperoxidative effect achieved in this experimental paradigm was still high (49% above the control), and the order of attenuation was: iron porphyrinate > S-allylcysteine > acetyl L-carnitine > dizocilpine. BAPTA-AM was effective in preventing the pro-oxidant action of both toxins, promoting even lower peroxidative levels than those quantified under basal conditions. Our results suggest that the lipid peroxidation induced in synaptosomal fractions by quinolinate plus 3-nitropropionate is largely dependent on the cytoplasmic concentrations of calcium.

Introduction

Deficient energetic metabolism and excitotoxicity are two major features that are closely linked to neurodegenerative disorders. Which triggers the other remains to be resolved. On the other hand, neuronal excitotoxicity involves a physiopathological elevation of intracellular calcium in response to a continuous exposure to excitatory amino acids, mainly to glutamate, although the mere accumulation of glutamate as a triggering factor for neuronal damage is a matter of debate (Massieu *et al.*, 1995). A disturbance in calcium influx potentiates lethal metabolic pathways, which in turn involve degradative enzyme activation, enhanced formation of reactive oxygen and

nitrogen species (ROS/RNS), and mitochondrial dysfunction (Rami *et al.*, 1997). Massive calcium influx to nerve terminals is also responsible for augmenting the release of endogenous excitatory amino acids, and hence in propagating cell damage through a positive feedback, further leading cells to apoptotic or necrotic death.

It is also known that the central nervous system is particularly vulnerable to energetic variations for two main reasons: (i) the elevated metabolic rate of neuronal cells, and (ii) its low capacity to store energy substrates. Consequently, any deficiency in energy substrate supplies produces important changes in the intracellular and extracellular ionic concentrations and therefore in membrane potential (Martin *et al.*, 1994).

Quinolinic acid (QUIN), a well-known *N*-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) agonist, produces an excitotoxic pattern resembling the neurodegenerative features of Huntington's disease when

Correspondence: Dr A. Santamaría, ¹Laboratorio de Aminoácidos Excitadores, as above. E-mail: absada@yahoo.com

Received 25 October 2007, revised 1 January 2008, accepted 9 January 2008

administered intracerebrally to rodents and non-human primates (Schwarcz, 1983; Beal *et al.*, 1986; Stone, 1993). In addition, QUIN has been reported to be involved in the pathogenesis of different neurological disorders such as Alzheimer's disease, AIDS-dementia complex, hepatic encephalopathy and Huntington's disease itself (Sardar *et al.*, 1995; Heyes *et al.*, 1996; Walsh *et al.*, 2002; Guidetti *et al.*, 2004; Guillemin *et al.*, 2005). Although its toxic effect on neurons has been partially attributed to excitotoxic damage, it has been demonstrated also to be responsible for progressive mitochondrial alteration, resulting in inhibition of complexes II, III and II–III at the electron transport chain, with the consequent reduction of ATP levels, which in turn may contribute to neurodegeneration (Bordelon *et al.*, 1997; Ribeiro *et al.*, 2006; Schuck *et al.*, 2007). In addition, oxidative stress has been demonstrated to be part of its mechanism of toxicity (Santamaría & Rios, 1993; Behan *et al.*, 1999).

By contrast, 3-nitropropionic acid (3-NP), a mitochondrial mitochondria toxin capable of irreversibly inhibiting succinate dehydrogenase (SDH) (Complex II), has also been shown to induce rapid necrosis in some neurons, as well as late apoptosis in others when tested in hippocampal cell cultures (Pang & Geddes, 1997). This finding is consistent with the hypothesis of indirect excitotoxicity, suggesting that a fall in the ATP levels results in a deficient energy metabolism, further leading to membrane depolarization and sustained voltage-gated NMDAR activation by primary alteration of membrane Na^+ , K^+ -ATPases (Novelli *et al.*, 1988; Albin & Greenamyre, 1992; Beal *et al.*, 1993). Under such conditions, even low levels of extracellular glutamate may produce neuronal necrotic death (Behrens *et al.*, 1995; Pang & Geddes, 1997). Moreover, these findings suggest that calcium influx mediated by NMDAR might have a role in the specific type of cell death after a toxic insult involving deficient energy metabolism and excitotoxicity. More recently, Nasr *et al.* (2003) demonstrated that necrotic cell death induced by 3-NP in the presence or absence of extracellular glutamate is tightly associated with an elevation of cytoplasmic and mitochondrial calcium ($[\text{Ca}^{2+}]_c$ and $[\text{Ca}^{2+}]_m$, respectively), as this type of neuronal cell death is associated with a rapid and pronounced loss of ATP, as well as to a rapid decline in mitochondrial function, possibly involving further inhibition of Complex II–III, as recently demonstrated by Schuck *et al.* (2007). In summary, these findings led to the conclusion that the necrotic neuronal death induced by 3-NP in the presence of 'normal' levels of extracellular glutamate is associated with enhanced levels of cytoplasmic calcium, altered mitochondrial membrane potential, and further loss of ATP and activation of calpains. Furthermore, Jacquard *et al.* (2006) recently demonstrated that moderate activation of NMDAR by QUIN, combined with slight mitochondrial alterations by 3-NP, can synergically enhance striatal degeneration, in a mechanism primarily involving intracellular calcium dysregulation, while a lack of NMDAR hypersensitization was evidenced. Thus, it is necessary to consider an active role of ROS as mediators of neuronal damage by means of processes such as lipid peroxidation – a deleterious event characterized by structural and functional alteration of membrane lipids (Muralikrishna & Hatcher, 2006). Consequently, assessing the degree of peroxidative damage in this experimental paradigm constitutes a useful experimental tool to evaluate the role of intracellular calcium in neurotoxicity.

Given the evidence discussed above, and the fact that no reports are available regarding the precise role of extracellular and cytoplasmic calcium in the synergic actions of subtoxic concentrations of QUIN and 3-NP, here we evaluated the possible participation of extracellular and cytoplasmic calcium in the peroxidative effects produced by the co-incubation of QUIN plus 3-NP in brain synaptosomal fractions. For this purpose, synaptosomal membranes (a suitable *in vitro*

preparation containing synaptosomes that 'behave' as minicells) were incubated in the presence of both toxins under different experimental conditions: (i) physiological concentrations of extracellular calcium available in the medium, (ii) removed extracellular calcium, and (iii) incubation in a physiological medium in the presence of the well-known intracellular calcium chelator 1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid-acetoxymethyl ester (BAPTA-AM). In addition, with the aim of characterizing possible mechanisms involved in the oxidative damage generated by this experimental paradigm, lipid peroxidation (LP) was evaluated in the presence of agents acting at different levels, such as the NMDAR antagonist dizocilpine (MK-801), the metabolic precursor and antioxidant acetyl L-carnitine (ALCAR), the peroxynitrite (ONOO^-) decomposition catalyst 5,10,15,20-tetrakis-[4-sulfonatophenyl]-porphyrinato-iron[III] (FeTPPS), and the free radical scavenger S-allylcysteine (SAC).

Materials and methods

Animals

Crude synaptosomal P2 fractions were obtained from whole brains of male Wistar rats (280–320 g) from the vivarium of the National Institute of Neurology (Mexico City). A total of 24 rats were used throughout the study. Before the experiments, animals were housed five per cage in acrylic cages and provided with standard commercial rat diet (Laboratory rodent diet 5001, PMI Feeds Inc., Richmond, IN, USA) and water *ad libitum*. The housing room was maintained under constant conditions of temperature (25 ± 3 °C), humidity ($50 \pm 10\%$) and lighting (12-h light/dark cycles, light on at 07:00 h). All animals procedures were carried out according to the *National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* and the local guidelines on the ethical use of animals from the Health Ministry of Mexico.

Reagents

3-NP, QUIN, MK-801, thiobarbituric acid (TBA), malonaldehyde (MDA), ALCAR and 3-[4,5-dimethyl-thiazol]-2, 5-dephenyl tetrazolium bromide (MTT) were all obtained from Sigma Chemical Company (St Louis, MO, USA). FeTPPS was from Calbiochem (San Diego, CA, USA) and BAPTA-AM was from Invitrogen-Molecular Probes (Frederick, MD, USA). All other reagents were of reactive grade and were obtained from known commercial suppliers. Solutions were prepared using deionized water obtained from a Milli-RQ purifier system from Millipore (Billerica, MA, USA).

Preparation of synaptosomal P2 fractions

Synaptosomal-enriched fractions were obtained from whole rat brains by a method of differential centrifugation, with minor modifications (Dodd *et al.*, 1981; Santamaría *et al.*, 2003; Pérez-de La Cruz *et al.*, 2005). Briefly, rats were killed by decapitation and their whole brains (not including the cerebellum) were kept on ice for a few seconds and immediately homogenized in 20 volumes of 0.32 M sucrose in a Teflon-glass homogenizer. Homogenates were centrifuged at 1073g for 10 min, and supernatants re-centrifuged at 17 172g for 15 min. The resulting pellets were then resuspended in a buffer-HEPES solution (pH 7.4) containing 0.1 M NaCl, 0.001 M NaH_2PO_4 , 0.005 M NaHCO_3 , 0.001 M CaCl_2 , 0.006 M glucose and 0.01 M HEPES. For those experiments designed to evaluate the specific role of cytoplasmic calcium, CaCl_2 was omitted from the buffer-HEPES

solution [these fractions were termed 'limited-calcium' conditions or a condition where no calcium was added to the medium, although it is assumed that trace amounts (probably nanomolar concentrations) of calcium might be present in the deionized water]. The resuspended fractions containing synaptosomal membranes were preserved at -70°C in a REVCO system until they were used for the experiments.

Morphologic assessment of synaptosomal fractions

In order to assess the obtention of appropriate P2 fractions, resuspended aliquots containing synaptosomal membranes were fixed in a solution of glutaraldehyde 2% in 0.1 M sodium phosphate-buffered saline (pH 7.4) for 2 h, then washed with cacodylate buffer and post-fixed in 1% osmium tetroxide for 2 h. Then, samples were dehydrated in an ethanol series, and embedded in Araldite. Ultrathin sections (60–80 nm thickness) were cut and double-stained with uranyl acetate and lead citrate. Samples were observed and photographed in a Zeiss EM-109 transmission electron microscope.

Functional assessment of synaptosomal fractions by MTT reduction

To assess further the viability of synaptosomal membranes, MTT reduction was measured in additional aliquots mainly as a current index of the functional status of the respiratory chain and mitochondrial function, according to a method previously described (Pérez-de La Cruz *et al.*, 2006). Briefly, 600 μL -aliquots containing synaptosomal fractions already exposed to different treatments were added to 8 μL MTT (5 mg/mL) and incubated at 37°C for 60 min. Samples were then centrifuged at 15 300g for 15 min, and pellets were resuspended in 1 mL isopropanol for 1 h. A second step of centrifugation was performed at 1700g for 3 min. Quantification of formazan was estimated in supernatants by optical density in a ThermoSpectronic Genesys 8 Spectrometer at a wavelength of 570 nm. Results were expressed as the percentage of MTT reduction as compared to control values. Data from six experiments per group were collected.

Assay of LP

LP was assessed in synaptosomal fractions via the measurement of TBA-reactive substances (TBA-RS) assay, according to a previous report (Santamaría *et al.*, 1999). Aliquots of 250 μL containing suspended synaptosomal membranes were incubated in the presence of subtoxic concentrations of QUIN (21 μM) and 3-NP (166.6 μM) (data not shown). These subtoxic concentrations were calculated according to our own experiments and represent one-third of effective concentration 50 (EC_{50}). Synaptosomal fractions incubated in parallel were also exposed to increasing concentrations of MK-801, FeTPPS, ALCAR or SAC (10–1000 μM) (final volumes of 500 μL). All incubations were done at 37°C over 30 min in a shaking water bath (DUBNOFF LAB-LINE inku-shaker bath). At the end of the incubation, 500 μL of the TBA reagent (containing 0.75 g TBA, 15 g trichloroacetic acid and 2.54 mL HCl) was added and final solutions were re-incubated in a boiling water bath (94°C) for 20 min. Samples were then kept on ice for 5 min and centrifuged at 3000g for 15 min. The optical density of supernatants was estimated at a wavelength of 532 nm in a Genesys 8 spectrophotometer. The concentrations of MDA (expressed as nmol of TBA-RS/mg protein) were calculated by interpolation with a standard curve of MDA, carried out in parallel.

BAPTA-AM for cytoplasmic calcium sequestration

BAPTA-AM, a well-known membrane-permeable intracellular calcium chelator (Niesen *et al.*, 1991; Abdel-Hamid & Tymianski, 1997), was employed for complementary and confirmatory purposes as a tool for the estimation of LP under conditions of sequestered cytoplasmic calcium. Synaptosomal membranes were pre-incubated in the presence of BAPTA-AM (100 μM) over 30 min at 37°C , and QUIN and 3-NP were then added to the medium. In these experiments, the TBA-RS assay was also used for the estimation of LP.

Statistical analysis

All results are expressed as mean values \pm SEM. Data were analysed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's test for multiple comparisons, using the Prism 3.02 software (GraphPad, San Diego, CA, USA). Values of $P < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

Figure 1 shows a micrograph with morphologic details of typical synapses obtained via isolation of synaptosomal P2 fractions. Pre- and post-synaptic terminals as well as the active zone (arrows) can be seen clearly.

Figure 2 presents the functional assessment of these preparations through the MTT reduction assay. A value of 100% represents the full capacity of MTT reduction by mitochondria (control), whereas QUIN, 3-NP and their combination decreased this capacity by approximately 20, 30 and 60% below the control, respectively.

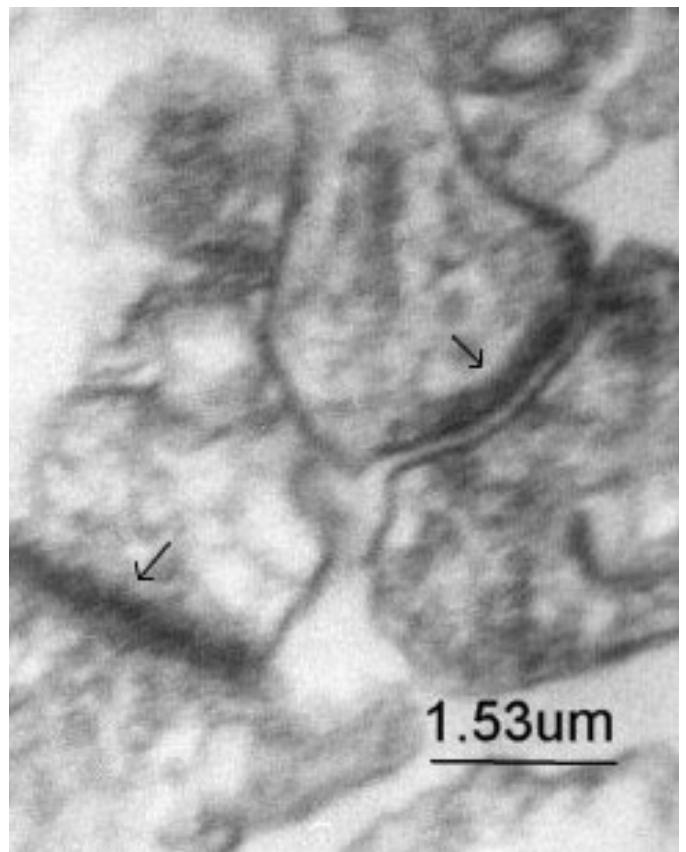


FIG. 1. Micrograph showing synaptosomes. Pre-synaptic and post-synaptic membranes are clear. Arrows denote active zones.

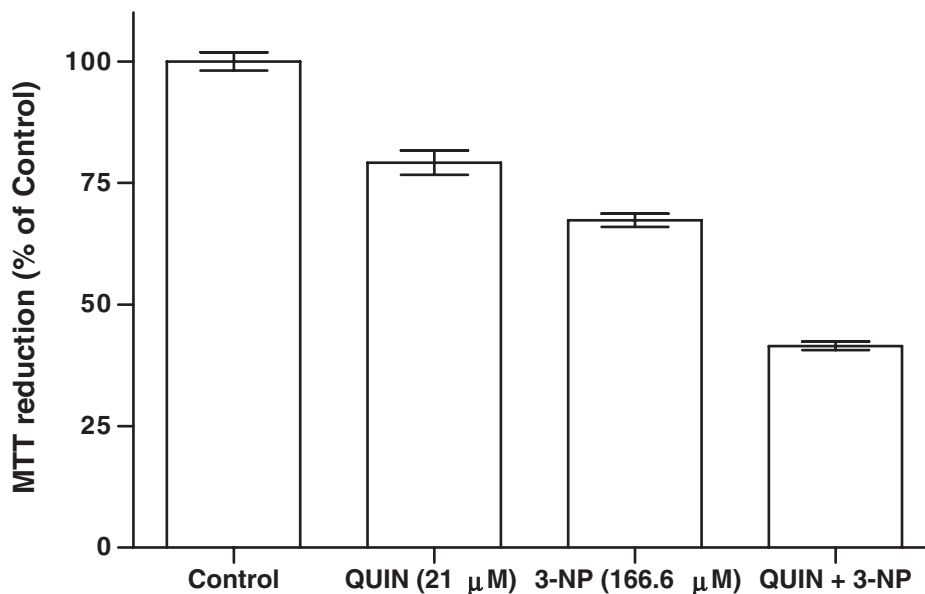


FIG. 2. Combined effect of subtoxic concentrations of 3-NP + QUIN (166.6 + 21 μ M) on MTT reduction in synaptosomal P2 fractions. One hundred per cent represents full reduction capacity of MTT in the control group. Each bar represents mean \pm SEM of six experiments per group.

These two assessments were taken as evidence of the structural and functional viability of our biological preparations, as well as the cellular damage associated with the treatment of each toxin and their combination.

Synergistic effect of 3-NP and QUIN on LP: partial attenuation by MK-801

Figure 3a shows the stimulatory effects of QUIN (20% above the control), 3-NP (33% above the control) and 3-NP + QUIN (76% above the control) on LP in synaptosomal P2 fractions. The combined effect of both toxins resulted in a synergic action on oxidative damage, as this effect does not correspond to an additive process, but a potentiated action. In addition, the NMDAR antagonist MK-801 produced a significant concentration-dependent reduction of LP when added to 3-NP + QUIN-treated synaptosomal membranes (30% below 3-NP + QUIN, maximum effect at 500 μ M concentration), although at high concentrations (750 and 1000 μ M), the effect was non-specific (enhanced LP).

Figure 3b presents LP data in synaptosomal fractions in a 'limited-calcium' medium. The oxidative damage evoked separately by 3-NP and QUIN was 30 and 10% above the control, respectively, whereas the combined effect of both toxic agents increased LP up to 49% above the control, suggesting an additive effect. Under these experimental conditions, MK-801 did not exert a significant prevention of the 3-NP + QUIN-induced LP at the concentrations tested. Higher concentrations (750 and 1000 μ M) produced a non-specific peroxidative effect.

ALCAR attenuates the LP induced by 3-NP + QUIN in a concentration-dependent manner, regardless of extracellular calcium

The effect of ALCAR on the oxidative damage generated by 3-NP + QUIN in brain synaptosomal membranes in the presence

of physiological levels of extracellular calcium is shown in Fig. 4a. This agent was able to reduce significantly the lipoperoxidative action of both toxins in a concentration-dependent manner (34% below 3-NP + QUIN, maximum effect at 1000 μ M concentration). Surprisingly, with no calcium added to the extracellular medium (Fig. 4b), we found a more effective concentration-related protection against the LP induced by 3-NP + QUIN, reaching basal levels of peroxidation at the highest concentration tested (1000 μ M).

