



UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

**DAÑO OXIDATIVO INDUCIDO POR TRES AGENTES CITOTOXICOS EN
ASTROCITOS DE RATA DE DIFERENTES EDADES**

T E S I S

Que para obtener el grado académico de Maestra en Biología Experimental

P R E S E N T A

Biol. Exp. Adriana Alarcón Aguilar

COMITÉ TUTORAL:

Dra. Mina Konigsberg Fainstein

Dr. Abel Santamaría Del Ángel

Dr. Julio Eduardo Roque Morán Andrade

México D.F., 28 de Junio de 2010

COMITÉ TUTORAL

INVESTIGADORES:

CODIRECTOR

Dra. Mina Konigsberg Fainstein
Investigador Titular C de Tiempo Completo
Universidad Autónoma Metropolitana -Iztapalapa
Depto. de Ciencias de la Salud
Laboratorio de Bioenergética y Envejecimiento Celular
Tel. (5255) 5804-4732
Fax: (5255) 5804 4727
e-mail: mkf@xanum.uam.mx

CODIRECTOR

Dr. Abel Santamaría Del Ángel
Investigador en Ciencias Médicas F de Tiempo Completo
Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía
Manuel Velasco Suárez
Dirección de Investigación
Lab. Aminoácidos Excitadores
Tel. (5255) 56063822 (ext.2013)
E-mail: absada@yahoo.com

ASESOR

Dr. Julio Eduardo Roque Morán Andrade
Investigador Titular C de Tiempo Completo
Instituto de Fisiología Celular
Universidad Autónoma de México
Departamento de Neurociencias
Tel. (5255) 56225616
E-mail: jmoran@ifc.unam.mx

Este trabajo fue realizado en:

- El Laboratorio de Bioenergética y Envejecimiento Celular del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa
- el Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México
- y el Laboratorio de Aminoácidos Excitadores del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía *Manuel Velasco Suárez*

La Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana - Unidad Iztapalapa está avalada como Posgrado de Alto Nivel en el Programa Nacional de Posgrado del CONACYT, con número de registro UAMI 309-0 y con la clave C/PFPN-2002-35-32

Durante el transcurso de mis estudios de Maestría se me otorgó una beca por parte de CONACYT, con el número de registro 230370.

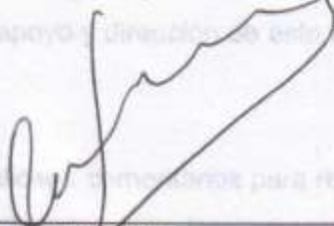
Los abajo firmantes, miembros del jurado, designados por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana - Unidad Iztapalapa, aprobaron la tesis titulada: "DAÑO OXIDATIVO PROVOCADO POR TRES AGENTES CITOTOXICOS EN ASTROCITOS DE RATA DE DIFERENTES EDADES". Fecha de examen el lunes 28 de Junio del 2010 a las 16:00pm

MIEMBROS DEL JURADO



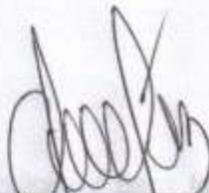
PRESIDENTE

Dr. Javier Velázquez Moctezuma
Departamento Biología de la Reproducción,
División de Ciencias Biológicas y de la Salud, UAM-I



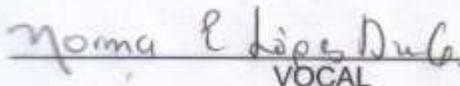
SECRETARIO

Dr. Julio Eduardo Roque Morán Andrade
Departamento de Neurociencias
Instituto de fisiología celular, UNAM



VOCAL

Dra. Anabel Jiménez Anguiano
Departamento Biología de la Reproducción,
División de Ciencias Biológicas y de la Salud, UAM-I



VOCAL

Dra. Norma Edith López Díaz-Guerrero
Depto. de Ciencias de la Salud
Laboratorio de Bioenergética y Envejecimiento Celular, UAM-I

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Mina, por creer en mí desde el principio, apoyarme siempre en todo momento y por su dirección en este trabajo.