FeTPPS decreases oxidative damage produced by 3-NP + QUIN

The ONOO⁻ decomposition catalyst FeTPPS was tested in the same model. FeTPPS also decreased the 3-NP + QUIN-induced LP in a concentration-dependent manner in a medium containing extracellular calcium, although at higher concentrations (750 and 1000 μ M) its effect became non-specific (Fig. 5a). The same trend was observed when FeTPPS was tested in a medium without calcium added (Fig. 5b). It is assumed that, given the colour that this reagent provides to the probes at such concentrations, this artifact may be interfering with the colorimetric detection of TBA-RS.

SAC exerts a partial protective effect on the 3-NP + QUIN-induced LP

The effect of the free radical scavenger SAC on the concerted peroxidative action of 3-NP and QUIN in synaptosomal fractions in a medium containing physiological concentrations of calcium is shown in Fig. 6a. LP was decreased by SAC in a concentration-dependent manner, although this was significant only at high concentrations (up to 500 μ M). In the case of a medium without added calcium (Fig. 6b), the SAC antioxidant action was more effective, as significant protection was found from the lower concentrations tested.

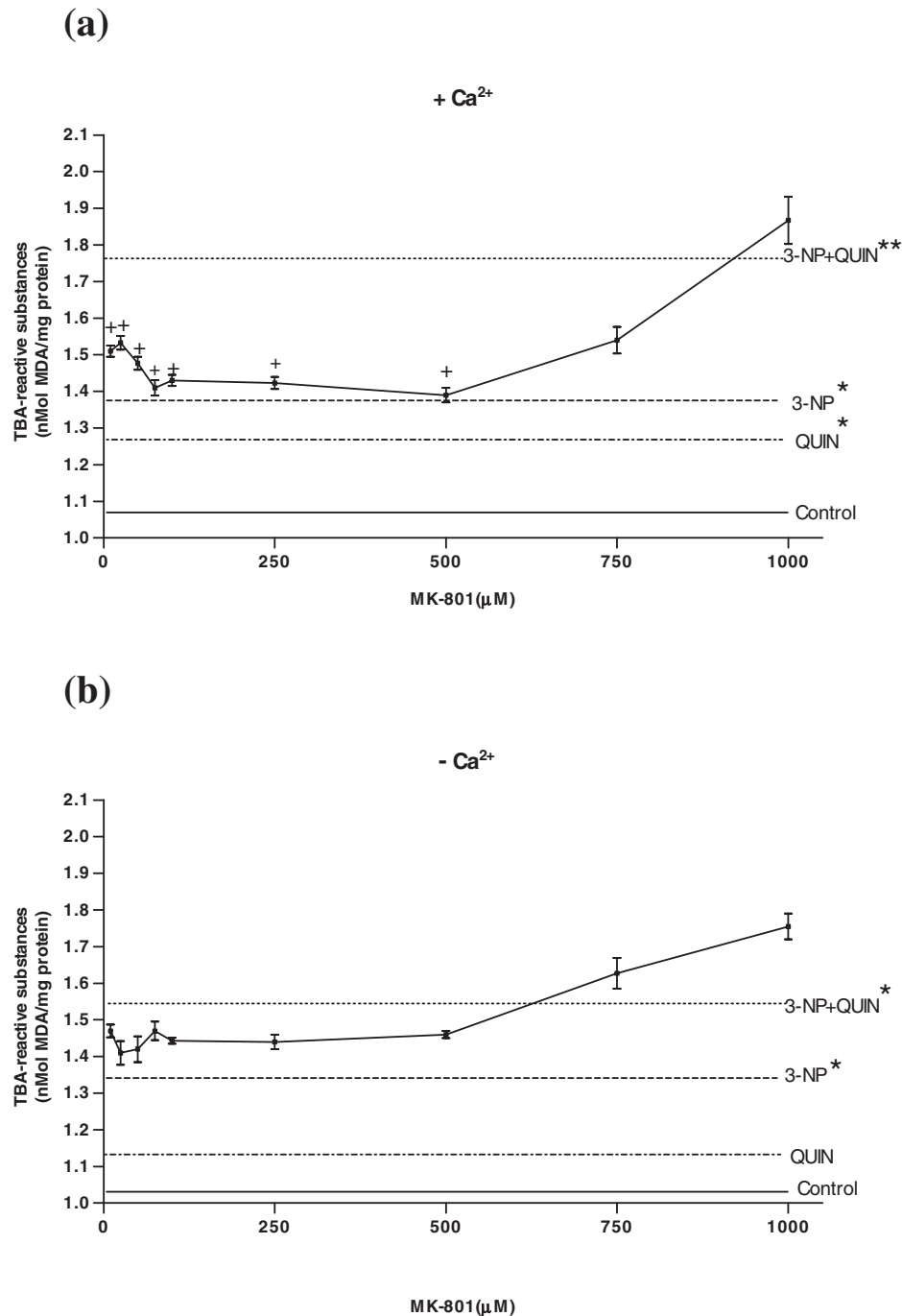


FIG. 3. Synergic effects of 3-NP + QUIN at subtoxic concentrations (166.6 + 21 μM) on LP in synaptosomal P2 fractions. The curve response effect of dizocilpine (MK-801, 10–1000 μM) is also shown. In (a) synaptosomal membranes were incubated in a medium containing physiological concentrations of calcium. In (b) synaptosomal fractions were incubated in a medium deprived of calcium. In both panels, mean ± SEM of six experiments per group are shown. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$, significantly different from control; + $P < 0.01$, significantly different from 3-NP + QUIN.

Chelating cytoplasmic calcium by BAPTA-AM results in complete blockade of oxidative damage induced by 3-NP + QUIN

Figure 7 shows the results of the effect of BAPTA-AM (10 μM), a well-known intracellular calcium chelator, on the synergic action of 3-NP + QUIN to produce LP in synaptosomal fractions. Addition of BAPTA-AM to the incubation medium decreased by 14 and 1% the LP induced by 3-NP and QUIN, respectively, when tested separately. In contrast, the enhancement of LP

produced by 3-NP + QUIN was reduced 35% by the BAPTA-AM treatment.

Discussion

Calcium has been claimed to be responsible for the degenerative events occurring during excitotoxic and energetic deficient episodes. As a consequence of these processes, oxidative damage takes place, affecting a considerable number of biological substrates. It has also

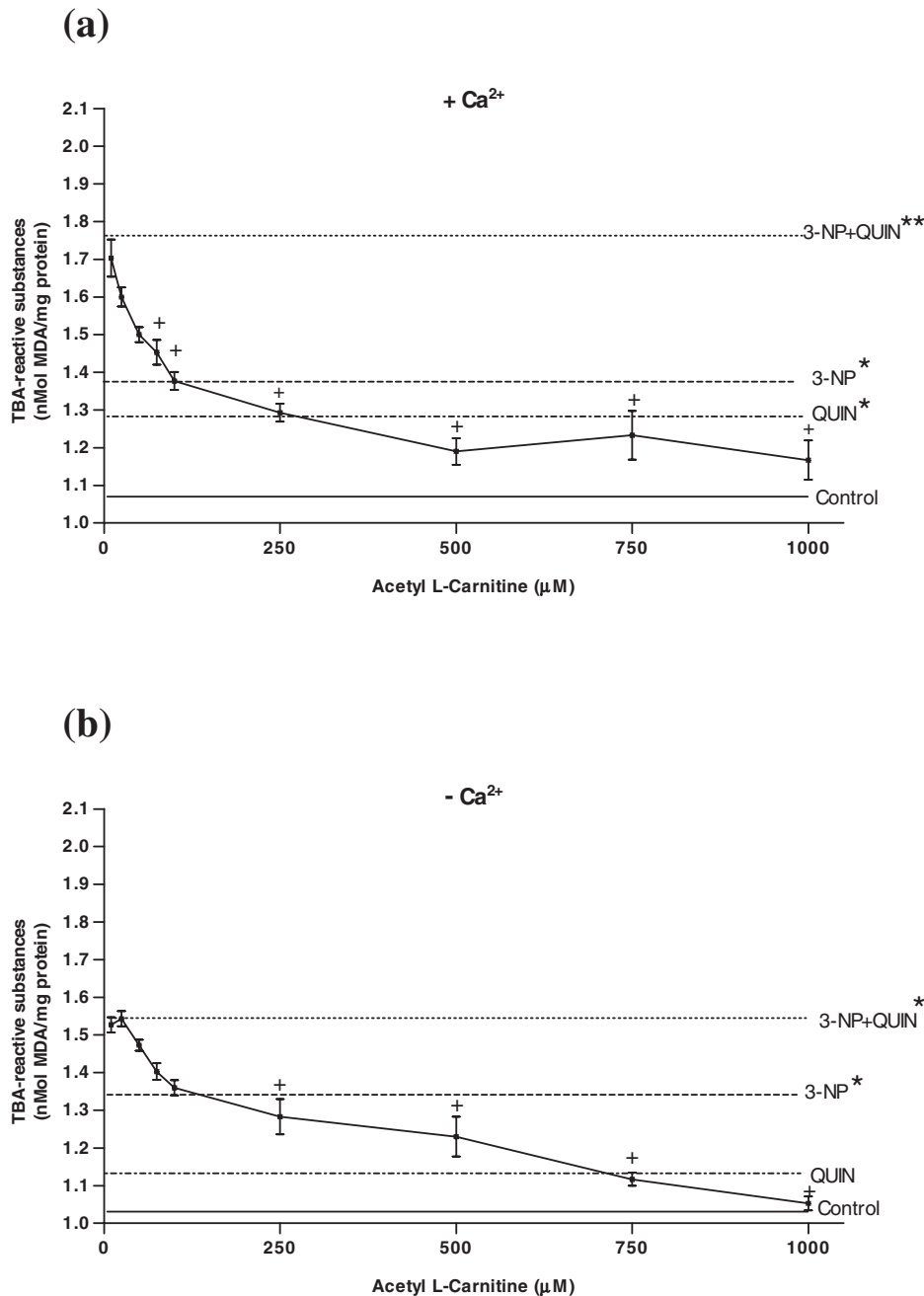


FIG. 4. Concentration–response effect of acetyl L-carnitine (ALCAR, 10–1000 μM) on the synergistic actions of 3-NP + QUIN to induce LP in brain synaptosomal membranes. In (a) synaptosomal membranes were incubated in a medium containing physiological concentrations of calcium. In (b) synaptosomal fractions were incubated in a medium deprived of calcium. In both panels, mean \pm SEM of six experiments per group are shown. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$, significantly different from control; + $P < 0.01$, significantly different from 3-NP + QUIN.

been hypothesized that calcium is directly responsible for such oxidative alterations; however, the precise origin of that calcium, whether extracellular or from endogenous sources, remains unknown. Thus, the question arises: is extracellular calcium more responsible for the oxidative damage to neurons during the occurrence of physiopathological excitotoxic/deficient energy metabolism condition or is it the calcium from internal stores (i.e. endoplasmic reticulum and mitochondria) that is responsible for oxidative alteration of cell membranes? Under this theoretical frame, and employing a synergistic model of excitotoxicity/deficient energy metabolism in synaptosomal fractions, we developed a series of three experimental

protocols in order to solve this question: (i) a condition of available extracellular calcium, also considered as a ‘normal condition’, where both extracellular and inner calcium were intact; (ii) a condition in which no calcium is added to the extracellular solution, where only inner calcium was available; and (iii) a confirmatory condition where, even though extracellular calcium was available in the medium, cytoplasmic calcium was sequestered by BAPTA-AM treatment.

The findings suggest that cytoplasmic calcium, more than extracellular, is responsible for the oxidative damage produced by the synergistic action of 3-NP + QUIN in rat brain synaptosomal

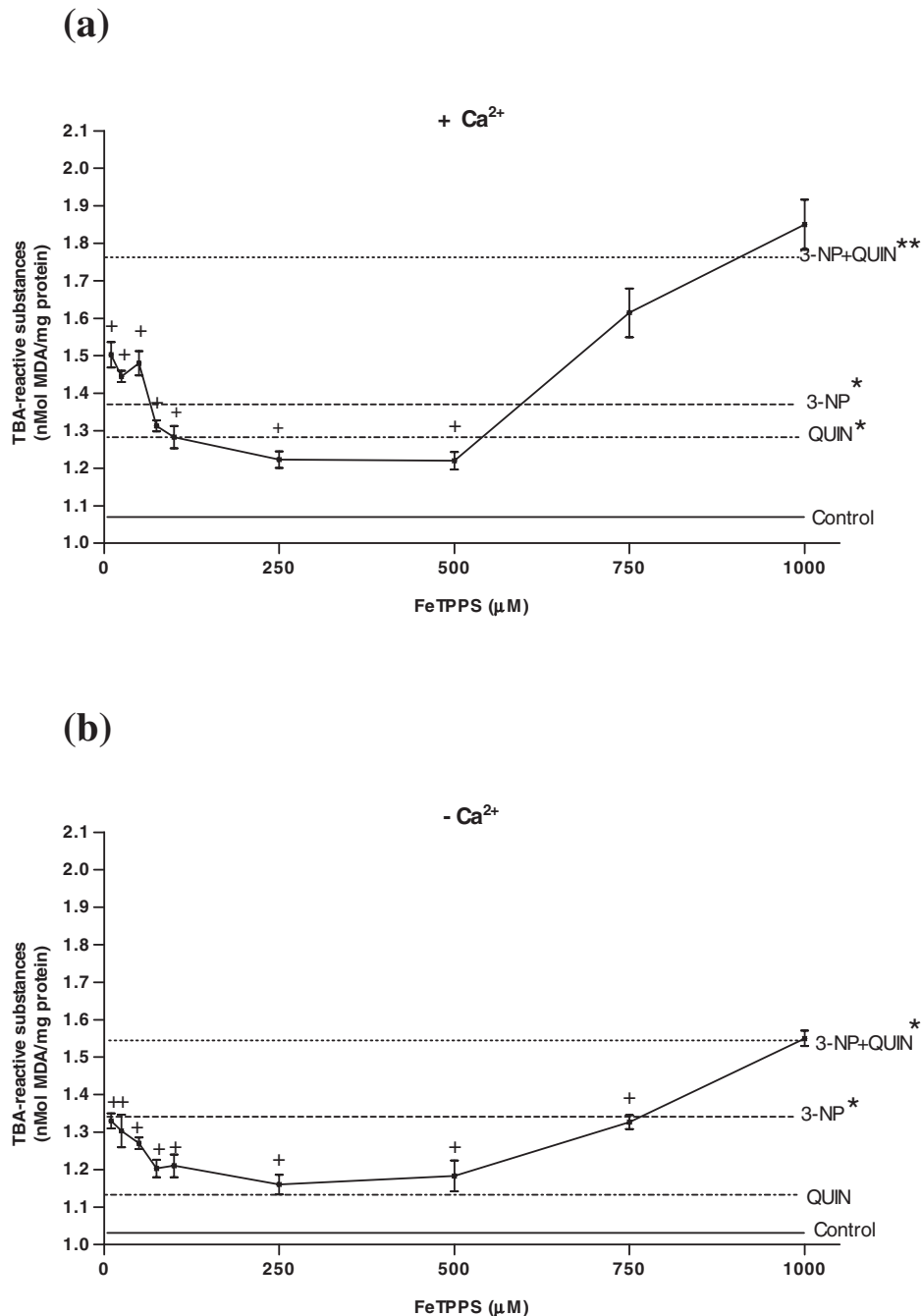


FIG. 5. Concentration–response effect of iron porphyrinate (FeTPPS, 10–1000 μM) on the synergic actions of 3-NP + QUIN to induce LP in brain synaptosomal membranes. In (a) synaptosomal membranes were incubated in a medium containing physiological concentrations of calcium. In (b) synaptosomal fractions were incubated in a medium deprived of calcium. In both panels, mean \pm SEM of six experiments per group are shown. * $P < 0.01$ and ** $P < 0.001$, significantly different from control; + $P < 0.01$, significantly different from 3-NP + QUIN.

membranes, as judged by the still high peroxidative levels reached by this condition during the deprivation of extracellular calcium (12% below the plus-Ca²⁺ condition and 49% above its control) (see Fig. 3), or the extremely low levels of LP when BAPTA-AM, the calcium chelator, was added to the incubation medium (35% below the minus-BAPTA condition and 14% above the control) (see Fig. 7). These are important findings as they confirm previous results described for the same experimental paradigm under *in vivo* conditions (Jacquard *et al.*, 2006). These authors demonstrated that the potentiation of the NMDAr-mediated excitotoxicity by

mitochondrial defects involves the dysregulation of intracellular calcium in the absence of NMDAr hypersensitivity.

From our results, another question emerges: how does QUIN exert an additive effect on 3-NP actions in a medium with reduced calcium? It is assumed that QUIN, as an excitotoxin typically acting on NMDAr, requires extracellular Ca²⁺ to exert its damage. Although we do not have an accurate explanation for this effect, we hypothesize that QUIN might be acting through an enhanced permeability to sodium via the channel-receptor NMDA complex and recruited non-NMDAr in the absence of calcium, and this may

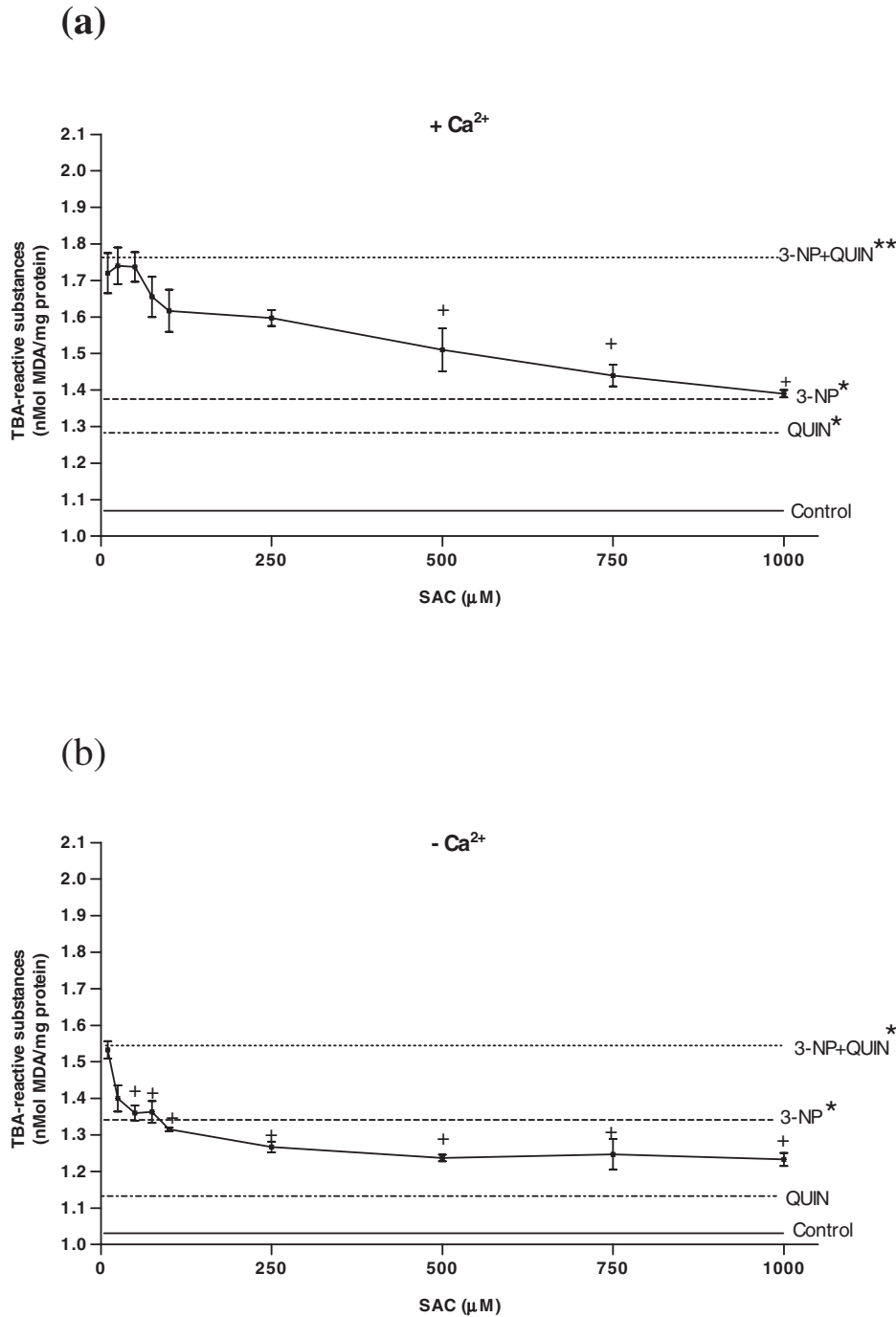


FIG. 6. Concentration–response effect of S-allylcysteine (SAC, 10–1000 μM) on the synergic actions of 3-NP + QUIN to induce LP in brain synaptosomal membranes. In (a) synaptosomal membranes were incubated in a medium containing physiological concentrations of calcium. In (b) synaptosomal fractions were incubated in a medium deprived of calcium. In both panels, mean \pm SEM of six experiments per group are shown. * $P < 0.01$ and ** $P < 0.001$, significantly different from control; + $P < 0.01$, significantly different from 3-NP + QUIN.

account for its toxic pattern as it has been shown that increased sodium concentrations can release calcium from isolated mitochondria from heart muscle cells (Carafoli *et al.*, 1974). On the assumption that increased levels of sodium can be achieved during the stimulation of different excitable cells, it is likely that this monovalent ion could be playing a role as a physiological ‘releaser’ of calcium from inner pools (Lowe *et al.*, 1976), and this could be occurring in nerve cells. Further alternatives might include transport of QUIN into the synaptosomes by specific transporters, similar to

those that have been found for some neuroactive tryptophan metabolites through murine renal organic anion transporters (Bahn *et al.*, 2005), although this has not been demonstrated yet.

The synergistic effect of 3-NP + QUIN on LP involves a dysregulation of cytoplasmic calcium

Defects in mitochondrial function have been implicated as a factor contributing to neuronal dysfunction in several neurodegenerative

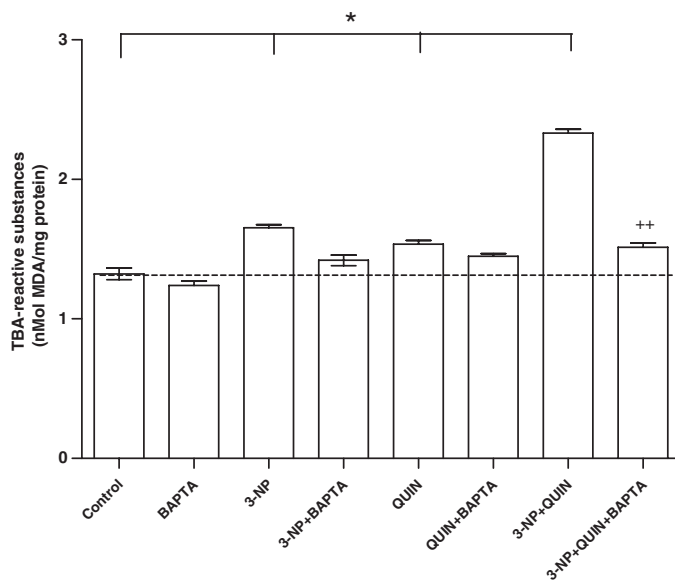


FIG. 7. Effect of BAPTA-AM on the synergistic actions of 3-NP + QUIN to induce LP in brain synaptosomal membranes. Synaptosomal fractions were pre-incubated in a medium containing BAPTA-AM (10 μ M) for 30 min at 37 $^{\circ}$ C, and re-incubated in the presence of 3-NP + QUIN for a further 60 min. Mean \pm SEM of six experiments per group are shown. * P < 0.01, significantly different from control; ** P < 0.01, significantly different from 3-NP + QUIN.

disorders (Albin & Greenamyre, 1992; Beal, 1992, 1995). The 'mitochondrial hypothesis', for the energy metabolism deficit, proposes that a deficient neuronal energy metabolism makes neuronal cells more vulnerable to be damaged by either physiological or elevated concentrations of endogenous excitatory amino acids (Glu) and the subsequent activation of NMDAr (Albin & Greenamyre, 1992; Beal, 1992, 1995). In the present report, we found an evident synergistic action of 3-NP and QUIN that produces oxidative damage to synaptosomal membranes, thus suggesting that an imbalance in oxidative phosphorylation might be enhanced by the concerted NMDAr overactivation-mediated excitotoxicity, and vice versa. This is also supported by studies demonstrating that the co-administration of a subtoxic concentration of malonate (a reversible mitochondrial inhibitor) increases the brain lesions produced by excitatory molecules such as L-Glu, NMDA and alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate (AMPA), thereby indicating that malonate increases the neuronal vulnerability toward excitotoxicity (Greene & Greenamyre, 1995). More recently, Bazzet *et al.* (1996) demonstrated a synergistic effect of QUIN and malonate on the neuronal lesions produced by the combination of these toxins, and this effect was blocked by the NMDAr antagonist MK-801, thus leading to the assumption that influx of extracellular calcium represents an important triggering factor for neuronal damage. In this regard, we show here that the early oxidative damage caused by the condition 3-NP + QUIN is associated with calcium dysregulation, and that such alteration is mainly occurring at a cytoplasmic level. This is contrary to previous observations of Bazzet and co-workers, as MK-801 was unable to prevent the oxidative damage produced by the conjugated action of these toxins in a 'limited calcium' medium, thus suggesting that LP in our *in vitro* model using synaptosomal fractions is more dependent on cytoplasmic calcium. In addition, it is known that both toxins are able to increase the levels of intracellular calcium, also producing mitochondrial dysfunction, ROS formation and further activation of

proteases (Santamaría & Ríos, 1993; Zeevalk *et al.*, 1995; Brouillet *et al.*, 1999; Sas *et al.*, 2007). Despite the fact that the origin of such elevated intracellular calcium in both models may be different, even the excitotoxic models imply an altered homeostasis of calcium from inner sources (Brouillet *et al.*, 1999; Ribeiro *et al.*, 2006) by means of an alteration of intracellular compartments, including the mitochondria. In further support of these considerations, by means of the protective effect of BAPTA-AM (the intracellular calcium chelator), we have demonstrated and confirmed that the oxidative damage produced in our paradigm is more dependent on the availability of cytoplasmic calcium, although this would need to be confirmed under *in vivo* conditions in further studies. Moreover, our data suggest that, as mitochondria – together with endoplasmic reticulum – are the major calcium-buffering compartment in the cell, if a toxic event accounts for mitochondrial dysfunction, then calcium buffering is compromised, thus leading to early cytoplasmic calcium accumulation and further ROS/RNS formation, activation of proteases, phospholipases and endonucleases, and eventually neuronal death (Ganitkevich, 2003; Muranon *et al.*, 2004). Our observations are supported by the recent work of Jacquard *et al.* (2006) who demonstrated that, under *in vivo* conditions, activation of calpains results in a decreased capacity of neurons to 'fight back' against increased cytosolic calcium concentrations from an intracellular origin, when the concerted actions of 3-NP and QUIN are tested. Furthermore, it is necessary to consider that QUIN is not only an excitotoxic but also seems to be a pro-oxidant agent (Santamaría & Ríos, 1993; Goda *et al.*, 1996; Santamaría *et al.*, 2001), as well as a mitochondrial uncoupling factor (Ribeiro *et al.*, 2006), two features that, in turn, may account for the general toxic pattern exerted by the conjugated actions of these two agents.

Role of ROS/RNS on the oxidative damage evoked by the condition 3-NP + QUIN

Hamilton & Gould (1987) suggested that the excitotoxicity mediated by glutamate plays an active role during the 3-NP-induced striatal degeneration. Since then, the toxic mechanisms of 3-NP have been associated with excitotoxicity. Several further studies in primary neuronal cultures have shown that, under specific conditions, blocking the energy metabolism may secondarily lead to an enhanced excitotoxic pattern of cell death, and that this process involves NMDAr activation. In this regard, it has been shown that the intrastriatal infusion of mitochondrial toxins – such as MPP⁺, malonate or rotenone – results in excitotoxic lesions similar to those of NMDAr agonists (NMDA and QUIN), and that this effect can be blocked by the administration of NMDAr antagonists, such as MK-801 (Greene & Greenamyre, 1996; Brouillet *et al.*, 1999). These findings, together with evidence indicating a deficient energy metabolism in the brains of patients with different neurodegenerative disorders, suggest that an aberrant energy metabolism in nerve tissue is responsible for indirect excitotoxic cascades (Albin & Greenamyre, 1992; Beal, 1992).

By contrast, QUIN, a toxic metabolite within the kynurenine pathway, has been linked to different neurodegenerative disorders, such as Huntington's disease, Alzheimer's disease and AIDS-dementia complex (Sardar & Reynolds, 1995; Heyes *et al.*, 1996; Walsh *et al.*, 2002; Guidetti *et al.*, 2004; Guillemain *et al.*, 2005). This metabolite, besides activating NMDAr, is also able to act as a pro-oxidant agent, and this property is only partially dependent upon NMDAr activation (Goda *et al.*, 1996; Stipek *et al.*, 1997;

Santamaría *et al.*, 2001). QUIN is known to produce enhanced generation of hydroxyl radical and ONOO⁻ (Nakamura *et al.*, 1995; Noack *et al.*, 1998; Santamaría *et al.*, 2001; Ryu *et al.*, 2004; Pérez-De La Cruz *et al.*, 2005). Of note, energy depletion induced by QUIN has also been demonstrated in both *in vitro* and *in vivo* models (Ribeiro *et al.*, 2006; Schuck *et al.*, 2007), and this effect might be actively contributing to its toxic pattern through a mechanism involving NMDAR stimulation. In contrast, 3-NP, the mitochondrial mycotoxin, exerts a primary toxic mechanism through the inhibition of SDH, an enzyme located at the inner mitochondrial membrane that is responsible for the oxidation of succinate to fumarate, thereby leading to a reduction of ATP synthesis and further neuronal cell death (Coles *et al.*, 1979; Túnez *et al.*, 2004). 3-NP also modifies calcium homeostasis *in vitro* and leads to excitotoxicity, ROS formation and cell death (Lafon-Cazal *et al.*, 1993; Alexi *et al.*, 1998; La Fontaine *et al.*, 2000). Both agents produce oxidative stress as an integral part of their toxic actions, so early oxidative damage is likely to be a major factor for triggering neuronal death by these toxins. In addition, free radical formation and depletion of antioxidant systems induced by QUIN in brain preparations containing synaptosomes (Leipnitz *et al.*, 2005) might be related to a possible synergistic effect of QUIN, ROS, ONOO⁻ and mitochondrial dysfunction.

Jacquard *et al.* (2006) have recently demonstrated that the exposure of nerve tissue to 3-NP + QUIN produces a synergistic effect on different markers of cell damage, involving calpain activation. The partial decay of membrane potential and mitochondrial activity also suggest an altered oxidative phosphorylation (García & Massieu, 2003; Nasr *et al.*, 2003), and these events are currently associated with alterations of calcium homeostasis and excessive ROS/RNS formation. Therefore, our results strongly suggest an active role of ONOO⁻ as a mediator of oxidative damage as FeTPPS, a selective ONOO⁻ decomposition catalyst, significantly decreased LP induced by 3-NP + QUIN. ONOO⁻ formation is the resultant high-affinity reaction between nitric oxide and superoxide, two reactive species that can be supplied by the activity of nitric oxide synthase and mitochondrial respiration, which in turn can be stimulated by calcium. In confirmatory terms, SAC, a broad-spectrum antioxidant, also attenuated the LP induced in this model, thus suggesting that the oxidative damage observed here was the result of different pro-oxidant events and reactive species, possibly agents such as ONOO⁻, superoxide or hydroxyl radicals.

Conversely, ALCAR also decreased the peroxidative action of both toxins, in a more effective manner, and even under conditions of deprived intracellular calcium, thus suggesting that this molecule, a well-known free radical scavenger and metabolic precursor, exerted its action at different levels: both preventing mitochondrial damage and decreasing the excessive generation of free radicals from dysfunctional mitochondria.

Final remarks

In summary, the partial inhibition of SDH by subtoxic 3-NP, and moderate excitotoxicity and oxidative damage by subtoxic QUIN are potentiated when both agents act in a concerted manner, and this effect is significantly dependent on cytoplasmic calcium, involves ONOO⁻ as a predominant ROS/RNS species, and can be prevented by antioxidant/metabolic precursors, or attenuated by broad-spectrum antioxidants. The relevance of these findings is highlighted by the fact that, under conditions of conjugated energy metabolism, excitotoxicity and oxidative stress, nerve tissue is a target for calcium-mediated

degenerative events that can be prevented by the use of selective protective agents.

Acknowledgements

Verónica Pérez-De La Cruz and Nieves Herrera-Mundo are scholarship holders from CONACyT (200241, 218229). This work was supported by CONACyT Grants 48370-Q (A.S.) and 48812 (J.P.). We gratefully acknowledge M.V.Z. Rocío González-Vieira, from the Metropolitan University, for animal supply.

Abbreviations

ALCAR, acetyl L-carnitine; BAPTA-AM, 1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid-acetoxymethyl ester; FeTPPS, 5,10,15,20-tetrakis-[4-sulfonatophenyl]-porphyrinato-iron[III]; LP, lipid peroxidation; MDA, malonyl dialdehyde; MTT, 3-[4, 5-dimethyl-thiazol]-2, 5-dephenyl tetrazolium bromide; NMDAR, N-methyl-D-aspartate receptor; 3-NP, 3-nitropropionic acid; ONOO⁻, peroxyntirite; QUIN, quinolinic acid; ROS, reactive oxygen species; RNS, reactive nitrogen species; SAC, S-allylcysteine; SDH, succinate dehydrogenase; TBA, thiobarbituric acid; TBA-RS, thiobarbituric acid reactive substances.

References

- Abdel-Hamid, K.M. & Tymianski, M. (1997) Mechanisms and effects of intracellular calcium buffering on neuronal survival in organotypic hippocampal cultures exposed to anoxia/aglycemia or to excitotoxins. *J. Neurosci.*, **17**, 3538–3553.
- Albin, R.L. & Greenamyre, J.T. (1992) Alternative excitotoxic hypotheses. *Neurology*, **42**, 733–738.
- Alexi, T., Hughes, P.E., Faull, R.L. & Williams, C.E. (1998) 3-Nitropropionic acid's lethal triplet: cooperative pathways of neurodegeneration. *Neuroreport*, **9**, 57–64.
- Bahn, A., Ljubojevic, M., Lorenz, H., Schultz, C., Ghebremedhin, E., Ugele, B., Sabolic, I., Burckhardt, G. & Hagos, Y. (2005) Murine renal organic anion transporters mOAT1 and mOAT3 facilitate the transport of neuroactive tryptophan metabolites. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, **289**, C1075–C1084.
- Bazzett, T.J., Falik, R.C., Becker, J.B. & Albin, R.L. (1996) Synergistic effects of chronic exposure to subthreshold concentrations of quinolinic acid and malonate in the rat striatum. *Brain Res.*, **718**, 228–232.
- Beal, M.F. (1992) Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illnesses? *Ann. Neurol.*, **31**, 19–30.
- Beal, M.F. (1995) Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann. Neurol.*, **38**, 357–366.
- Beal, M.F., Hyman, B.T. & Koroshetz, W. (1993) Do defects in mitochondrial energy metabolism underlie the pathology of neurodegenerative diseases? *Trends Neurosci.*, **16**, 125–131.
- Beal, M.F., Kowall, N.W., Ellison, D.W., Mazurek, M.F., Swartz, K.J. & Martin, J.B. (1986) Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. *Nature*, **321**, 68–71.
- Behan, W.M., McDonald, M., Darlington, L.G. & Stone, T.W. (1999) Oxidative stress as a mechanism for quinolinic acid-induced hippocampal damage: protection by melatonin and deprenyl. *Br. J. Pharmacol.*, **128**, 1754–1760.
- Behrens, M.I., Koh, J., Canzoniero, L.M., Sensi, S.L., Csernansky, C.A. & Choi, D.W. (1995) 3-Nitropropionic acid induces apoptosis in cultured striatal and cortical neurons. *Neuroreport*, **6**, 545–548.
- Bordelon, Y.M., Chesselet, M.F., Nelson, D., Welsh, F. & Erecińska, M. (1997) Energetic dysfunction in quinolinic acid-lesioned rat striatum. *J. Neurochem.*, **69**, 1629–1639.
- Brouillet, E., Conde, F., Beal, M.F. & Hantraye, P. (1999) Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals. *Prog. Neurobiol.*, **59**, 427–468.
- Carafoli, E., Tiozzo, R., Lugli, G., Crovetto, F. & Kratzing, C. (1974) The release of calcium from heart mitochondria by sodium. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **6**, 361–371.
- Coles, C.J., Edmondson, D.E. & Singer, T.P. (1979) Inactivation of succinate dehydrogenase by 3-nitropropionate. *J. Biol. Chem.*, **254**, 5161–5167.
- Dodd, P.R., Hardy, J.A., Oakley, A.E., Edwarson, J.A., Perry, E.K. & Delaunoy, J.P. (1981) A rapid method for preparing synaptosomes: comparison, with alternative procedures. *Brain Res.*, **226**, 107–118.