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

Al Dr. Julio Morán por su ayuda y valiosos comentarios para realizar este trabajo.

A la Dra. Anabel por sus atinados comentarios en la escritura y su apoyo en este trabajo.

A La Dra. Norma por su ayuda incondicional para la escritura de este trabajo.

Al Dr. Javier por sus comentarios y su gran apoyo en este trabajo.

A La Dra. Rocío González Vieira por su apoyo en la realización de este trabajo.

DEDICATORIAS

A mí Mamá por ser un gran ejemplo de vida, por haberme enseñado a que todo se puede lograr y por su gran apoyo incondicional.

A mí Papá por su apoyo y sus enseñanzas de vida.

A mí Hermano Manu que siempre está conmigo en las buenas y en las malas.

A mí Tía Cande porque siempre me brinda su cariño y apoyo incondicional.

A mis primos Luby, Jonathan, Betito, Rodri, Sandy y Brenda por darme grandes momentos de alegría y cariño.

A mí amiga Viri por ser mi confidente y apoyarme en todos los momentos de mi vida.

A mis grandes amigos Cristobal, Pako, Jake y Mau por ser cómplices siempre de mi vida y brindarme su apoyo en las buenas y las malas.

A mí eterno novio Armando, por enseñarme a valorar la vida, por apoyarme en todo momento, hacerme siempre feliz, por proporcionarme fortaleza y por darme el mejor regalo de la vida!

INDICE

1. Introducción.....	15
1.1 Especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (ERO Y ERN).....	15
1.2 Enfermedad de Huntington.....	17
1.3 Enfermedad Alzheimer.....	21
1.4 Enfermedad de Parkinson.....	22
1.5 Glia Astrocitaria.....	24
2. Antecedentes.....	27
3. Justificación.....	30
4. Hipótesis.....	31
5. Objetivos.....	32
5.1 Objetivos Particulares... ..	32
6. Metodología.....	33
6.1 Animales.....	33
6.2 Aislamiento de Astrocitos.....	34
6.3 Tratamientos con los agentes tóxicos.....	35

6.4 Viabilidad Celular.....	35
6.5 Determinación de Funcionalidad Mitocondrial.....	35
6.6 Lipoperoxidación.....	36
6.7 Determinación de Proteínas.....	37
7.Resultados.....	38
7.1 Cultivos de Astrocitos.....	38
7.2 Control Positivo de Daño Oxidativo por Estrés Oxidativo.....	40
7.3 Efecto del Acido Quinolinico Sobre la Funcionalidad y Viabilidad Celular.....	41
7.4 Efecto de los Tres Agentes Tóxicos Sobre la Funcionalidad y Viabilidad Celular.....	45
7.5 - Efecto de los Tres Agentes Tóxicos Sobre la Lipoperoxidación y Oxidación Proteica	50
8. Resumen de Resultados.....	54
9.Discusión.....	55
10. Conclusión.....	67
11. Perspectivas.....	70
12. Anexo: Soluciones.....	71
13. Bibliografía.....	72

ABREVIATURAS

1-Metil-4- fenilpiridinio	MPP+
1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina	MPTP
Ácido Quinolinico	QUIN
Enfermedad de Alzheimer	EA
Enfermedad de Huntington	EH
Enfermedad de Parkinson	EP
Especies reactivas de nitrógeno	ERN
Especies reactivas de oxígeno	ERO
formación de Nódulos Neurofibrilares	NTF
N-metil- D-aspartato	NMDA
Nódulos neurofibrilares	NTF
Óxido nítrico	NO•
Oxido Nítrico Sintetasa	NOS
Oxígeno en singulete	¹ O ₂
Péptido β-amiloide	Abeta
Peróxido de Hidrógeno	H ₂ O ₂
Peroxinitrito	OONO-
Placas seniles	SP
Proteína precursora del péptido amiloide	PPA
Radical Hidroxilo	OH•
Radical Libre	RL
Sistema Nervioso	SN
Sistema Nervioso Central	SNC
Sistema Nervioso Periférico	SNP
Superóxido	O ₂ •-