- Ganitkevich, V.Y. (2003) The role of mitochondria in cytoplasmic Ca^{2+} cycling. *Exp. Physiol.*, **88**, 91–97.
- García, A. & Massieu, L. (2003) Glutamate uptake inhibitor 1-trans-pyrrolidine 2,4-dicarboxylate becomes neurotoxic in the presence of subthreshold concentrations of mitochondrial toxin 3-nitropropionate: involvement of mitochondrial reducing activity and ATP production. *J. Neurosci. Res.*, **74**, 956–966.
- Goda, K., Kishimoto, H., Shimizu, S., Hamane, Y. & Ueda, M. (1996) Quinolinic acid and active oxygens. Possible contribution of active oxygens during cell death in the brain. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **398**, 247–254.
- Greene, J.G. & Greenamyre, J.T. (1995) Exacerbation of NMDA, AMPA, and L-glutamate excitotoxicity by the succinate dehydrogenase inhibitor malonate. *J. Neurochem.*, **64**, 2332–2338.
- Greene, J.G. & Greenamyre, J.T. (1996) Manipulation of membrane potential modulates malonate-induced striatal excitotoxicity in vivo. *J. Neurochem.*, **66**, 637–643.
- Guidetti, P., Luthi-Carter, R.E., Augood, S.J. & Schwarcz, R. (2004) Neostriatal and cortical quinolinic levels are increased in early grade Huntington's disease. *Neurobiol. Dis.*, **17**, 455–461.
- Guillemin, G.J., Brew, B.J., Noonan, C.E., Takikawa, O. & Cullen, K.M. (2005) Indoleamine 2,3 dioxygenase and quinolinic acid immunoreactivity in Alzheimer's disease hippocampus. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, **31**, 395–404.
- Hamilton, B.F. & Gould, D.H. (1987) Nature and distribution of brain lesions in rats intoxicated with 3-nitropropionic acid: a type of hypoxic (energy deficient) brain damage. *Acta Neuropathol.*, **72**, 286–297.
- Heyes, M.P., Achim, C.L., Wiley, C.A., Major, E.O., Saito, K. & Markey, S.P. (1996) Human microglia convert L-tryptophan into the neurotoxin quinolinic acid. *Biochem. J.*, **320**, 595–597.
- Jacquard, C., Trioulier, Y., Cosker, F., Escartin, C., Bizat, N., Hantraye, P., Cancela, J.M., Bonvento, G. & Brouillet, E. (2006) Brain mitochondrial defects amplify intracellular $[\text{Ca}^{2+}]$ rise and neurodegeneration but not Ca^{2+} entry during NMDA receptor activation. *FASEB J.*, **20**, 1021–1023.
- La Fontaine, M.A., Geddes, J.W., Banks, A. & Butterfield, D.A. (2000) 3-Nitropropionic acid induced in vivo protein oxidation in striatal and cortical synaptosomes: insights into Huntington's disease. *Brain Res.*, **858**, 356–362.
- Lafon-Cazal, M., Pietri, S., Culcasi, M. & Bockaert, J. (1993) NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity. *Nature*, **364**, 535–537.
- Leipnitz, G., Schumacher, C., Scussiato, K., Dalcin, K.B., Wannmacher, C.M., Wyse, A.T., Dutra-Filho, C.S., Wajner, M. & Latini, A. (2005) Quinolinic acid reduces the antioxidant defenses in cerebral cortex of young rats. *Int. J. Dev. Neurosci.*, **23**, 695–701.
- Lowe, D.A., Richardson, N.P., Taylor, P. & Donatsch, P. (1976) Increasing intracellular sodium triggers calcium release from bound pools. *Nature*, **260**, 337–338.
- Martin, R.L., Lloyd, H.E. & Cowan, A.I. (1994) The early events of oxygen and glucose deprivation: Setting the scene for neuronal death? *Trends Neurosci.*, **17**, 251–257.
- Massieu, L., Morales-Villagrán, A. & Tapia, R. (1995) Accumulation of extracellular glutamate by inhibition of its uptake is not sufficient for inducing neuronal damage: an in vivo microdialysis study. *J. Neurochem.*, **64**, 2262–2272.
- Muralikrishna Adibhatla, R. & Hatcher, J.F. (2006) Phospholipase A2, reactive oxygen species, and lipid peroxidation in cerebral ischemia. *Free Radic. Biol. Med.*, **40**, 376–387.
- Muranon, L., Antoniotti, S. & Lovisolo, D. (2004) Intracellular calcium signals and control of cell proliferation: how many mechanisms? *J. Cell. Mol. Med.*, **8**, 161–168.
- Nakamura, T.A., Yamada, K., Hasegawa, T. & Nabeshima, T. (1995) Possible involvement of nitric oxide in quinolinic acid-induced convulsion in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **51**, 309–312.
- Nasr, P., Gursahani, H.I., Pang, Z., Bondada, V., Lee, J., Hadley, R.W. & Geddes, J.W. (2003) Influence of cytosolic and mitochondrial Ca^{2+} , ATP, mitochondrial membrane potential, and calpain activity on the mechanism of neuron death induced by 3-nitropropionic acid. *Neurochem. Int.*, **43**, 89–99.
- Niesen, C., Charlton, M.P. & Carlen, P.L. (1991) Postsynaptic and presynaptic effects of the calcium chelator BAPTA on synaptic transmission in rat hippocampal dentate granule neurons. *Brain Res.*, **555**, 319–325.
- Noack, H., Lindenau, J., Rothe, F., Asayama, K. & Wolf, G. (1998) Differential expression of superoxide dismutase isoforms in neural and glial compartments in the course of excitotoxically mediated degeneration: relation to oxidative and nitric stress. *Glia*, **23**, 285–297.
- Novelli, A., Reilly, J.A., Lysko, P.G. & Henneberry, R.C. (1988) Glutamate becomes neurotoxic via the N-methyl-D-aspartate receptor when intracellular energy levels are reduced. *Brain Res.*, **451**, 205–212.
- Pang, Z. & Geddes, J.W. (1997) Mechanisms of cell death induced by mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid: acute excitotoxic necrosis and delayed apoptosis. *J. Neurosci.*, **17**, 3064–3073.
- Pérez-De La Cruz, V., Gonzalez-Cortes, C., Galvan-Arzate, S., Medina-Campos, O.N., Pérez-Severiano, F., Ali, S.F., Pedraza-Chaverri, J. & Santamaría, A. (2005) Excitotoxic brain damage involves early peroxynitrite formation in a model of Huntington's disease in rats: protective role of iron porphyrinate 5,10,15,20-tetrakis (4-sulfonatophenyl) porphyrinate iron (III). *Neuroscience*, **135**, 463–474.
- Pérez-De La Cruz, V., Gonzalez-Cortes, C., Pedraza-Chaverri, J., Maldonado, P.D., Andres-Martinez, L. & Santamaría, A. (2006) Protective effect of S-allylcysteine on 3-nitropropionic acid-induced lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction in rat brain synaptosomes. *Brain Res. Bull.*, **68**, 379–383.
- Rami, A., Feger, D. & Krieglstein, J. (1997) Blockade of calpain proteolytic activity rescues neurons from glutamate excitotoxicity. *Neurosci. Res.*, **27**, 93–97.
- Ribeiro, C.A., Grando, V., Dutra Filho, C.S., Wannmacher, C.M. & Wajner, M. (2006) Evidence that quinolinic acid severely impairs energy metabolism through activation of NMDA receptors in striatum from developing rats. *J. Neurochem.*, **99**, 1531–1542.
- Ryu, J.K., Kim, S.U. & McLarnon, J.G. (2004) Blockade of quinolinic acid-induced neurotoxicity by pyruvate is associated with inhibition of glial activation in a model of Huntington's disease. *Exp. Neurol.*, **187**, 150–159.
- Santamaría, D., Espinoza-Gonzalez, V., Rios, C. & Santamaría, A. (1999) Nomega-nitro-L-arginine, a nitric oxide synthase inhibitor, antagonizes quinolinic acid-induced neurotoxicity and oxidative stress in rat striatal slices. *Neurochem. Res.*, **24**, 843–848.
- Santamaría, A., Jimenez-Capdeville, M.E., Camacho, A., Rodríguez, E., Flores, A. & Galvan-Arzate, S. (2001) In vivo hydroxyl radical formation after quinolinic acid infusion into rat corpus striatum. *Neuroreport*, **12**, 2693–2696.
- Santamaría, A. & Rios, C. (1993) MK-801, an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, blocks quinolinic acid-induced lipid peroxidation in rat corpus striatum. *Neurosci. Lett.*, **159**, 51–54.
- Santamaría, A., Salvatierra-Sanchez, R., Vazquez-Roman, B., Santiago-Lopez, D., Villeda-Hernandez, J., Galvan-Arzate, S., Jimenez-Capdeville, M.E. & Ali, S.F. (2003) Protective effects of the antioxidant selenium on quinolinic acid-induced neurotoxicity in rats: in vitro and in vivo studies. *J. Neurochem.*, **86**, 479–488.
- Sardar, A.M. & Reynolds, G.P. (1995) Frontal cortex indoleamine 2,3-dioxygenase activity is increased in HIV-1 associated dementia. *Neurosci. Lett.*, **187**, 9–12.
- Sardar, A.M., Bell, J.E. & Reynolds, G.P. (1995) Increased concentrations of the neurotoxin 3-hydroxykynurenine in the frontal cortex of HIV-1-positive patients. *J. Neurochem.*, **64**, 932–935.
- Sas, K., Robotka, H., Toldi, J. & Vecsei, L. (2007) Mitochondria, metabolic disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders. *J. Neurol. Sci.*, **257**, 221–239.
- Schuck, P.F., Tonin, A., Da Costa Ferreira, G., Rosa, R.B., Latini, A., Balestro, F., Perry, M.L., Wannmacher, C.M., De Souza Wyse, A.T. & Wajner, M. (2007) In vitro effect of quinolinic acid on energy metabolism in brain of young rats. *Neurosci. Res.*, **57**, 277–288.
- Schwarcz, R. (1983) Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain. *Science*, **219**, 316–318.
- Stipek, S., Stastny, F., Platenik, J., Crkovská, J. & Zima, T. (1997) The effect of quinolinic acid on rat brain lipid peroxidation is dependent on iron. *Neurochem. Int.*, **30**, 233–237.
- Stone, T.W. (1993) Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids. *Pharmacol. Rev.*, **45**, 309–379.
- Túnez, I., Montilla, P., Muñoz, M.C., Feijoo, M. & Salcedo, M. (2004) Protective effect of melatonin on 3-nitropropionic acid-induced oxidative stress in synaptosomes in an animal model of Huntington's disease. *J. Pineal Res.*, **37**, 252–256.
- Walsh, D.M., Klyubin, I., Fadeeva, J.V., Cullen, W.K., Anwyl, R., Wolfe, M.S., Rowan, M.J. & Selkoe, D.J. (2002) Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature*, **416**, 535–539.
- Zeevalk, G.D., Derr-Yellin, E. & Nicklas, W.J. (1995) Relative vulnerability of dopamine and GABA neurons in mesencephalic culture to inhibition of succinate dehydrogenase by malonate and 3-nitropropionic acid and protection by NMDA receptor blockade. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **275**, 1124–1130.

Kynurenine Pathway and Disease: An Overview

Verónica Pérez-De La Cruz^{*,§,1}, Mina Königsberg² and Abel Santamaría^{*,1}

¹Laboratorio de Aminoácidos Excitadores, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, S.S.A., Mexico

²Departamento Ciencias de la Salud, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Mexico

Abstract: Kynurenine pathway is gaining more and more attention every day in biomedical research since this catabolic route for tryptophan decomposition is not only implicated in different neurological disorders, but also possesses neuroactive metabolites with different biological properties, such as pro-oxidant and antioxidant regulators. Thus, the intensive research on this metabolic pathway is helping us to understand those mechanisms underlying neurodegenerative events during the occurrence of pathological process in the central nervous system (CNS), thereby allowing the design of potential therapies for those disorders involving excitotoxic, oxidative and inflammatory components. Here we intend to provide a brief overview on the relevance of this route for several CNS disorders, and discuss recent information on the different biological properties of the neuroactive metabolites of this pathway and their significance for further research.

Keywords: Kynurenines, thryptophan metabolism, central nervous system, neurotoxicity, disease.

THE KYNURENINE PATHWAY

Described since 1947, kynurenine pathway (KP) is the major catabolic route of L-tryptophan in mammals. KP is responsible for the biosynthesis of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) [1] (Fig. 1), and has been reported to be present in non-human primates, rodents and other mammals in liver and brain [2-4]. A considerable number of important physiological functions have been assumed to be associated to KP, such as behavior, thermoregulation, etc. [5-8].

Metabolism

In liver, the indolic ring of L-tryptophan is oxidatively excised by the enzyme tryptophan dioxygenase (TDO) to produce N-formyl kynurenine. In the brain and other peripheral tissues, the enzyme responsible for this reaction is indolamine-2,3-dioxygenase (IDO), which is dependent of superoxide ($O_2^{\bullet-}$). Therefore IDO requires enzymatic systems that generate oxidative species, such as ascorbate and xanthine-xanthine oxidase, IDO can be inhibited by superoxide dismutase (SOD) [9] and nitric oxide (NO) [10], and it has also been suggested that IDO might act as an antioxidant system, since it uses $O_2^{\bullet-}$ to reduce its ferric (inactive) form to ferrous (active) form *in vitro* [11]. The ferrous form of IDO is rapidly auto-oxidized to the ferric form in the absence of reducing agents [12]. Both dihydroflavin mononucleotide and tetrahydropteridine have been proposed to act as endogenous cofactors for IDO reduction [13-15].

The next step in KP is the degradation of N-formyl kynurenine to L-kynurenine (L-KYN) by formamidase. L-KYN serves as substrate for different enzymes: kynurenase

(forming anthranilic acid), kynurenine 3-hydroxylase (forming 3-hydroxykynurenine), and kynurenine aminotransferases (KATs) which are responsible for the irreversible transamination of L-KYN to kynurenic acid (KYNA). KYNA formation in human is a very complex process and involves two KATs isoforms, KAT I and KAT II. These enzymes are different from each other in their optimal pH, where KAT II, which has been shown to act at a physiological pH range, may be responsible for most of the KYNA synthesis in the human brain [16].

Thereafter, KP leads to quinolinic acid (QUIN) formation through a series of steps which include the hydroxylation of L-KYN to 3-hydroxykynurenine (3-HK). This reaction is catalized by kynurenine hydroxylase, an enzyme located in the external mitochondrial membrane [17], and requires a molecule of NADPH as an electron donor. Then kynurenase, a phosphate-dependent piridoxal enzyme located in the cytosolic domain, converts 3-HK into 3-hydroxyanthranilic acid (3-HA). Both kynurenase and kynurenine hydroxylase are present in the CNS, but they exhibit very low activity. Another alternative to form 3-HA is through the hydroxylation of anthranilic acid by microsomal hydroxylation enzymes.

3-hydroxyanthranilate dioxygenase (3-HAO) opens the ring of 3-HA to produce 2-amino-3-carboxymuconate semi-aldehyde, an unstable intermediate which is immediately transformed into QUIN. In the brain, 3-HAO shows a higher activity than other KP enzymes [18-20]. Immunohistochemical evidence has demonstrated that 3-HAO and KATs are both located in astrocytes surrounding glutamatergic synapses in the CNS [21,22]. Lastly, QUIN is metabolized into nicotinic acid dinucleotide (NAD) by quinolinate phosphoribosyl transferase (QPRT), an enzyme located also in astrocytes [5]. Interestingly, it has been shown that QPRT is not specifically located in astrocytes surrounding glutamatergic synapses. Moreover, immunohistochemical studies revealed that the relationship between 3-HAO and QPRT is differential along the brain, mainly prevailing in frontal neocortex, striatum and hippocampus [23,24].

*Address correspondence to these authors at the Laboratorio de Aminoácidos Excitadores, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, Insurgentes Sur 3877, México D.F. 14269, México; E-mail: absada@yahoo.com and veped@yahoo.com.mx

[§]Programa de Doctorado en Biología Experimental, U.A.M.

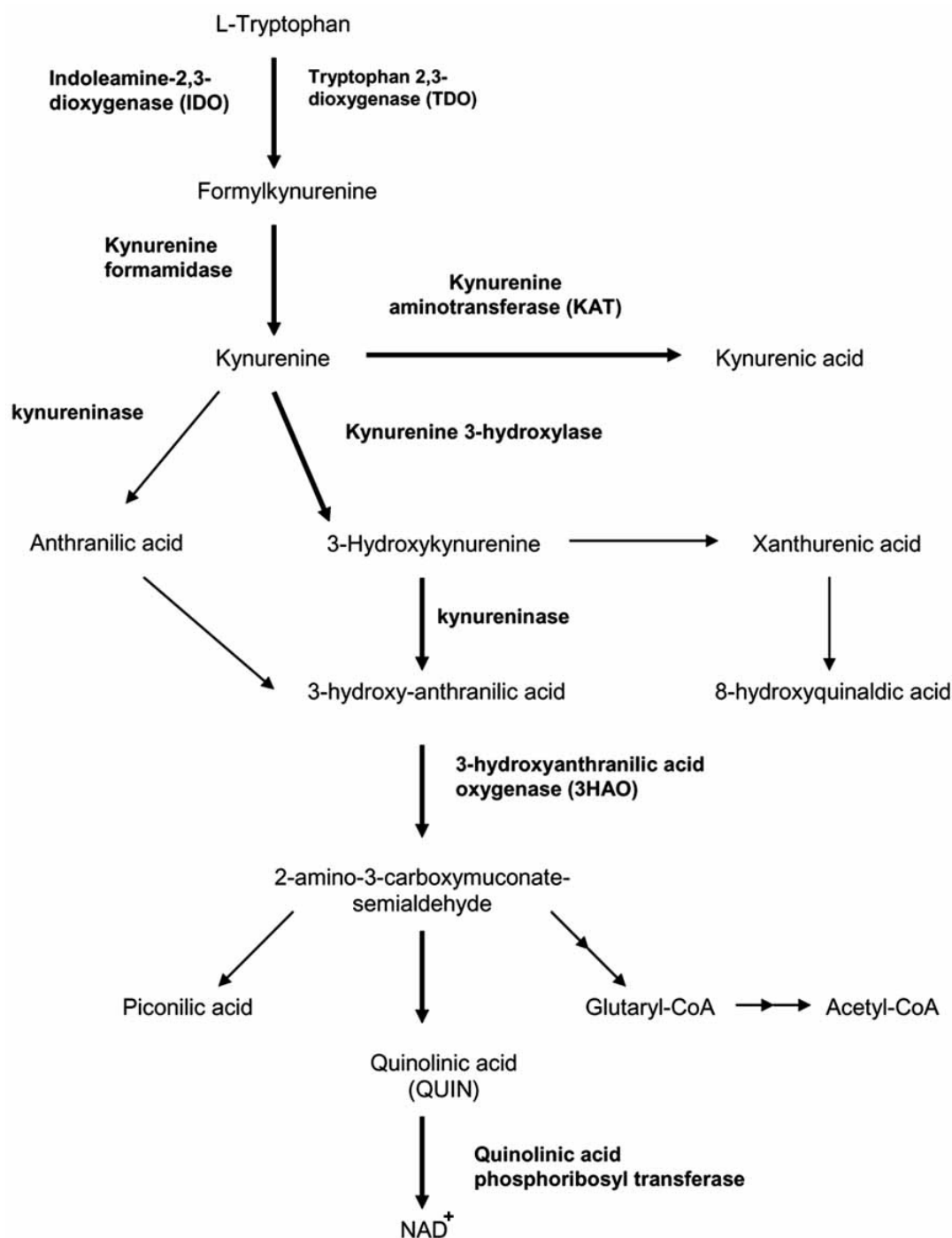


Fig. (1). Kynurenine pathway (KP) of tryptophan metabolism.

The interest in studying KP has increased recently, since alterations in this pathway have been implicated in several CNS disorders, including Huntington's disease (HD), Alzheimer dementia (AD), Parkinson's disease (PD), AIDS-dementia complex, etc. [11,25].

KYNURENINE PATHWAY METABOLITES THAT EXHIBIT ACTIVITY IN THE CNS

Several KP metabolites have been found to possess neuroactive properties [5]. This is particularly relevant since 95 % of tryptophan ingested from diet is metabolized through this pathway, and only a limited amount is converted into sero-

tonin [26]. The first indication that kynurenines might be playing an active role in the brain was provided by Lapin [27], who described convulsant activity in mice injected with QUIN. Such convulsions have more recently been associated with excitotoxic lesions in the brain [28]. Both the pattern of excitation and the neurotoxicity produced by QUIN have been largely related to N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAr) activation, thus suggesting that endogenous QUIN may participate in physiological and physiopathological events.

Another interesting neuroactive KP metabolite is 3-HK, a precursor of QUIN, which is present in the brain at nanomolar concentrations. 3-HK exhibits neurotoxic properties through

free radical formation [29], thereby inducing cell damage and death [30]. These events are responsible for a substantial potentiation of the excitotoxicity observed in neurons exposed to 3-HK and QUIN [31]. In addition both, 3-HK and its degradation product, 3-HA (the immediate bioprecursor of QUIN) generate $O_2^{\bullet-}$ and hydrogen peroxide (H_2O_2) in a copper-dependent manner. These processes stimulate protein oxidative damage [32]. Moreover, 3-HK and 3-HA have been demonstrated to cause cell death to neurons and monocyte/macrophage cell cultures by means of apoptotic mechanisms, thus resulting in typical fragmentation and condensation of DNA in cell bodies [30,33,34]. Cortical and striatal neurons have also been demonstrated to be particularly vulnerable to the toxic effects of 3-HK in a mechanism which is dependent on its uptake by the neutral amino acid transporter [35].

KYNA, another neuroactive KP metabolite, has been typically described as an inhibitory compound. KYNA exerts anticonvulsant and antiexcitotoxic actions [36]. Moreover, at physiological concentrations, KYNA selectively acts as an antagonist at the NMDAR by blocking the co-agonist site for glycine [37], as well as a non-competitive inhibitor of the $\alpha 7$ -nicotinic receptor for acetylcholine [38]. Of note, at high concentrations, KYNA exerts a less-selective wide spectrum of inhibitory effects through its antagonistic actions on different excitatory amino acid receptors [39]. The fact that KYNA may exhibit affinity for NMDAR and $\alpha 7$ -nicotinic receptors at the same range of concentrations at which it acts in human and rodent brains, suggest a physiological modulatory role for this metabolite in glutamatergic and cholinergic transmissions. This is based on some studies showing that a reduction of KYNA levels in the striatum of experimental animals increases their vulnerability to excitotoxic insults [40], while its increased levels have been related to the inhibition of glutamate release [41].

An interesting line of research is under current exploration by Schwarcz's group at the University of Maryland. These authors are investigating the involvement of endogenous KYNA to control NMDAR activity, and the modulatory action that the dopaminergic system exerts in these events through the use of both dopamine agonists and antagonists of dopamine receptors. This is particularly relevant since high levels of dopamine in the striatum seem to be linked to a transient reduction of KYNA levels, an event that may be contributing to excitotoxic damage mediated by kynurenine metabolites. In this regard, experimental evidence showing that endogenous KYNA controls the vulnerability of neurons to QUIN has been recently provided by the same group [42].

ENDOGENOUS KYNURENINES AND BRAIN DYSFUNCTION

As mentioned above, the proconvulsant and excitotoxic properties of QUIN and 3-HK, as well as the anticonvulsant and neuroprotective properties of KYNA in experimental models, suggest that endogenous kynurenines may be involved in human brain disorders caused by excitotoxic components [43]. The link between endogenous kynurenines and the event of excitotoxicity is supported by experimental studies demonstrating the neurotoxic effects produced by QUIN at nanomolar concentrations [44,45], the acute neurotoxicity evoked by 1 μM of 3-HK [30], and the anticonvulsant effi-

cacy of KYNA, also at nanomolar concentrations [46]. Given the activity of these molecules, it is conceivable that an alteration in KP may significantly affect brain function. Therefore, QUIN, 3-HK and KYNA, either together or separately, might be the primary cause of some CNS pathologies, or play facilitatory roles (Table 1). However, not all changes at KP in human disorders can be correlated with animal studies; for instance, it still remains unclear why KYNA brain levels are reduced during the final stages of HD [47], or even why the cortical KYNA (but not of 3-HK) levels are increased in schizophrenia [48]. In contrast, 3-HK levels are elevated in dementia associated-HIV infection [49,50], infantile spasms [51] and hepatic encephalopathy [49], whereas the HD brains show an enhanced 3-HAO activity. All these changes may be clinically relevant, thereby suggesting a possible role for KYNA in the physiopathology of psychiatric disorders [52]. Moreover, these findings support the idea that the function and destiny of kynurenines are controlled by still unknown mechanisms.

Energy Metabolism and Kynurenines

The inhibition of the respiratory chain complexes, the alteration of glucose utilization, the reduction of the oxygen consumption rate, and the inhibition of energy metabolism enzyme activities, have all been described in patients affected by neurodegenerative disorders [53-57]. Different KP metabolites affect several components of cellular energy metabolism. For instance, KYNA, 3-HK, 3-HA, anthranilic acid and QUIN all increase glucose re-uptake and inhibit CO_2 production. In addition, the activities of mitochondrial complexes I, II and IV are inhibited by 3-HK, while 3-HA selectively inhibits complexes I and II. Anthranilic acid is known to inhibit complexes I-III and QUIN inhibits complexes II, III and II-III [58,59]. Indeed, one of these recent studies emphasizes the capability of QUIN to increase the *in vitro* glucose re-uptake by 55 %, while the activity of complex II at the mitochondrial chain transport was inhibited by 35 % [60]. Moreover, the inhibition of complex II by QUIN was prevented by co-incubation of cortical homogenates with SOD and catalase, indicating that this effect is mediated by ROS formation. These findings provide evidence that QUIN might produce major alterations in brain energy metabolism, which in turn may contribute to its toxicity. In contrast, L-KYN and KYNA seem to have no effects on the respiratory chain complexes. Furthermore, the activity of Na^+/K^+ -ATPase activity was not modified by these kynurenines. However, the fact that KYNA increases the glucose re-uptake indicates that this metabolite affects the brain aerobic metabolism, thus suggesting that KYNA may not be generated only as a neuroprotective, neuromodulatory agent, but also as an agent which compromises mitochondrial bioenergetics. Altogether, these findings provide evidence that different KP intermediates might produce an energetic impairment in the brain. It is also conceivable that the synergistic actions of different kynurenines could be responsible for the brain damage and dysfunction observed in some neurodegenerative disorders exhibiting accumulation of these metabolites.

THE KYNURENINE PATHWAY AND NEUROLOGICAL DISORDERS

Huntington's Disease

Increased levels of 3-HK have been described in putamen, as well as in frontal and temporal cortex of patients

Table 1. Alterations in Kynurenine Pathway Neuroactive Metabolites in Different Human Pathologies (Based on Schwarcz and Pellicciari [52])

Metabolite	↑/↓	Mechanism	Events and Pathologies Involved
L-Kynurenine	↑	Neuroactive metabolites precursor	Atrophy of spinal muscles, Tourette syndrome, anxiety
3-Hydroxy- kynurenine	↑	Reactive Oxygen Species formation	Oxidative stress, Apoptosis, potentiation of excitotoxicity, neurodegenerative disorders (Huntington, Parkinson), Neuro-viral diseases, Neuro-inflammation, Traumatic damage, Stroke, Infantile spasms, and Hepatic encephalopathy.
3-Hydroxy- anthranilate		Free Radicals generation	Oxidative stress, Apoptosis
Quinolate	↑	NMDA receptor activation, free radical generation	Excitotoxicity, Mitochondrial dysfunction, Neurodegenerative disorders (Huntington, Alzheimer), Stroke, Brain Traumatic damage, Epilepsy, Brain malaria, Perinatal hypoxia, Cognitive decline, Neuro-viral diseases, and Neuro-inflammatory disorders such as AIDS-dementia complex
Kynurenic acid	↑ ↓	Blockade of NMDA and $\alpha 7$ - nicotinic receptors, free radical scavenger	Anticonvulsant, Cognitive alterations, Schizophrenia, Alzheimer, Amiotrophic lateral sclerosis Neurodegenerative disorders (Parkinson, Multiple sclerosis, Huntington), Neonatal asphyxia, Infantile spasms, Pain, Drug abuse, Anorexia

with HD, but not in the brains of AD patients [61,62]. As previously described, this compound is able to damage neurons by generating reactive oxygen species (ROS), such as H_2O_2 , which in turn may induce apoptosis as the result of oxidative stress [29,30,33,63,64]. These findings are consistent with the demonstration that the activity of 3-HAO, one of the enzymes responsible for its degradation, is increased in HD brains [65]. In addition, KYNA levels in the caudate nucleus are depleted in this disease, which is likely to be due to a decrease in the activities of both KAT I and KAT II in the striatal tissue of HD brains [66]. Such an apparent reduction in KYNA synthesis may be due to the absence of an activator cofactor for KAT [25]. Altogether, these findings suggest an important alteration of KP in HD, which seems to be more oriented towards an increase in 3-HK and QUIN levels [67], while decreasing KYNA content, thus enhancing the nerve tissue vulnerability to excitotoxic events. More recently, Guidetti and coworkers [68] have demonstrated that the levels of 3-HK and QUIN are increased up to 3-4-fold in neocortex and neostriatum of HD grade 1 patient brains, while the concentrations of these metabolites showed no changes or just slight trends to decrease in HD patients at advanced grades. This is, without any doubt, one of the most relevant findings on this field in recent years, because it provides evidence to support the hypothesis of a direct KP involvement in HD. This was proposed for the first time more than 20 years ago [28] and suggested that KP metabolites, such as QUIN and 3-HK, were the ones that participated in the neurodegenerative events in HD. Thus now, it seems more plausible to consider that the increased levels of these metabolites in the early HD might induce neuronal cell death through the concerted action of excitotoxicity (NMDAR overactivation) and oxidative stress (noxious generation of ROS and oxidative damage). This interesting line of research will provide new insights and clues for elucidating the degenerative mechanisms of HD in the next years.

There is a considerable amount of evidence showing that an abnormal expression of the huntingtin (htt) gene is responsible for the induction of HD in human, as well as some features of HD in rodent models [69-71], probably through a

complex pattern of events compromising normal synaptic function [72]. Interestingly, it has been suggested that the striatal administration of QUIN to rodent, might induce a significant increase in htt expression [73]. In this regard, different authors have suggested that primary toxicity induced by QUIN may be responsible for htt induction as a compensatory response [74,75]. In addition, it has been demonstrated that htt increases the expression of subunits NR1/NR2B of NMDAR, found in medium size striatal spiny neurons, which are more vulnerable to damage in HD. This effect might be the main reason for the increased neuronal sensitivity to the excitotoxic actions of NMDA and QUIN reported by different groups [76-78].

The levels of KP metabolites in the CNS may be influenced by peripheric levels of tryptophan and L-KYN, which penetrate the blood-brain barrier (BBB) through a neutral amino acid transporter [79-82]. This fact is significantly relevant for neurodegenerative disorders, especially those presenting inflammatory features due to macrophage infiltration, such as HD [83,84]. In this regard, two primary lines of ideas can be suggested for describing the role of tryptophan metabolites in HD: the first one is based on the ability of kynurenines to modulate the activity of NMDA-subtype of glutamate receptors, while the second is based on the specific capability of 3-HK and 3-HA to mediate the ROS generation and the consequent oxidative damage to nerve tissue. The crucial role of NMDAR in cell dysfunction and neuronal loss in HD has been suggested since the early descriptions of the relationship between excitotoxicity and neurodegenerative disorders [85], and also since the excitatory and neurotoxic processes of QUIN were discovered as a consequence of its actions as an agonist of glutamate receptors [28,86]. In HD post-mortem brains, Young and coworkers [87] detected a significant loss of NMDAR, consistent with a significant loss of receptor-carrying cells in response to excitotoxic processes mediated by glutamate or QUIN.

In 2006, Mackay and coworkers [88] described an increase in tryptophan conversion to L-KYN in patients with HD, demonstrating that KP activity is clearly enhanced. These findings suggested that TDO and/or IDO activities

may be increased, so it is likely that IDO might be contributing to tryptophan metabolism in HD patients, because TDO is more selective in regard of its substrates. Moreover, IDO is a better candidate than TDO since the first is present in several cell types (microglia, macrophages and other immuno-competent cells) and its increased activity is consistent with neopterin levels and oxidative damage products found in HD patients [89]. Furthermore, the L-KYN/tryptophan ratio in HD patients exposed or not to a tryptophan load is higher than controls, thus supporting the idea that IDO/TDO activities are higher in those patients. In this point, the stimulation of IDO activity by superoxide anion has served to propose that oxidative stress might play a crucial role in controlling KP, and once activated, other pro-oxidant metabolites (such as 3-HK and 3-HA) might be responsible for enhancing oxidative damage in HD brains.

HD patients have also shown a tendency to decrease the KYNA/L-KYN ratio, which could be related with a reduction in the activity of KAT. This was suggested by findings of Jauch and coworkers [66], who described a depleted KAT activity in the caudate nucleus of post-mortem HD brains. Of note, activity of this enzyme depends on the simultaneous concentration of alternative substrates and modulators, such as aspartate, α -amino adipate and oxoglutarate.

In summary, increased IDO/TDO and depleted KAT activity together force the KP to QUIN formation, accompanied in the process by other toxic metabolites. In this regard, it has been shown that HD patients can be partially stabilized with a low-tryptophan diet [90]. Thereby, this suggested that controlling the levels of toxic metabolites might constitute a strategy of therapeutic consideration. Altogether, all the evidence strongly suggests that HD patients present an anomalous tryptophan metabolism resulting in oxidative stress and brain dysfunction.

Alzheimer's Disease

AD is the most common and frequent dementia affecting several million people around the World. Recently, Guillemin and coworkers [91], using immunohistochemical techniques, demonstrated that KP is up-regulated in AD brains. These authors found that both IDO expression and QUIN levels were increased in the microglia, astrocytes and neurons from the hippocampus, thus suggesting that QUIN may be involved in the neurodegenerative pattern observed in AD. In further support to this hypothesis, there is evidence showing that the beta amyloid peptide oligomeric fraction ($A\beta_{1-42}$), which is considered to play an active role in the pathogenesis of AD [92], has been shown to activate microglia under *in vitro* conditions, where the same cells exhibited a higher IDO expression and elevated QUIN levels [93].

On the other hand, a clinical study performed in AD patients revealed a significant increase in the L-KYN/tryptophan ratio [94], which was associated with a reduction in the cognitive execution of these patients. In this regard, it has been demonstrated that KYNA levels, as well as KATI and KATII activities, could increase in AD brains as a compensatory response to an augmented formation of KP neurotoxic metabolites [95]. More recently, contrasting findings were presented by Hartai and coworkers [96], who demonstrated that KATI and KATII activities are not affected in plasma of AD patients, while KYNA synthesis can be decreased by the

progression of the disease. This has served to suggest that KYNA formation depends on energy metabolism, and therefore, a disrupted energy metabolism at AD early stages might be responsible of these changes. Nevertheless, further investigation on this field is necessary to clarify the role of KP in AD.

Parkinson's Disease

Increased levels of 3-HK have been found in the putamen and *substantia nigra* of patients with PD. The L-KYN/3-HK ratio is reduced in *substantia nigra* (24.9-10.3) and exhibit similar changes in frontal cortex and putamen (19.5-6.3) [97]. These changes imply an important KP tendency to synthesize more 3-HK from L-KYN than KYNA, a process which in turn, might be responsible for an enlarged susceptibility of neurons to oxidative damage. In addition, 3-HK levels are increased in the brains of PD patients without L-DOPA, as well as in some specific brain regions of patients following L-DOPA treatment. Since it is known that KP leads to NADH formation as a terminal product, 3-HK accumulation in these patients was assumed to be due to a defect in NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) [97]. Of course, this line of research remains under current investigation.

Cognitive Decline

The subchronic infusion (for 2 weeks) of QUIN into the cerebral ventricles produces a memory deficit in animals which is accompanied by a selective loss of neurons in the forebrain [98]. Such experimental finding is indicative of a cognitive deficit and it is believed to be associated to age. The levels of QUIN [3] and other kynurenines [99,100] have been found to amplify in direct relationship with age in cerebrospinal fluid and brain, thus suggesting that QUIN may be partially responsible for cognitive decline. As previously mentioned, the relevance of KYNA for brain functions is related to its ability to act as a glutamate antagonist, by blocking the glycine co-agonist site at the NMDAR. This is relevant because previous studies have shown that an increase in brain KYNA levels might contribute to cognitive decline, suggesting NMDAR as a promising target for the development of new therapeutic alternatives to improve cognition [101,102]. In the same context, increased L-KYN and KYNA concentrations, which are thought to be responsible for cognitive decay, have been found in the rat brain [99,100,103]. Altogether, these evidences strongly suggest an active role of KP in cognitive decline. In this regard, supporting findings demonstrate that KYNA- and 7-chloro-kynurenic acid-mediated blockade of NMDAR [104,105], both severely impair memory skills, although controversial evidence suggests that these metabolites can improve social and object recognition memory [106], which should be considered before a definitive conclusion on the role of kynurenines in cognitive deterioration could be drawn.

Cerebral Ischemia

It has been established that neuronal damage occurs after a period of cerebral ischemia; however, the specific neurochemical changes regarding the KP are quite different depending on the time after the ischemic lesion was produced. In a gerbil model of brain ischemia generated by a short-time vascular occlusion period (5-15 min) there were no major

changes in QUIN levels during the first 24 hours, but a delayed increase in QUIN levels (50-fold) was found after several days postlesion [107,108]. These changes were accompanied by a substantial increase in the activity of all KP metabolic enzymes (except for KATs), thus resulting in an increased QUIN/KYNA ratio, which in turn might contribute to neuronal damage. In support to these findings, it was demonstrated that KYNA and its analogues are able to diminish the ischemic damage in different models [109]. Consistently, in 1993 Lees [110] proposed that microglia and macrophages can contribute to the delayed neuronal death observed after an episode of cerebral ischemia, probably through QUIN secretion. This hypothesis that was reinforced later, by evidence obtained by Baratte and coworkers [111] in which QUIN produced a positive immunostaining response in microglia from gerbil brains at 4 and 7 days post-ischemia. Shortly thereafter, Walker and coworkers [112] showed that KYNA levels are increased in brains and CSF from sheep fetuses, but they decrease after birth. Noteworthy, these authors found that a restriction of blood flow from umbilical cord (between days 120-140 of gestation) produces a decrease in KYNA levels in hypothalamus and hippocampus. Such alterations are assumed to amplify the brain susceptibility to hypoxia/ischemia. Therefore, the risk of cerebral hypoxic damage can be reduced by the administration of inhibitors of kynurenase and kynurenine 3-hydroxylase, which are able to raise KYNA brain levels [25]. Whether QUIN and other KP metabolites are responsible for the degenerative events in the human ischemic brain is a question deserving further investigation.

Traumatic Injury

After severe traumatic damage to the human brain, there is a 50-fold increase in the levels of QUIN in the CSF of some patients [113], and these changes correlated with mortality. In addition, QUIN was found augmented in CSF of children suffering traumatic damage [114], and these findings also correlated with mortality. Therefore, it is likely that QUIN and KP might be involved in inflammatory and neurodegenerative changes after trauma in human. In this regard, Mackay and coworkers [88] have shown a significant increase in several inflammatory markers (neopterin, erythrocyte sedimentation and C reactive protein) in patients with cerebral damage. These markers were related with a KP metabolite enhancement, suggesting that KP activation is a consequence of inflammatory events. Therefore, the immune system activation can induce changes in KP metabolism both, in peripheral and central tissues, regardless of their origin. At this point, it is important to mention that, as mentioned before, KP metabolites in the CNS are substantially influenced by their peripheral levels since both, tryptophan and L-KYN are able to cross the BBB.