RESUMEN

El envejecimiento se caracteriza por la acumulación de daños en las biomoléculas durante el transcurso de la vida de un individuo. Una gran cantidad de evidencias sugieren que existe una relación fisiológica entre las enfermedades neurodegenerativas y el envejecimiento. Entre las enfermedades con mayor importancia e incidencia están la enfermedad de Huntington (EH), la de Alzheimer (EA) y la de Parkinson (EP). Todas ellas se caracterizan por la pérdida gradual y funcional de las células neuronales y gliales. Se ha establecido una relación entre la muerte gradual de las células neuronales en estas enfermedades con eventos fisiológicos relacionados con el estrés oxidante o nitrosativo en el que principalmente se ha observado daño oxidativo en lípidos, proteínas y DNA. Un tipo celular del SNC muy relacionado con la respuesta antioxidante son los astrocitos los cuales pueden jugar un papel relevante en el desarrollo de dichas enfermedades. Por lo tanto, en este trabajo se estudió la participación de los astrocitos en la respuesta a un estado oxidante y se determinó si existía una respuesta diferencial debido a las diferencias de edades de las ratas de donde se obtuvieron los cultivos primarios de astrocitos. Para inducir el estado oxidante se utilizaron diferentes compuestos citotóxicos que se han empleado como modelos en el estudio de enfermedades neurodegenerativas, como lo son el ácido quinolinico (QUIN) para la enfermedad de EH, el péptido beta amiloide (Abeta) para el EA y el 1-Metil-4- fenilpiridinio (MPP+) para el EP. Se utilizó un modelo *in vitro* como lo son los cultivos primarios de astrocitos derivados de la corteza cerebral de ratas de diferentes edades (neonatos de 3 días y adultos de 9 meses). Los cultivos primarios de astrocitos fueron tratados con diferentes concentraciones

de los tóxicos, 250 μM para el QUIN, 50 μM para Abeta y 50 μM para MPP+, así como un control positivo a estrés oxidativo con una concentración de 100 μM de H_2O_2 . Los astrocitos fueron tratados durante 5 y 72 horas, posteriormente se evaluó el daño oxidativo a proteínas y lípidos, así como, la viabilidad y funcionalidad celular.

Nuestros resultados indican que los astrocitos procedentes de ratas adultas mostraron una menor resistencia a la toxicidad de QUIN, que los astrocitos provenientes de las ratas neonatas en tiempos prolongados de 72 h y que esta disminución se relaciona con un incremento de biomoléculas oxidadas. Por otra parte los resultados obtenidos con el citotóxico Abeta no muestran diferencias en ambos cultivos de astrocitos en los dos tiempos de exposición y por tanto la concentración es igualmente letal para ambos cultivos y que la toxicidad del Abeta es por inducción de estrés oxidativo. Finalmente se observó que los cultivos de astrocitos primarios provenientes de ratas adultas son más susceptibles al tóxico MPP+ que los de provenientes de ratas neonatas a tiempos cortos de exposición y que su toxicidad es induciendo estrés oxidativo.

ABSTRACT

Aging is characterized by the accumulation of damages in biomolecules during the organism lifespan. A large number of evidences suggest the existence of a physiological relationship between neurodegenerative diseases and aging. Huntington's (HD), Alzheimer's (AD) and Parkinson's (PD) diseases are among the most important ones. All of them are characterized by the gradual loss of neuronal and glial cells. It has been established an important correlation between the development of these diseases and oxidative and nitrosative stress, principally related to oxidative damage to DNA, lipids and proteins.

Apparently astrocytes play an important role in this phenomena. In this work astrocyte participation as a response to an oxidative state was studied in order to determine if there is a different reply in function of the organism age.

To induce the oxidative insult different cytotoxics that have been employed to mimic neuropathies were used. Kinolonic acid (QUIN) for AD, beta-amyloid (A β) for AD and 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP $^{+}$) for PD. Primary astrocytes derived from cortex of rats from two different ages (3 days and 9 months) were used. Astrocytes were treated with different concentrations of the toxics 250 μ M QUIN, 50 μ M A β and 50 μ M MPP $^{+}$; 100 μ M H $_2$ O $_2$ was used as a positive control. Astrocytes were treated for 5 or 72 h, viability and functionality, as well as oxidative damage to lipids and proteins were evaluated.

Our results indicated the astrocytes derived from adult rats showed a major susceptibility to QUIN toxic effect after long treatments (72 h). Our results related to Aβ did not show significant differences between the two age groups, while the only difference observed in relation to age was when functionality was assessed in response to MPP⁺ treatment, where the astrocytes isolated from adult rats were more susceptible, probably due to oxidative stress.

1. INTRODUCCIÓN

Existe una característica que la mayoría de los seres vivos tenemos en común y es que todos envejecemos. Cada especie tiene un ritmo y unas características de envejecimiento particulares, y aún dentro de una misma especie, diferentes tipos de organismos viven más que otros. La comprensión de los mecanismos precisos por los cuales ocurre el envejecimiento es uno de los grandes problemas aún no resueltos por la ciencia. Durante el desarrollo de las sociedades, el envejecimiento se ha entendido como un proceso normal, lento e irreversible, el cual se ha retrasado con el tiempo, ya que al aumentar la esperanza de vida en una comunidad se incrementa la población de edad avanzada. Una desventaja de aumentar el envejecimiento poblacional, es que también incrementan los niveles de riesgo de contraer alguna enfermedad neurodegenerativa (Harman y col., 2001).

Uno de los eventos que asocian el envejecimiento con las enfermedades neurodegenerativas es la presencia de radicales libres (RL), ya que el estrés oxidativo generado por un aumento en los RL y el daño que éstos ocasionan se ha relacionado a su vez con el establecimiento del envejecimiento y con la etiología de diferentes enfermedades neurodegenerativas asociadas con la edad.

La teoría del envejecimiento por RL sugiere que los daños irreversibles y la disminución en las funciones biológicas de los seres vivos son causadas principalmente por la acumulación del daño oxidativo en las biomoléculas como DNA, proteínas y lípidos (Harman y col., 1956).

1.1. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO Y DE NITRÓGENO (ERO Y ERN)

Los RL se pueden definir como átomos o moléculas que poseen uno o más electrones no apareados. Esta condición es químicamente muy inestable, lo que hace que los RL sean sumamente activos puesto que el electrón impar "busca desesperadamente otro electrón" para salir del desequilibrio atómico. Para ello, sustrae un electrón de cualquier molécula vecina; es decir, que oxida a la molécula, alterando su estructura y convirtiéndola a su vez en otro RL, y generando así una reacción en cadena (Leeuwenburgh y Heinecke, 2001).

A nivel fisiológico, los RL más importantes son los que surgen a partir del oxígeno. Este elemento es esencial para la vida, ya que desempeña una función importante como aceptor terminal de electrones durante la respiración celular en los organismos aerobios. Sin embargo, constituye el punto de partida para un tipo de daño celular generado por RL.

Como un ejemplo de un sistema metabólico que constantemente produce RL se puede nombrar a la cadena respiratoria mitocondrial, ya que las mitocondrias consumen el 90% del oxígeno celular, y de éste entre el 0.1 y el 0.5 % se transforma en lo que se conoce como especies reactivas de oxígeno (ERO).

Las ERO incluyen al oxígeno en singulete (1O_2), al superóxido ($O_2^{\bullet-}$), al peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y radical hidroxilo (OH^{\bullet}), siendo este último el más reactivo y puede reaccionar con la mayoría de las biomoléculas inactivando su función.

La toxicidad de H_2O_2 y $O_2^{\bullet-}$ es menor que la del OH^{\bullet} . En el caso del H_2O_2 esto se debe a la estabilidad de su enlace oxígeno-oxígeno, y en el caso del $O_2^{\bullet-}$ a que la carga negativa le impide atravesar las membranas, así como oxidar moléculas ricas en electrones (Imlay, 2003). El $O_2^{\bullet-}$ también puede reaccionar con radicales

como el óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$), generando peroxinitrito (OONO^-), que es precursor de otros potentes oxidantes que reciben el nombre de especies reactivas del nitrógeno (ERN) (Beckman, 1996). Por este motivo, la generación de ERO va inevitablemente unida a la producción de ERN (Halliwell, 1992). Un concepto muy importante es el de estrés oxidativo u oxidante, mismo que se da cuando existe un desequilibrio bioquímico propiciado por la producción excesiva de ERO y ERN que no pueden ser controladas por los sistemas antioxidantes, por lo que inducen daño a biomoléculas. Al estrés se le ha relacionado con una gran cantidad de enfermedades.