In the same report [88], changes in tryptophan content in the diet of patients with traumatic damage were tested. The study revealed two major differences between traumatic and control patients: traumatic patients converted more tryptophan into L-KYN than control group, and consistent with these changes, the L-KYN/tryptophan ratio was increased in traumatic patients. This observation suggested an enhance in IDO and TDO activities, whose expressions are commonly increased during inflammation. Regarding the KYNA/L-KYN ratio, which reflects the KATs activity, this was altered

by dietary and endocrine factors, since it was decreased in traumatic patients. However, when traumatic patients received a tryptophan load, this ratio was increased 5 hours post-treatment, suggesting that KATs could be more active during traumatic events, depending on tryptophan bioavailability. Consequently, it has been hypothesized that a tryptophan-enriched diet in traumatic patients might stimulate the formation of the neuroprotectant KYNA in order to reduce neuronal damage. Moreover, 3-HK and 3-HA levels diminished with respect to control group, while after 5 hours post-loading, there was an increase in lipid peroxidation in traumatic patients. Both metabolites are known to induce ROS formation and oxidative damage, hence it is likely that some other mechanisms, independent of KP metabolites and linked to direct oxidative stress, could be taking place under traumatic conditions. These may include mitochondrial disruption in immunocompetent cells and/or excessive activation of glutamate receptors in neurons. Meanwhile, the low levels of 3-HK and 3-HA could be taken as a compensatory/neuroprotective strategy to reduce oxidative damage in the brain of traumatic patients.

Epilepsy

The brain tissue of patients with epilepsy shows a significant reduction in QPRT [115], suggesting that the absence of this enzyme may result in a possible risk for augmented QUIN levels in cells or cell compartments from the epileptic core. It is also known that KYNA concentrations in brain tissue from epileptic patients are lower than those found in patients with infantile spasms, in which the motor alterations are thought to be due to a reduced antagonism against endogenous excitatory agents, such as glutamate [51].

HIV and AIDS-Dementia Complex

A large body of evidence suggests that KP is involved in the neurotoxicity associated to the AIDS-dementia complex and other neuroinflammatory diseases [116]. For instance, the activity of the enzyme IDO has been shown to be increased in *postmortem* brains of AIDS patients when compared with control patients or with non-demential AIDS patients [50]. Moreover, the enlarged activity of this enzyme is accompanied by enhanced QUIN and 3-HK levels. In 1996, Chao and coworkers [117] summarized evidence pointing out a possible involvement of QUIN in AIDS-dementia complex. In addition, the involvement of NMDAR in this disorder has been extensively accepted [118]. In patients suffering the AIDS-dementia complex, the QUIN levels in CSF are increased 20-fold when compared with basal levels. These changes correlate with motor and cognitive dysfunction [119-121]. It is also known that QUIN amount in patients infected with HIV may be increased up to 300-fold in CSF [122]. However, when these patients are treated with zidovudine, QUIN concentrations significantly drop, providing a neurologic improvement. Similar results have been reported in HIV infected children, whose QUIN levels are found augmented 4-fold in CSF (55.8 nM vs 14.9 nM in control patients) and return to basal levels after treatment with zidovudine [25]. The high levels of QUIN found in the brain of HIV patients probably originated from immune-activated cells, as part of a generalized inflammatory response triggered by the viral invasion. This suggestion is based on observations demonstrating that L-KYN and QUIN concentra-

tions from serum and CSF of HIV-infected patients tightly correlated with β 2-microglobulin and neopterin levels, two important indicators of the immune activity [83]. Noteworthy, 3-HK levels are increased in HIV patients, particularly those presenting complications such as dementia [49,50,123], infantile spasms [51], and hepatic encephalopathy [49].

Schizophrenia

It has been suggested that the neurotoxic pattern evoked by QUIN during the occurrence of inflammatory events mediated by activated microglia and macrophages, might play an active role in neuronal death during brain infectious episodes [124]. An increased density of microglia is accompanied by QUIN enhanced levels, an event that has been described in *postmortem* brains of patients with schizophrenia [125,126]. Decreased tryptophan levels accompanied by an increased IDO activity have been found in frontal cortex of schizophrenic patients, suggesting that KP might be altered in this disorder [127]. Supporting evidence on a deficiency of glutamatergic function in schizophrenia was collected by Erhardt and coworkers [128], who described augmented KYNA concentrations in CSF of these patients. While at moderate concentrations, KYNA may block NMDAR and the nicotinic receptor for acetylcholine – the last being a prominent action for cognitive functions – at high concentrations, KYNA may be involved in psychotic symptoms and cognitive dysfunction. Since considerable activation of astrocytes occurs during schizophrenia, and activated astrocytes are likely to be responsible for increased KYNA formation, excessive KYNA in the schizophrenic brain might be reducing NMDAR function and thus, producing the major features of schizophrenia [129].

Recently, S'tastny and coworkers [130] have raised an interesting theory consisting in the proposal of increased QUIN levels in early postnatal stages of brain viral infections as a causative factor for schizophrenia in late adolescence and/or early adulthood. These authors based their considerations in a robust body of experimental and clinical evidence. Further steps of this group should be critical to understand the role of QUIN in schizophrenia in a near future.

Inflammation

Tissular damage is usually accompanied by an inflammatory reaction with the consequent activation of monocytes, peripheral macrophages and microglial cells, as well as macrophage invasion to the CNS. Clearly, cell stimulation and activation (i.e., by lipopolysaccharide or interferon- γ) may induce some KP components. Thus, activation of macrophages and glial cells lead to enhanced production of QUIN and other cytotoxins [84,131]. Human microglia, macrophages and fetal brain cell cultures can normally metabolize tryptophan, L-KYN and 3-HK into QUIN, even when they are not stimulated [132]. Treatment of these cells with interferon- γ augmented IDO, kynurenine 3-hydroxylase and 3-HAO activities, and amplified QUIN formation, reaching levels of 438 and 1410 nM in glia and macrophages, respectively [133]. Interestingly, the increased QUIN concentrations in brain following immune stimulation can be prevented by cell metabolism inhibitors, or anti-inflammatory steroid agents, such as dexametasona, a compound capable

of suppressing the activation of immuno-competent cells [134].

Increased QUIN concentrations have also been described in CSF and *postmortem* brains of patients with inflammatory-infectious disorders (bacterial, viral, fungic and parasitic diseases, meningitis, autoimmune diseases and septicemia). The correlations between QUIN, KYNA and L-KYN evidenced by immune stimulation (neopterin, white cell counting and IgG levels) indicated a tight relationship between an accelerated KP and the intracerebral cell stimulation [135]. Moreover, QUIN levels in child brains with a broad spectrum of bacterial infections of the CNS correlated with markers of immune activation, such as neopterin [136]. This indicates that QUIN is not only a useful marker of immune activation, but also might contribute to brain dysfunction and degeneration of children with CNS inflammation. Furthermore, septicemia was associated to increased QUIN and L-KYN levels in CSF of *Rhesus* macaques [137]. In addition, mice infected with the virus type 1 Herpes simplex developed paralysis and also presented high QUIN levels in the CNS. The infection was accompanied by an enhancement of IDO and kynurenine hydroxylase activities [138], and infectious events are unequivocally accompanied by inflammatory processes. Some groups have recently addressed the expression of different markers of inflammation induced by QUIN toxicity in relationship with oxidative stress and energy metabolism [139,140]. In summary, an active role of neuroactive KP metabolites on inflammatory events is leading recent investigation to develop new and promising therapeutic alternatives against infectious/inflammatory disorders of the nervous system.

Several immunohistochemical studies have shown a complete absence of immunoreactivity against QUIN in normal human brains [141], while under severe pathological conditions, both activated microglia and brain macrophages can exhibit an enhanced capacity to synthesize and accumulate QUIN to further release it through a transport system which is sensitive to probenecid [111,133,142]. In this regard, it is known that cytokine stimulation, preferentially with INF- γ , substantially increases IDO activity in activated macrophages [143], as well as the activities of other enzymes related with the QUIN synthesis, such as kynurenase and kynurenine 3-hydroxylase. It is also known that kynurenine 3-hydroxylase, and its stimulation by INF- γ , are both crucial for QUIN synthesis in microglia and macrophages [133]. QUIN is responsible for the induction of chemokine expression and chemokine receptors in astrocytes, thereby leading to a possible amplification of brain inflammation [93]. Thus, the neuronal and synaptic damage initiated by the activation of microglia and macrophages, and mediated by QUIN, are responsible for the further apoptotic death of oligodendrocytes [144].

In particular, human astrocytes have been used to demonstrate that IDO can be induced *in vitro* by IFN- γ (but not by cytokines), thus leading to the excessive formation of active KP metabolites. Of note, L-KYN in concentrations comparable to those produced by astrocytes, may lead to a significant QUIN production in macrophages. This evidence has served to propose that, during the occurrence of inflammatory events in the brain, activated astrocytes might indirectly contribute to neuronal damage by producing in the first place L-

KYN, and later QUIN by infiltrated macrophages or through activated resident microglia [108,133,145]. In further support of this suggestion, there is evidence showing that QPRT is not able to catalyze the whole amount of QUIN produced by macrophages during their infiltration, and further brain inflammation, and this is probably due to the fact that QPRT is easily saturable [8].

TOXIC MECHANISMS OF QUINOLINATE AND 3-HYDROXYKYNURENINE

As previously mentioned, KP can be activated by free radicals, interferon and cytokines produced during the inflammatory response, thus leading to the induction of IDO and TDO, both enzymes being responsible for the conversion of tryptophan into L-KYN. QUIN may then act as an NMDAr agonist [25,28,86], leading to neuronal damage, while KYNA may act as an antagonist on these receptors [39]. Other KP products, such as 3-HK, 3-HA, and QUIN itself, can also generate ROS and induce neuronal damage [29,30,33,63], as QUIN does [146,147].

The excitatory action of QUIN on NMDAr produces a substantial increase in Ca^{2+} influx in target neurons. Ca^{2+} is responsible for excitotoxic cell damage. By this means, QUIN causes cell death when directly administered *via* intracerebral to rats and non-human primates [28,148], or when added to neuronal cultures [149].

The implications of QUIN secretion when the cells from the immune system are activated, are of consideration, since there is enough evidence of a cooperative mechanism between cytokines and the activation of glutamatergic receptors, and such events can be mediated by nitric oxide [150]. For instance, Interleukin 1 is known to be one of the cytokines responsible for increasing the excitatory actions of NMDAr activation and its consequent neurotoxic cascade [25,151]. In addition, the neurotoxic effects derived from macrophages activation are known to be reduced by NMDAr antagonists.

On the other hand, the neurotoxic effects exerted by QUIN may induce a progressive mitochondrial alteration, which in turn can contribute to the neurodegenerative process [152]. Thus, QUIN-induced toxicity partially depends on ROS formation [153], and this assumption is reinforced by evidence showing that the toxic effects of QUIN can be prevented by spin-trap agents such as α -phenyl-t-butyl nitron [154], as well as by free radical scavengers [155]. Moreover, QUIN has been extensively shown to enhance ROS formation and oxidative damage to lipids under *in vitro* and *in vivo* conditions [146,156], and this oxidative property has been supported by evidence demonstrating that QUIN-induced oxidative damage and neurotoxicity are related to reduced antioxidant defenses [157], and can be prevented by the use of antioxidant agents such as melatonin [147,158,159], and by NOS inhibitors such as L-NARG [160]. In particular, this last finding has served to suggest that NO, a free radical and important precursor of more potent toxic molecules, such as peroxynitrite, is playing an active role in the pattern of toxicity evoked by QUIN. More recently, the direct participation of peroxynitrite in QUIN neurotoxicity was demonstrated [161,162].

Regarding 3-HK, this is the case for a typical neurotoxic action exerted *via* ROS formation, and not by glutamatergic

receptors [29,30,33,63,64]. 3-HK release from cells is required to produce its neurotoxic effects, since the inhibition of its release by competitive neutral amino acids prevents the damage induced by the toxin [30]. It is also known that 3-HK levels are significantly increased in the brain of mice subjected to immune activation or after the administration of interferon- γ [163]. Thus, some factors involved in the neuronal damage induced by 3-HK might be attributed to its metabolite of degradation, 3-HA, since the last rapidly undergoes auto-oxidation with the consequent formation of superoxide anion [164,165]. In 1996, Okuda and coworkers [33] described that 3-HK induces neuronal death in cultured striatal neurons, and shortly thereafter other groups demonstrated that this toxin may potentiate the excitotoxic damage produced by QUIN under *in vitro* and *in vivo* conditions [31,166]. In contrast, KYNA provides anti-excitotoxic neuroprotection which results particularly effective to prevent QUIN-induced cell damage [36,52]. At a 350 nM concentration, given for 5 weeks, QUIN causes a remarkable reduction of cellular density accompanied by loss of microtubule-associated proteins [167]. Thomas and coworkers [10] demonstrated that NO can inhibit IDO in a reversible manner, whereas according to this author, NOS inhibition leads to IDO induction.

Stone and Behan [140] have recently demonstrated that low doses of QUIN or IL-1 β are unable to produce damage when given alone, but in combination, they induce a significant loss of pyramidal neurons at the hippocampus. At high concentrations, these molecules produce a complete neuronal loss. Interestingly, it was demonstrated that ZM241385, an adenosine (A₂) receptor antagonist, is able to reduce neuronal injury produced by the combination of QUIN and IL-1 β , demonstrating an active participation of these receptors on the combined excitotoxic and inflammatory events leading to cell damage.

Of final consideration on this topic, the alteration in mitochondrial function observed after the administration of QUIN to rodents, as well as ATP and NAD depletion, have been suggested as secondary events occurring after the excessive calcium uptake by cell organelles. Therefore, the early toxic effects of QUIN on the striatal activity and the ion flux might be contributing to the subsequent abnormalities in energy metabolism, which in turn are potential contributing factors for neurodegeneration and excitotoxic cell death [152].

KYNURENIC ACID AND NMDA RECEPTORS

KYNA represents a fascinating molecule with several properties in the CNS. This metabolite has been widely reported to antagonize the excitatory actions of glutamatergic receptors activation in rodents and primates [168], even acting on specific subpopulations of the kainate receptors [169]. Its broad spectrum of actions as an inhibitory agent also comprehends NMDAr and non-NMDAr. Of note, its precursor, L-KYN may also act as an agonist at the glycine site of the NMDAr [170]. Interestingly, while at low concentrations KYNA acts as a competitive blocker of the glycine co-agonist site at the NMDAr [37,171], as well as a non-competitive inhibitor of the $\alpha 7$ -nicotinic receptor for acetylcholine [38]; at high concentrations (non physiological concentrations), this metabolite can exert its actions as an antagonist on different receptors for excitatory amino acid [39].

The fact that KYNA may have affinity for these two receptors in the range of concentrations at which this metabolite is found in human and rodent brains, suggests a physiological function in modulating glutamatergic and cholinergic transmissions. This assumption is supported by the fact that a reduction in the striatal levels of KYNA raises tissue vulnerability to excitotoxic insults [40], while an elevation in KYNA concentrations inhibits glutamate release [41]. It is also important to mention that KYNA formation is influenced by different factors such as the bioavailability of 2-oxoacids [172], the cellular energy status [16,173-175], and the dopaminergic activity [40,176,177]. In addition, it is known that KYNA is able to cross the BBB [178,179], and its activity as an antagonist agent is related to its ability to prevent brain damage followed by anoxia [180] and ischemia [179,181]. In consideration of these evidence, as well as the fact that the KYNA antagonism on glutamatergic receptors can be modulating the neuronal excitability and possibly attenuating excitotoxic brain damage, in recent years there has been an increasing interest in studying the mechanisms of action of this and other related KP metabolites. Furthermore, interest is devoted to the development of glutamatergic antagonists with therapeutic implications, especially for treatment of neurodegenerative disorders and stroke. Changes in intra and extracellular Ca^{2+} levels produce long-term alterations in synaptic function, which in turn leads to neuronal cell death. Therefore, KYNA characterization as an antagonist of the glutamatergic function at NMDAR [39] represents itself an interesting approach for the development of chemically-related compounds with neuroprotective properties.

QUIN/KYNA BALANCE

As previously described, the disturbances in the levels, and therefore the balance, of QUIN/KYNA, might alter basic nerve glutamatergic functions leading to neurodegeneration. Experimental studies on animals have demonstrated that KYNA can attenuate the excitotoxic effects of QUIN [36]. The concentration of KYNA in the CNS normally exceeds QUIN concentration by three-fold. Moreover, it has been shown that the levels of both metabolites are significantly increased after immune activation in human, non-human primates, gerbil and mice, although the magnitude in the increase of QUIN levels is always above the increased KYNA levels [20,83,132,163,182-185]. Hence, the uneven QUIN/KYNA balance is responsible for excitotoxicity.

QUIN and KYNA concentrations in substantia nigra pars compacta (SNc) may be sufficiently high to influence the *in vivo* function of excitatory amino acid receptors [186]. Of note, increased QUIN or decreased KYNA levels are known to be responsible for excessive NMDAR activation. In addition, the protective role of enhanced KYNA levels against QUIN toxicity was reinforced by a report describing the positive actions of the combined pharmacological treatment of probenecid plus kynurenine [187]. In this regard, it has been shown that KYNA levels can be regulated by nicotinylalanine (NICALA) [188], a well-known inhibitor of kynurenase and kynurenine hydroxylase, two critical enzymes for the biosynthesis of QUIN. Shortly thereafter, it was demonstrated that NICALA, in combination with L-KYN and probenecid, attenuates the QUIN-induced excitotoxicity in SNc [189].

KYNA AS FREE RADICAL SCAVENGER

KYNA is a well-known neuroactive metabolite formed in the brain. Its anti-excitatory actions have been widely studied and documented [5,190-193]. KYNA can be synthesized by three different ways: a) by mean of L-KYN transamination; b) by mean of interactions of indol-3-pyruvate with reactive oxygen; and c) by the action of hemoperoxidase using kynurenine as an hydrogen donor [194,195]. In the first case, the limitant step corresponds to the rupture of the pyrrolic ring from tryptophan, which is catalyzed in the brain by IDO, an inducible enzyme in microglia activated by inflammatory signals [196]. The second pathway is clearly not dependent on the brain metabolism; and this process is characterized by the fact that the administration of indol-pyruvic acid produces a raise in KYNA levels. Finally, the last pathway depends on the concentration of hydrogen peroxide, but it can be limited by the availability of kynurenine.

KYNA has been also demonstrated to be an effective hydroxyl radical scavenger, a property that has been proved in different experimental systems and served to emphasize its broad spectrum of neuroprotective actions [194,195,197-201]. The capability of KYNA to scavenge hydroxyl radical was demonstrated in experiments of competition with ABTS system (a hematoxylin auto-oxidation system) to test interactions with superoxide anions [194,195,200], protection of deoxyribose mediated by hydroxyl radical [194,195,201], and the inhibition of chemoluminescence emitted during the oxidation of KYNA by DMSO. For that purpose, two different oxidation systems were employed [194,195,198,199]. Interestingly, the results of those experiments confirmed the early observations of Goda and coworkers [197]. Zsizsik and Hardeland [195] have also determined that one of the products formed during KYNA oxidation in the presence of hydrogen peroxide is 2-hydroxycromanone, or its enolic tautomer 2,4-dihydroxychromene. Based on the probability of 2-hydroxycromanone formation, they suggested a model of KYNA oxidation by reactive oxygens. The proposed mechanism begins with hydroxyl radical, which is sequestered by KYNA. Given that the decarboxylation of the radical is stimulated in this process, another hydroxyl radical can be attached. Some steps forward, superoxide anion is also sequestered with a subsequent nitric oxide release, thereby resulting in the formation of 2-hydroxychromanone, which remains in equilibrium with its protonated form. However, such a mechanism, in which the sequestration of two hydroxyls and one superoxide radical take place, still requires further confirmation for decarboxylation and nitric oxide release steps. In addition, in assays where the continuous generation of hydroxyl radicals is mediated by photolysis of N-hydroxy-2-pyridinone, the noxious effects of the oxidant agent, as well as KYNA protection, have been both demonstrated through the measurement of malondialdehyde from 2-deoxyribose [194,195,199]. δ -Aminolevulinic acid (ALA) constitutes another source of hydroxyl radical, producing an enolic subform of this metabolite. Enolic ALA is indeed a well-known ROS generator acting through a mechanism that involves iron. In this case, the major source of damage is attributed to hydroxyl radical, which in turn presents the highest reactivity among several oxygen compounds [202-205].