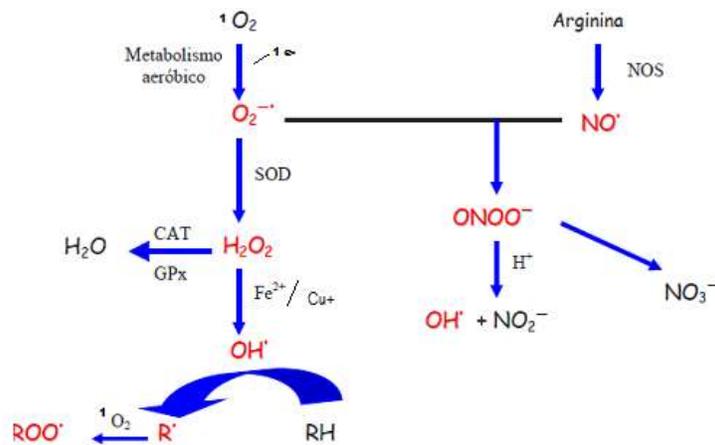


Figura 1. Esquema que representa la formación de especies reactivas

1.2 ENFERMEDAD DE HUNTINGTON (EH) Y MODELO

La enfermedad de Huntington (EH), llamada también corea de Huntington, recibe su nombre del griego *choreia*, o danza, que hace referencia al síntoma que originalmente servía para denominar la enfermedad: los movimientos “tipo danza” exagerados de las extremidades. También fue conocida antiguamente como baile de San Vito o mal de San Vito (Claire y col., 2008). Esta enfermedad hereditaria fue descrita por George Huntington en 1872, y hasta 1933 se descubrió que era una mutación genética la desencadenante de la patología. Ahora se sabe que la EH se produce mediante un único factor hereditario; es decir, es autosómica dominante y el gen responsable se localiza en el brazo corto del cromosoma 4, el cual contiene repeticiones expandidas del trinucleótido CAG (Schilling y col., 2004; Cepeda y col., 2010).

En la patogénesis de la EH se ha visto que existe una acumulación de una proteína conocida como huntingtina, la cual en condiciones basales se encuentra presente en bajas concentraciones en las células, aunque su función es desconocida hasta ahora. La patología se debe a una expansión de tripletes de CAG que codifican para la síntesis de una poliglutamina. La secuencia normal posee 34 repeticiones, y en la EH se han reportado más de 40. Aunque todavía no están establecidas completamente las bases fisiopatológicas de la enfermedad, se cree que esas acumulaciones de glutamina hacen que las proteínas interactúen entre sí de manera hidrofóbica y se facilite la formación de precipitados y acúmulos protéicos, especialmente en el cerebro (Kumar y col., 2010). La enfermedad de EH involucra el daño selectivo a neuronas espinosas estriatales en los ganglios basales; éstas son acumulaciones de cuerpos de células nerviosas

que se hallan cerca de la base del cerebro, dentro del telencéfalo, como parte del cuerpo estriado (Zuccato y Cattaneo, 2007).

Durante el desarrollo de esta neuropatía, ocurren episodios de demencia y movimientos involuntarios agudos relacionados al daño neuronal. Las manifestaciones de la EH comienzan en la edad media adulta del individuo (35 a 40 años) y su progreso es de casi 15 a 20 años, inhabilitando al paciente gradualmente hasta que los cuadros de disfagia (incapacidad para deglutir alimentos) son tan severos que la mayoría de los pacientes muere por inanición. Aunque la EH no se asocia directamente al envejecimiento, la edad es relevante puesto que no se sabe que es lo que hace que los síntomas aparezcan en un momento particular de la vida (Kent, 2004). Hasta ahora se sabe que el estrés oxidativo y nitrosativo están involucrados en la degeneración neuronal dado que diferentes sistemas antioxidantes endógenos se ven afectados desde etapas tempranas de la EH, de los cuales destaca la disminución de los niveles cerebrales de glutatión reducido (GSH) y el marcado déficit energético celular a través de la alteración de los complejos mitocondriales I y II. Lo anterior sugiere la formación de ERO y ERN, dando como resultado una alteración devastadora para las neuronas, aunque aún se desconoce la relación entre los eventos de daño oxidativo y la forma de selección de la muerte neuronal (Túnez y col, 2006).