The processes of auto-oxidation associated to the formation of pro-oxidant agents are also possible in the absence of transition metals, although the first are strongly stimulated

by the second, especially by iron complexes [206]. Nonetheless, auto-oxidation can be promoted independently of the presence of metallic ions by light. In this regard, Coto-Montes and coworkers [207] demonstrated that KYNA - in combination with light-exposed ALA and during an absence of transition metals - strongly potentiates the pro-oxidant ALA features. Despite the evident need of detailed information on the interaction between free radical generator compound and their scavenger, it was clearly demonstrated that KYNA could behave as a pro-oxidant molecule under specific circumstances, like those of certain pathologic events.

In contrast to its neuroprotective capacity, KYNA may also decrease the mitochondrial efficacy to synthesize ATP by increasing Complex IV activity, thus reducing the respiratory control index, as well as the ADP/oxygen ratio [208]. In addition, it is known that α -oxoglutarate serves as substrate for the transamination of L-KYN to KYNA [209]. The enzymes responsible for KYNA formation are located in the inner membrane of mitochondria [210,211], and so, either KYNA, glutamate, or oxoglutarate, may all be influencing the mitochondrial respiratory function. More recently, Baran and coworkers [209] presented evidence that KYNA, anthranilic acid, 3-HK and 3-HA - but not L-KYN - all influence some parameters of the respiratory chain. Thus, mitochondrial dysfunction can be explained, at least in part, by 3-HK or 3-HA auto-oxidation, involving free radical formation [164].

Regarding KYNA, it has been shown that this metabolite is a modulator of synaptic transmission that is also able of affect ATP synthesis by uncoupling oxidative phosphorylation [208,209]. Since KYNA is known to deplete ATP by overactivating oxygen consumption, it is likely that this metabolite acts as an uncoupling agent of mitochondrial respiration. However, whether the antioxidant or the pro-oxidant features of KYNA emerge one over the other under different physiological or physiopathological conditions, is still a question remaining to be elucidated through intensive research.

CONCLUDING REMARKS

Here we have provided traditional and recent evidence regarding the involvement of neuroactive KP metabolites in several physiological and physiopathological processes. Despite the diverse mechanisms in which these neuroactive metabolites might act in the CNS, evidence points to one common conclusion: alterations in KP may play a role in neurodegenerative events at many levels. Antagonists of the KP would likely demonstrate positive properties (i.e., antioxidant capacity, anti-inflammatory, etc.), reducing the risk of neuronal cell damage and death. Thus, the interest for KP will certainly increase in the next years as it will provide us with relevant clues on the mechanisms underlying several disorders of the CNS.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to express our sincere gratitude to Prof. Robert Schwarcz, from the Maryland Psychiatric Research Center, for kindly sharing crucial information for this manuscript. Verónica Pérez-De La Cruz is a scholarship holder from CONACYT (Scholarship 200241).

REFERENCES

- [1] Beadle, G.W.; Mitchell, H.K.; Nyc, J.F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1947**, *33*, 155.
- [2] Vender, A.D. In *Amino Acid Metabolism*; John Wiley and Sons: USA, **1975**; pp. 172-177.
- [3] Moroni, F.; Lombardi, G.; Moneti, G.; Aldinio, C. *Neurosci. Lett.*, **1984**, *47*, 51.
- [4] Wolfensberg, M.; Amsler, U.; Cuenod, M.; Foster, A.C.; Whetsell, W.O. Jr.; Schwarcz, R. *Neurosci. Lett.*, **1983**, *41*, 247.
- [5] Stone, T.W. *Pharmacol. Rev.*, **1993**, *45*, 309.
- [6] Curzon, G. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1996**, *398*, 27.
- [7] Munn, D.H.; Zhou, M.; Attwood, J.T.; Bondarev, I.; Conway, S.J.; Marshall, B.; Brown, C.; Mellor, A.L. *Science*, **1998**, *281*, 1191.
- [8] Guillemin, G.J.; Kerr, S.J.; Smythe, G.A.; Smith, D.G.; Kapoor, V.; Armati, P.J.; Croitoru, J.; Brew, B.J. *J. Neurochem.*, **2001**, *78*, 842.
- [9] Hirata, F.; Hayaishi, O. *J. Biol. Chem.*, **1971**, *246*, 7825.
- [10] Thomas, S.R.; Mohr, D.; Stocker, R. *J. Biol. Chem.*, **1994**, *269*, 14457.
- [11] Stone, T.W.; Darlington, L.G. *Nature Rev. Drug Discov.*, **2002**, *1*, 609.
- [12] Taniguchi, T.; Sono, M.; Hirata, F.; Hayaishi, O.; Tamura, M.; Hayashi, K.; Iizuka, T.; Ishimura, Y. *J. Biol. Chem.*, **1979**, *254*, 3288.
- [13] Nishikimi, M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1975**, *63*, 92.
- [14] Ozaki, Y.; Nichol, C.A.; Duch, D.S. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1987**, *257*, 207.
- [15] Takikawa, O. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2005**, *338*, 12.
- [16] Gramsbergen, J.B.; Hodgkins, P.S.; Rassoulpour, A.; Turski, W.A.; Guidetti, P.; Schwarcz, R. *J. Neurochem.*, **1997**, *69*, 290.
- [17] Okamoto, H.; Yamamoto, S.; Nozaki, M.; Hayaishi, O. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1967**, *26*, 309.
- [18] Okuno, E.; Kohler, C.; Schwarcz, R. *J. Neurochem.*, **1987**, *49*, 771.
- [19] Okuno, E.; Kido, R. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1991**, *294*, 167.
- [20] Saito, K.; Nowak, T.S. Jr.; Markey, S.P.; Heyes, M.P. *J. Neurochem.*, **1992**, *60*, 180.
- [21] Roberts, R.C.; Du, F.; McCarthy, K.E.; Okuno, E.; Schwarcz, R. *J. Comp. Neurol.*, **1992**, *326*, 82.
- [22] Roberts, R.C.; McCarthy, K.E.; Du, F.; Ottersen, O.P.; Okuno, E.; Schwarcz, R. *J. Neurosci.*, **1995**, *15*, 1150.
- [23] Kohler, C.; Okuno, E.; Flood, P.R.; Schwarcz, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1987**, *84*, 3491.
- [24] Kohler, C.; Eriksson, L.G.; Okuno, E.; Schwarcz, R. *Neuroscience*, **1988**, *27*, 49.
- [25] Stone, T.W. *Prog. Neurobiol.*, **2001**, *64*, 185.
- [26] Wolf, H. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **1974**, *136*, 1.
- [27] Lapin, I.P. *J. Neurol. Transm.*, **1978**, *42*, 37.
- [28] Schwarcz, R.; Whetsell, W.O. Jr.; Mangano, R.M. *Science*, **1983**, *219*, 316.
- [29] Eastman, C.L.; Guilarte, T.R. *Brain Res.*, **1989**, *495*, 225.
- [30] Okuda, S.; Nishiyama, N.; Saito, H.; Katsuki, H. *J. Neurochem.*, **1998**, *70*, 299.
- [31] Guidetti, P.; Schwarcz, R. *Eur. J. Neurosci.*, **1999**, *11*, 3857.
- [32] Goldstein, L.E.; Leopold, M.C.; Huang, X.; Atwood, C.S.; Saunders, A.J.; Hartshorn, M.; Lim, J.T.; Faget, K.Y.; Muffat, J.A.; Scarpa, R.C.; Chylack, L.T. Jr.; Bowden, E.F.; Tanzi, R.E.; Bush, A.I. *Biochemistry*, **2000**, *39*, 7266.
- [33] Okuda, S.; Nishiyama, N.; Saito, H.; Katsuki, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1996**, *93*, 12553.
- [34] Morita, T.; Saito, K.; Takemura, M.; Maekawa, N.; Fujigaki, S.; Fujii, H.; Wada, H.; Takeuchi, S.; Noma, A.; Seishima, M. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1999**, *467*, 559.
- [35] Eastman, C.L.; Guilarte, T.R.; Lever, J.R. *Brain Res.*, **1992**, *584*, 110.
- [36] Foster, A.C.; Vezzani, A.; French, E.D.; Schwarcz, R. *Neurosci. Lett.*, **1984**, *48*, 273.
- [37] Kessler, M.; Terramani, T.; Lynch, G.; Baudry, M. *J. Neurochem.*, **1989**, *52*, 1319.
- [38] Hilmas, C.; Pereira, E.F.; Alkondon, M.; Rassoulpour, A.; Schwarcz, R.; Albuquerque, E.X. *J. Neurosci.*, **2001**, *21*, 7463.
- [39] Perkins, M.N.; Stone, T.W. *Brain Res.*, **1982**, *247*, 184.
- [40] Poeggeler, B.; Rassoulpour, A.; Guidetti, P.; Wu, H.Q.; Schwarcz, R. *Dev. Neurosci.*, **1998**, *20*, 146.
- [41] Carpenedo, R.; Pittaluga, A.; Cozzi, A.; Attucci, S.; Galli, A.; Raiteri, M.; Moroni, F. *Eur. J. Neurosci.*, **2001**, *13*, 2141.
- [42] Sapko, M.T.; Guidetti, P.; Yu, P.; Tagle, D.A.; Pellicciari, R.; Schwarcz, R. *Exp. Neurol.*, **2006**, *197*, 31.

- [43] Schwarcz, R.; Foster, A.C.; French, E.D.; Whetsell, W.O. Jr.; Kohler, C. *Life Sci.*, **1984**, 35, 19.
- [44] Whetsell, W.O. Jr.; Schwarcz, R. *Neurosci. Lett.*, **1989**, 97, 271.
- [45] Kerr, S.J.; Armati, P.J.; Guillemin, G.J.; Brew, B.J. *AIDS*, **1998**, 12, 355.
- [46] Scharfman, H.E.; Hodgkins, P.S.; Lee, S.C.; Schwarcz, R. *Neurosci. Lett.*, **1999**, 274, 111.
- [47] Beal, M.F.; Matson, W.R.; Swartz, K.J.; Gamache, P.H.; Bird, E.D. *J. Neurochem.*, **1990**, 55, 1327.
- [48] Schwarcz, R.; Rassoulpour, A.; Wu, H.Q.; Medoff, D.; Tamminga, C.A.; Roberts, R.C. *Biol. Psychiatry*, **2001**, 50, 521.
- [49] Pearson, S.J.; Reynolds, G.P. *J. Chromatogr.*, **1991**, 565, 436.
- [50] Sardar, A.M.; Reynolds, G.P. *Neurosci. Lett.*, **1995**, 187, 9.
- [51] Yamamoto, H.; Shindo, I.; Egawa, B.; Horiguchi, K. *Pediatr. Neurol.*, **1994**, 10, 9.
- [52] Schwarcz, R.; Pellicciari, R. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2002**, 303, 1.
- [53] Anandatheerthavarada, H.K.; Biswas, G.; Robin, M.A.; Avadhani, N.G. *J. Cell Biol.*, **2003**, 161, 41.
- [54] Beal, M.F. *J. Bioenerg. Biomemb.*, **2004**, 36, 381.
- [55] Tretter, L.; Sipos, I.; Adam-Vizi, V. *Neurochem. Res.*, **2004**, 29, 569.
- [56] Caspersen, C.; Wang, N.; Yao, J.; Sosunov, A.; Chen, X.; Lustbader, J.W.; Xu, H.W.; Stern, D.; McKhann, G.; Yan, S.D. *FASEB J.*, **2005**, 19, 2040.
- [57] Saft, C.; Zange, J.; Andrich, J.; Muller, K.; Lindenberg, K.; Landwehrmeyer, B.; Vorgerd, M.; Kraus, P.H.; Przuntek, H.; Schols, L. *Mov. Disord.*, **2005**, 20, 674.
- [58] Ribeiro, C.A.; Grando, V.; Dutra-Filho, C.S.; Wannmacher, C.M.; Wajner, M. *J. Neurochem.*, **2006**, 99, 1531.
- [59] Schuck, P.F.; Tonin, A.; da Costa-Ferreira, G.; Viegas, C.M.; Latini, A.; Duval; Wannmacher, C.M.; de Souza-Wyse, A.T.; Dutra-Filho, C.S.; Wajner, M. *Cell. Mol. Neurobiol.*, **2007**, 27, 147.
- [60] Schuck, P.F.; Tonin, A.; da Costa-Ferreira, G.; Rosa, R.B.; Latini, A.; Balesstro, F.; Perry, M.L.; Wannmacher, C.M.; de Souza-Wyse, A.T.; Wajner, M. *Neurosci. Res.*, **2007**, 57, 277.
- [61] Pearson, S.J.; Reynolds, G.P. *Neurosci. Lett.*, **1992**, 144, 199.
- [62] Guidetti, P.; Wu, H.Q.; Schwarcz, R. *Exp. Neurol.*, **2000**, 163, 123.
- [63] Eastman, C.L.; Guilarte, T.R. *Neurochem. Res.*, **1990**, 15, 1101.
- [64] Nakagami, Y.; Saito, H.; Katsuki, H. *Jpn. J. Pharmacol.*, **1996**, 71, 183.
- [65] Schwarcz, R.; Okuno, E.; White, R.J.; Bird, E.D.; Whetsell, W.O. Jr. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1988**, 85, 4079.
- [66] Jauch, D.; Urbanska, E.M.; Guidetti, P.; Bird, E.D.; Vonsattel, J.P.; Whetsell, W.O. Jr.; Schwarcz, R. *J. Neurol. Sci.*, **1995**, 130, 39.
- [67] Reynolds, G.P.; Pearson, S.J. *Lancet*, **1989**, 2, 979.
- [68] Guidetti P, Luthi-Carter RE, Augood SJ, Schwarcz R. Neostriatal and cortical quinolinate levels are increased in early grade Huntington's disease. *Neurobiol. Dis.*, **2004**, 17, 455.
- [69] Carter, R.J.; Lione, L.A.; Humby, T.; Mangiarini, L.; Mahal, A.; Bates, G.P.; Dunnett, S.B.; Morton, A.J. *J. Neurosci.*, **1999**, 19, 3248.
- [70] Sathasivam, K.; Hobbs, C.; Mangiarini, L.; Mahal, A.; Turmaine, M.; Doherty, P.; Davies, S.W.; Bates, G.P. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **1999**, 354, 963.
- [71] Usdin, M.T.; Shelbourne, P.F.; Myers, R.M.; Madison, D.V. *Hum. Mol. Genet.*, **1999**, 8, 839.
- [72] Smith, R.; Brundin, P.; Li, J.-Y. *Cell. Mol. Life. Sci.*, **2005**, 62, 1901.
- [73] Tatter, S.B.; Galpern, W.R.; Hoogveen, A.T.; Isacson, O. *Neuroreport*, **1995**, 6, 1125.
- [74] Kuemmerle, S.; Gutekunst, C.A.; Klein, A.M.; Li, X.J.; Li, S.H.; Beal, M.F.; Hersch, S.M.; Ferrante, R.J. *Ann. Neurol.*, **1999**, 46, 842.
- [75] Bates, G. *Lancet*, **2003**, 361, 1642.
- [76] Chen, N.; Luo, T.; Wellington, C.; Metzler, M.; McCutcheon, K.; Hayden, M.R.; Raymond, L.A. *J. Neurochem.*, **1999**, 72, 1890.
- [77] Cepeda, C.; Ariano, M.A.; Calvert, C.R.; Flores-Hernandez, J.; Chandler, S.H.; Leavitt, B.R.; Hayden, M.R.; Levine, M.S. *J. Neurosci. Res.*, **2001**, 66, 525.
- [78] Zeron, M.M.; Hansson, O.; Chen, N.; Wellington, C.L.; Leavitt, B.R.; Brundin, P.; Hayden, M.R.; Raymond, L.A. *Neuron*, **2002**, 33, 849.
- [79] Fukui, S.; Schwarcz, R.; Rapoport, S.I.; Takada, Y.; Smith, Q.R. *J. Neurochem.*, **1991**, 56, 2007.
- [80] Miller, J.M.; MacGarvey, U.; Beal, M.F. *Neurosci. Lett.*, **1992**, 146, 115.
- [81] Vecsei, L.; Miller, J.; MacGarvey, U.; Beal, M.F. *Neurodegeneration*, **1992**, 1, 17.
- [82] Jauch, D.A.; Sethy, V.H.; Weick, B.G.; Chase, T.N.; Schwarcz, R. *Neuropharmacology*, **1993**, 32, 467.
- [83] Heyes, M.P.; Brew, B.J.; Saito, K.; Quearry, B.J.; Price, R.W.; Bhalla, R.B.; Der, M.; Markey, S.P. *J. Neuroimmunol.*, **1992**, 40, 71.
- [84] Espey, M.G.; Chernyshev, O.N.; Reinhard, J.F. Jr.; Nambodiri, M.A.; Colton, C.A. *Neuroreport*, **1997**, 8, 431.
- [85] Coyle, J.T.; Schwarcz, R. *Nature*, **1976**, 263, 244.
- [86] Stone, T.W.; Perkins, M.N. *Eur. J. Pharmacol.*, **1981**, 72, 411.
- [87] Young, A.B.; Greenamyre, J.T.; Hollingsworth, Z.; Albin, R.; D'Amato, C.; Shoulson, I.; Penney, J.B. *Science*, **1988**, 241, 981.
- [88] Mackay, G.M.; Forrest, C.M.; Stoy, N.; Christofides, J.; Egerton, M.; Stone, T.W.; Darlington, L.G. *Eur. J. Neurol.*, **2006**, 13, 30.
- [89] Stoy, N.; Mackay, G.M.; Forrest, C.M.; Christofides, J.; Egerton, M.; Stone, T.W.; Darlington, L.G. *J. Neurochem.*, **2005**, 93, 611.
- [90] Pascoe, M. *J. Neurochem.*, **1993**, 70, 299.
- [91] Guillemin, G.J.; Brew, B.J.; Noonan, C.E.; Takikawa, O.; Cullen, K.M. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, **2005**, 31, 395.
- [92] Walsh, D.M.; Klyubin, I.; Fadeeva, J.V.; Cullen, W.K.; Anwyl, R.; Wolfe, M.S.; Rowan, M.J.; Selkoe, D.J. *Nature*, **2002**, 416, 535.
- [93] Guillemin, G.J.; Smythe, G.A.; Veas, L.A.; Takikawa, O.; Brew, B.J. *Neuroreport*, **2003**, 14, 2311.
- [94] Widner, B.; Leblhuber, F.; Walli, J.; Titz, G.P.; Demel, U.; Fuchs, D. *J. Neural Transm.*, **2000**, 107, 343.
- [95] Baran, H.; Jellinger, K.; Deecke, L. *J. Neural. Transm.*, **1999**, 106, 165.
- [96] Hartai, Z.; Juhasz, A.; Rimanoczy, A.; Janaky, T.; Donko, T.; Dux, L.; Penke, B.; Toth, G.K.; Janka, Z.; Kalman, J. *Neurochem. Int.*, **2007**, 50, 308.
- [97] Ogawa, T.; Matson, W.R.; Beal, M.F.; Myers, R.H.; Bird, E.D.; Milbury, P.; Saso, S. *Neurology*, **1992**, 42, 1702.
- [98] Misztal, M.; Skangiel-Kramka, J.; Niewiadomska, G.; Danysz, W. *Neuropharmacology*, **1996**, 35, 449.
- [99] Gramsbergen, J.B.; Schmidt, W.; Turski, W.A.; Schwarcz, R. *Brain Res.*, **1992**, 588, 1.
- [100] Wada, H.; Ito, H.; Orimo, H.; Sato, A. *Biogenic Amines*, **1994**, 10, 221.
- [101] Pittaluga, A.; Pattarini, R.; Raiteri, M. *Eur. J. Pharmacol.*, **1995**, 272, 203.
- [102] Pittaluga, A.; Vaccari, D.; Raiteri, M. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1997**, 283, 82.
- [103] Moroni, F.; Russi, P.; Carla, V.; Lombardi, G. *Neurosci. Lett.*, **1988**, 94, 145.
- [104] Ohno, M.; Yamamoto, T.; Watanabe, S. *Eur. J. Pharmacol.*, **1994**, 253, 183.
- [105] Steele, R.J.; Stewart, M.G. *Behav. Neural Bio.*, **1993**, 60, 89.
- [106] Hlinak, Z.; Krejci, I. *Psychopharmacology*, **1995**, 120, 463.
- [107] Heyes, M.P.; Nowak, T.S. Jr. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **1990**, 10, 660.
- [108] Saito, K.; Crowley, J.S.; Markey, S.P.; Heyes, M.P. *J. Biol. Chem.*, **1993**, 268, 15496.
- [109] Wood, E.R.; Bussey, T.J.; Phillips, A.G. *Neuroreport*, **1993**, 4, 151.
- [110] Lees, G.J. *J. Neurol. Sci.*, **1993**, 114, 119.
- [111] Baratte, S.; Molinari, A.; Veneroni, O.; Speciale, C.; Benatti, L.; Salvati, P. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **1998**, 59, 50.
- [112] Walker, D.W.; Curtis, B.; Lacey, B.; Nitsos, I. *Pediatr. Res.* **1999**, 45, 820.
- [113] Sinz, E.H.; Kochanek, P.M.; Heyes, M.P.; Wisniewski, S.R.; Bell, M.J.; Clark, R.S.; DeKosky, S.T.; Blight, A.R.; Marion, D.W. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **1998**, 18, 610.
- [114] Bell, M.J.; Kochanek, P.M.; Heyes, M.P.; Wisniewski, S.R.; Sinz, E.H.; Clark, R.S.; Blight, A.R.; Marion, D.W.; Adelson, P.D. *Crit. Care Med.* **1999**, 27, 493.
- [115] Feldblum, S.; Rougier, A.; Loiseau, H.; Loiseau, P.; Cohadon, F.; Morselli, P.L.; Lloyd, K.G. *Epilepsia*, **1988**, 29, 523.
- [116] Heyes, M.P. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1996**, 398, 125.
- [117] Chao, C.C.; Hu, S.; Peterson, P.K. *J. Neurovirol.*, **1996**, 2, 234.
- [118] Lipton, S.A. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **1998**, 38, 159.
- [119] Heyes, M.P.; Rubinow, D.; Lane, C.; Markey, S.P. *Ann. Neurol.*, **1989**, 26, 275.
- [120] Heyes, M.P.; Brew, B.J.; Martin, A.; Price, R.W.; Salazar, A.M.; Seditis, J.J.; Yergey, J.A.; Mouradian, M.M.; Sadler, A.E.; Keilp, J.; Rubinow, D.; Markey, S.P. *Ann. Neurol.*, **1991**, 29, 202.

- [121] Martin, A.; Heyes, M.P.; Salazar, A.M.; Kampen, D.L.; Williams, J.; Law, W.A.; Coats, M.E.; Markey, S.P. *J. Neuropsychiat. Clin. Neurosci.*, **1992**, *4*, 270.
- [122] Heyes, M.P.; Saito, K.; Lackner, A.; Wiley, C.A.; Achim, C.L.; Markey, S.P. *FASEB J.*, **1998**, *12*, 881.
- [123] Sardar, A.M.; Bell, J.E.; Reynolds, G.P. *J. Neurochem.* **1995**, *64*, 932.
- [124] Brew, B.J.; Corbeil, J.; Pemberton, L.; Evans, L.; Saito, K.; Penny, R.; Cooper, D.A.; Heyes, M.P. *J. Neurovirol.*, **1995**, *1*, 369.
- [125] Bayer, T.A.; Buslei, R.; Havas, L.; Falkai, P. *Neurosci. Lett.*, **1999**, *271*, 126.
- [126] Radewicz, K.; Garey, L.J.; Gentleman, S.M.; Reynolds, R. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **2000**, *59*, 137.
- [127] Miller, C.L.; Llenos, I.C.; Dulay, J.R.; Barillo, M.M.; Yolken, R.H.; Weis, S. *Neurobiol. Dis.*, **2004**, *15*, 618.
- [128] Erhardt, S.; Schwieler, L.; Engberg, G. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **2003**, *527*, 155.
- [129] Muller, N.; Schwarz, M.J. *Nervenarzt*, **2007**, *78*, 252.
- [130] St'astny, F.; Tejkalová, H.; Skuba, I.; Balcar, B.J.; Kaiser, M.; Yoneda, Y. In *Amino Acid Signaling*; Yoneda Y., Ed.; Res. Signpost 37/661; Kerala, India, **2005**; pp. 67-83.
- [131] Heyes, M.P.; Saito, K.; Markey, S.P. *Biochem. J.*, **1992**, *283*, 633.
- [132] Heyes, M.P.; Saito, K.; Jacobowitz, D.; Markey, S.P.; Vickers, J.H.; Takikawa, O. *FASEB J.*, **1992**, *6*, 2977.
- [133] Heyes, M.P.; Achim, C.L.; Wiley, C.A.; Major, E.O.; Saito, K.; Markey, S.P. *Biochem J.*, **1996**, *320*, 595.
- [134] Saito, K.; Markey, S.P.; Heyes, M.P. *Neurosci. Lett.*, **1994**, *178*, 211.
- [135] Heyes, M.P. *Biochem. Soc. Trans.*, **1993**, *21*, 83.
- [136] Heyes, M.P.; Saito, K.; Milstein, S.; Schiff, S.J. *J. Neurol. Sci.*, **1995**, *133*, 112.
- [137] Heyes, M.P.; Lackner, A. *J. Neurochem.*, **1990**, *55*, 338.
- [138] Reinhard, J.F. Jr. *Neurochem. Res.*, **1998**, *23*, 661.
- [139] Ryu, J.K.; Choi, H.B.; McLarnon, J.G. *Neuroscience*, **2006**, *141*, 1835.
- [140] Stone, T.W.; Behan, W.M. *J. Neurosci. Res.*, **2007**, *85*, 1077.
- [141] Moffett, J.F.; Espey, M.G.; Gaudet, S.J.; Nambuoudiri, M.A. *Brain Res.*, **1993**, *623*, 337.
- [142] Morrison, P.F.; Morishige, G.M.; Beagles, K.E.; Heyes, M.P. *J. Neurochem.*, **1999**, *72*, 2135.
- [143] Chiarugi, A.; Dello-Sbarba, P.; Paccagnini, A.; Donnini, S.; Filippi, S.; Moroni, F. *J. Leukoc. Biol.*, **2000**, *68*, 260.
- [144] Cammer, W. *Brain Res.*, **2001**, *896*, 157.
- [145] Heyes, M.P.; Chen, C.; Major, E.O.; Saito, K. *Biochem J.*, **1997**, *326*, 351.
- [146] Rios, C.; Santamaría, A. *Neurochem. Res.*, **1991**, *16*, 1139.
- [147] Behan, W.M.; McDonald, M.; Darlington, L.G.; Stone, T.W. *Br. J. Pharmacol.*, **1999**, *128*, 1754.
- [148] Stone, T.W.; Connick, J.H.; Winn, P.; Hastings, M.H.; English, M. In *'Selective Neuronal Death' Ciba Foundation Symposium*; Vol. 126, Wiley, Chichester, **1987**; pp. 204-220.
- [149] Kim, J.P.; Choi, D.W. *Neuroscience* **1987**, *23*, 423.
- [150] Kim, W.K.; Yoon, K.N.; Choi, J.J.; Pae, Y.S. *Soc. Neurosci. Abstr.*, **1997**, *23*, 897.
- [151] Ma, X.L.; Gottschall, P.E.; Weiss, D.S.; Amin, J.; Chen, L.T.; Wiranowska, M.; Phelps, C.P. *Soc. Neurosci. Abstr.*, **1997**, *23*, 897.
- [152] Bordelon, Y.M.; Chesselet, M.F.; Nelson, D.; Welsh, F.; Erecinska, M. *J. Neurochem.*, **1997**, *69*, 1629.
- [153] Puntel, R.L.; Nogueira, C.W.; Rocha, J.B. *Neurochem. Res.*, **2005**, *30*, 417.
- [154] Nakao, N.; Brundin, P. *Neuroscience*, **1997**, *76*, 749.
- [155] Nakai, M.; Qin, Z.H.; Wang, Y.; Chase, T.N. *Brain Res. Molec. Brain Res.*, **1999**, *64*, 59.
- [156] Santamaría, A.; Ríos, C. *Neurosci. Lett.*, **1993**, *159*, 51.
- [157] Leipnitz, G.; Schumacher, C.; Scussiato, K.; Dalcin, K.B.; Wannmacher, M.D.; Wyse, T.D.; Dutra-Filho, C.S.; Wajner, M.; Latini, A. *Int. J. Dev. Neurosci.*, **2005**, *23*, 695.
- [158] Southgate, G.S.; Daya, S.; Potgieter, B.J. *Chem. Neuroanat.*, **1998**, *14*, 151.
- [159] Cabrera, J.; Reiter, R.J.; Tan, D.X.; Qi, W.; Sainz, R.M.; Mayo, J.C.; Garcia, J.J.; Kim, S.J.; El-Sokkary, G. *Neuropharmacology*, **2000**, *39*, 507.
- [160] Santamaría, A.; Santamaría, D.; Diaz-Muñoz, M.; Espinoza-Gonzalez, V.; Rios, C. *Toxicol. Lett.*, **1997**, *93*, 117.
- [161] Noack, H.; Lindenau, J.; Rothe, F.; Asayama, K.; Wolf, G. *Glia*, **1998**, *23*, 285.
- [162] Perez-De La Cruz, V.; Gonzalez-Cortes, C.; Galvan-Arzate, S.; Medina-Campos, O.N.; Perez-Severiano, F.; Ali, S.F.; Pedraza-Cheverri, J.; Santamaría, A. *Neuroscience*, **2005**, *135*, 463.
- [163] Saito, K.; Markey, S.P.; Heyes, M.P. *Neuroscience*, **1992**, *51*, 25.
- [164] Dykens, J.A.; Sullivan, S.G.; Stern, A. *Biochem. Pharmacol.*, **1987**, *36*, 211.
- [165] Dykens, J.A.; Sullivan, S.G.; Stern, A. *Biochem. Pharmacol.*, **1989**, *38*, 1555.
- [166] Chiarugi, A.; Meli, E.; Moroni, F. *J. Neurochem.*, **2001**, *77*, 1310.
- [167] Stone, T.W. *Toxicol.*, **2001**, *39*, 61.
- [168] Stone, T.W.; Perkins, M.N. *Neurosci. Lett.*, **1984**, *52*, 335.
- [169] Stone, T.W.; *Br. J. Pharmacol.*, **1990**, *101*, 847.
- [170] Stone, T.W. *Life Sci.*, **1991**, *48*, 765.
- [171] Kemp, J.A.; Foster, A.C.; Leeson, P.D.; Priestley, T.; Tridgett, R.; Iversen, L.L.; Woodruff, G.N. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1988**, *85*, 6547.
- [172] Hodgkins, P.S.; Wu, H.Q.; Zielke, H.R.; Schwarcz, R. *J. Neurochem.*, **1999**, *72*, 643.
- [173] Carpenedo, R.; Meli, E.; Peruginelli, F.; Pellegrini-Giampietro, D.E.; Moroni, F. *J. Neurochem.*, **2002**, *82*, 1465.
- [174] Hodgkins, P.S.; Schwarcz, R. *Eur. J. Neurosci.*, **1998**, *10*, 1986.
- [175] Turski, W.A.; Gramsbergen, J.B.P.; Traitler, H.; Schwarcz, R. *J. Neurochem.*, **1989**, *52*, 1629.
- [176] Rassoulpour, A.; Wu, H.Q.; Poeggeler, B.; Schwarcz, R. *Brain Res.*, **1998**, *802*, 111.
- [177] Wu, H.Q.; Rassoulpour, A.; Schwarcz, R. *J. Neural Transm.*, **2002**, *109*, 239.
- [178] Scharfman, H.E.; Goodman, J.H. *Neuroscience* **1998**, *86*, 751.
- [179] Salvati, P.; Ukmar, G.; Dho, L.; Rosa, B.; Cini, M.; Marconi, M.; Molinari, A.; Post, C. *Progr. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **1999**, *23*, 741.
- [180] Simon, R.P.; Young, R.S.; Stout, S.; Cheng, J. *Neurosci. Lett.*, **1986**, *71*, 361.
- [181] Germano, I.M.; Pitts, L.H.; Meldrum, B.S.; Bartkowski, H.M.; Simon, R.P. *Ann. Neurol.*, **1987**, *22*, 730.
- [182] Heyes, M.P.; Mefford, I.N.; Quearry, B.J.; Dedhia, M.; Lackner, A. *Ann. Neurol.*, **1990**, *27*, 666.
- [183] Heyes, M.P.; Saito, K.; Crowley, J.; Davis, L.E.; Demitrak, M.A.; Der, M.; Dilling, L.; Kruesi, M.J.; Lanckner, A.; Larsen, S.A.; Lee, K.; Leonard, H.; Markey, S.P.; Martin, A.; Milstein, S.; Mouradian, M.M.; Pranzatelli, M.R.; Quearry, B.J.; Salazar, A.; Smith, M.; Strauss, S.E.; Sunderland, T.; Swedo, S.; Tourtellotte, W.W. *Brain*, **1992**, *115*, 1249.
- [184] Heyes, M.P.; Jordan, E.K.; Lee, K.; Saito, K.; Frank, J.A.; Snoy, P.J.; Markey, S.P.; Gravell, M. *Brain Res.*, **1992**, *570*, 237.
- [185] Halperin, J.J.; Heyes, M.P. *Neurology*, **1992**, *42*, 43.
- [186] Roberts, R.C.; McCarthy, K.E.; Du, F.; Okuno, E.; Schwarcz, R. *Brain Res.*, **1994**, *650*, 229.
- [187] Santamaría, A.; Rios, C.; Solis-Hernandez, F.; Ordaz-Moreno, J.; Gonzalez-Reynoso, L.; Altagracia, M.; Kravzov, J. *Neuropharmacology*, **1996**, *35*, 23.
- [188] Connick, J.H.; Heywood, G.C.; Sills, G.J.; Thompson, G.G.; Brodie, M.J.; Stone, T.W. *Gen. Pharmacol.*, **1992**, *23*, 235.
- [189] Miranda, A.F.; Boegman, R.J.; Beninger, R.J.; Jhamandas, K.J. *Neuroscience*, **1997**, *78*, 967.
- [190] Moroni, F.; Carpenedo, R.; Chiarugi, A. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1996**, *398*, 203.
- [191] 191. Speciale, C.; Cini, M.; Wu, H.Q.; Salvati, P.; Schwarcz, R.; Molinari, A.; Calabresi, M.; Varasi, M. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1996**, *398*, 221.
- [192] Schwarcz, R.; Ceresoli-Borroni, G.; Guidetti, P. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1996**, *398*, 211.
- [193] Schwarcz, R.; Ceresoli-Borroni, G.; Wu, H.Q.; Rassoulpour, A.; Poeggeler, B.; Hodgkins, P.S.; Guidetti, P. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1999**, *467*, 113.
- [194] Zsizsik, B.K.; Hardeland, R. In *Actions and Redox Properties of Melatonin and Other Aromatic Amino Acid Metabolites*; Hardeland, R., Ed.; Cuvillier: Göttingen, **2001**; pp. 156-163.
- [195] Zsizsik, B.K.; Hardeland, R. In *Actions and Redox Properties of Melatonin and Other Aromatic Amino Acid Metabolites*; Hardeland, R., Ed.; Cuvillier: Göttingen, **2001**; pp. 142-147.
- [196] Alberati-Giani, D.; Ricciardi-Castagnoli, P.; Köhler, C.; Cesura, A.M. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1996**, *398*, 171.
- [197] Goda, K.; Kishimoto, R.; Shimizu, S.; Hamane, Y.; Ueda, M. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1996**, *398*, 247.

- [198] Hardeland, R.; Zsizsik, B.K. In *Biological Rhythms and Antioxidative Protection*; Hardeland, R., Ed.; Cuvillier: Göttingen, **1997**; pp. 153-160.
- [199] Hardeland, R.; Zsizsik, B.K.; Poeggeler, B.; Fuhrberg, B.; Holst, S.; Coto-Montes, A. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1999**, *467*, 389.
- [200] Zsizsik, B.K.; Hardeland, R. In *Studies on Antioxidants and Their Metabolites*; Hardeland, R., Ed.; Cuvillier: Göttingen, **1999**; pp. 82-91.
- [201] Zsizsik, B.K.; Hardeland, R. In *Studies on Antioxidants and Their Metabolites*; Hardeland, R., Ed.; Cuvillier: Göttingen, **1999**; pp. 92-94.
- [202] Hermes-Lima, M. *Free Radic. Biol. Med.*, **1995**, *19*, 381.
- [203] Hermes-Lima, M.; Castilho, R.F.; Valle, V.G.; Bechara, E.J.; Vercesi, A.E. *Biochim. Biophys. Acta*, **1992**, *1180*, 201.
- [204] Demasi, M.; Penatti, C.A.; DeLucia, R.; Bechara, E.J. *Free Radic. Biol. Med.*, **1996**, *20*, 291.
- [205] Douki, T.; Onuki, J.; Medeiros, M.H.; Bechara, E.J.; Cadet, J.; Di Mascio, P. *FEBS Lett.*, **1998**, *428*, 93.
- [206] Monteiro, H.P.; Adbdalla, D.S.; Augusto, O.; Bechara, E.J. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1989**, *271*, 206.
- [207] Coto-Montes, A.; Zsizsik, B.K.; Hardeland, R. In *Actions and Redox Properties of Melatonin and Other Aromatic Amino Acid Metabolites*; Hardeland, R., Ed.; Cuvillier: Göttingen, **2001**; pp. 148-155.
- [208] Baran, H.; Staniek, K.; Kepplinger, B.; Gille, L.; Stolze, K.; Nohl, H. *Pharmacology* **2001**, *62*, 119.
- [209] Baran, H.; Staniek, K.; Kepplinger, B.; Stur, J.; Draxler, M.; Nohl, H. *Life Sci.*, **2003**, *72*, 1103.
- [210] Kawai, J.; Okuno, E.; Kido, R. *Enzyme*, **1988**, *39*, 181.
- [211] Noguchi, T.; Minatogawa, Y.; Okuno, E.; Nakatani, M.; Morimoto, M. *Biochem. J.*, **1975**, *151*, 399.

Received: November 11, 2007

Accepted: December 10, 2007