Actualmente no existe un tratamiento efectivo para la EH, por lo que para su estudio se utilizan diferentes modelos experimentales, los cuales tratan de reproducir las características neuroquímicas e histopatológicas y en ellos se prueban nuevos tratamientos moleculares y farmacológicos. Entre los modelos farmacológicos más conocidos de esta enfermedad predominan los producidos

por la infusión intraestriatal a roedores y primates no humanos de diversos análogos de glutamato, entre los cuales se encuentra el ácido quinolínico (ácido 2,3-piridín-dicarboxílico o QUIN). El QUIN es un ácido dicarboxílico que se sintetiza de manera endógena, ya que es un metabolito derivado del triptofano que se forma en la vía de la kinurenina. El QUIN actúa como agonista glutamatérgico sobre los receptores para N-metil-D-aspartato (NMDA), y que en exceso es una excitotoxina conocida que produce daño oxidativo en el Sistema Nervioso. Una desventaja del uso del QUIN como modelo es que su administración no puede ser sistémica, teniendo que ser tópica debido a su limitada capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica. Sin embargo, una ventaja es su implicación directa como factor potencial causal de la enfermedad, ya que recientemente se ha demostrado que sus niveles corticales y estriatales, así como los de su precursor inmediato, la hidroxikinurenina, se encuentran aumentados de manera significativa en los cerebros de pacientes en etapas tempranas con EH (Guidetti y col.,2006).

Se sabe que el QUIN tiene la capacidad de modificar el contenido de algunos antioxidantes endógenos en el cerebro, como el de GSH, así como la actividad de la Cu/Zn-SOD, generando radicales libres $\text{OH}\cdot$ y formando complejos tipo hierro (II)-QUIN a través de la reacción de Fenton, produciendo un daño oxidativo al DNA y peroxidación lipídica, por lo que en etapas tempranas de toxicidad se ha demostrado su carácter pro-oxidante (Aguilera y col., 2007; Goda y col.,1996).



Figura 2.Representación de la reacción de Fenton

1.3 ENFERMEDAD DE ALZHEIMER (EA) Y MODELO

En la actualidad, la enfermedad de Alzheimer (EA) se conoce como la alteración neurodegenerativa más importante relacionada con la edad. Esta enfermedad se caracteriza por una pérdida sustancial y progresiva de la memoria y episodios agudos de demencia, ambos asociados a una degeneración y pérdida paulatina de neuronas, particularmente en la región límbica. Se ha descrito un incremento importante en la peroxidación de lípidos de membrana y un severo daño al DNA en etapas avanzadas de esta enfermedad (Yankner, 1996). Dentro de las características bioquímicas de la EA se incluyen anomalías en las transmisiones glutamatérgica, colinérgica, adrenérgica, serotoninérgica y dopaminérgica, además de la activación de vías inflamatorias, oxidativas y hormonales. El incremento en la lipoperoxidación y sus derivados (4-hidroxinonenal y malondialdehído) están directamente relacionados con la formación de nódulos neurofibrilares (NTF) y de las placas seniles (SP) que son características de la EA. A nivel molecular y celular, se conoce que la causa primordial del trastorno se relaciona con una acumulación aberrante del péptido β -amiloide (Abeta), el cual es el producto de la ruptura de la proteína precursora del péptido amiloide (PPA). Se ha propuesto que el péptido β -amiloide es el responsable de las alteraciones en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular, así como también es un candidato para explicar el origen de las ERO y la causa de la muerte celular (Mancuso y col., 2007). Cabe destacar que para el estudio de la EA existen diversos modelos; uno de ellos es el que emplea al péptido Abeta. Como se mencionó, el Abeta es el resultado del procesamiento proteolítico de la PPA por β - y γ -secretasas, mientras que la PPA de longitud completa parece jugar un papel fisiológico en el transporte axonal. Se ha

demostrado por medio de estudios experimentales con Abeta, tanto *in vivo* como *in vitro*, que el fragmento responsable de la neurotoxicidad y de diversas alteraciones celulares y mitocondriales es el fragmento de 25 a 35 residuos de aminoácidos. Por ende, el Abeta está implicado en el daño oxidativo y la neurotoxicidad (Wilcock y col., 2008).

1.4 ENFERMEDAD DE PARKINSON (EP) Y MODELO

La segunda enfermedad más común en las personas de la tercera edad es el Parkinson (EP), el cual se caracteriza por un deterioro gradual de neuronas que se localizan en la sustancia gris del cerebro y cuya función es sintetizar dopamina. La dopamina es el principal neurotransmisor usado por la vía nigroestriatal, y además puede actuar como una neurotoxina endógena cuando es sometida a la auto-oxidación u oxidación mediante la actividad de la enzima monoaminoxidasa (MAO, enzima importante en las etapas iniciales de la biotransformación metabólica de las catecolaminas e indolaminas), dando como resultado un amplia gama de eventos como el estrés nitrosativo y oxidativo. La muerte de una fracción de las neuronas de la sustancia gris presenta características apoptóticas, particularmente una condensación y fragmentación del DNA, tanto mitocondrial como nuclear. Como resultado de la deficiente comunicación dopaminérgica ocurren severas alteraciones tanto motoras como sensoriales. Se ha propuesto que la degeneración del sistema nigroestriatal se origina como resultado de una exposición elevada de estas neuronas a algunas ERO y ERN, en particular al H_2O_2 . La desaminación de la dopamina a 3,4-dihidroxifenilacetaldehído genera H_2O_2 , además de que la dopamina puede oxidarse espontáneamente formando quinonas, H_2O_2 y OH^\bullet (Jankovic y Stacy, 2007; Yankner, 1996). Por otro lado, se

ha detectado un incremento anómalo de hierro en las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra en pacientes con la EP, condición que favorece la reacción de Fenton, la cual, como ya vimos, produce radicales hidroxilo a partir de H_2O_2 . Se ha descrito además una disminución de GSH en pacientes con EP. El incremento de peróxidos asociados a la disminución de GSH provoca una pérdida parcial en el transporte de electrones de la cadena respiratoria mitocondrial de alrededor del 70 % con respecto a sus controles, dañando particularmente a los complejos mitocondriales II y IV de dicha cadena (Martin y col., 2004).

Uno de los modelos experimentales más estudiados para simular la EP es el producido por la toxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), un subproducto de la síntesis de la meperidina. Se sabe que el MPTP afecta la vía nigroestriatal, donde es convertido en su metabolito tóxico 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP+), el cual a su vez es capturado activamente por las mitocondrias de las neuronas dopaminérgicas y actúa como inhibidor de alta afinidad del complejo I mitocondrial, generando así una falla en el metabolismo energético. El transporte incompleto de electrones favorece la formación de ERO y ERN, y esto se ha relacionado con una disminución en los niveles de dopamina. Se ha observado en líneas celulares con baja actividad de catalasa, que hay un daño por MPP+, lo cual corrobora las evidencias de estrés oxidativo (Hashimoto y col., 2008).

1.5 GLIA ASTROCITARIA

El Sistema Nervioso Central (SNC) es un conjunto organizado de células que se comporta como un procesador de la información que recibe del medio ambiente y que elabora diferentes respuestas biológicas. El SNC está formado por dos tipos de células, las neuronas y las células gliales. Las neuronas se reconocen como los elementos celulares responsables del procesamiento de información del Sistema Nervioso (SN), gracias a una de sus propiedades fundamentales, la excitabilidad eléctrica, y constituye el sustrato biofísico de la codificación de la información neuronal. Las neuronas transfieren la información entre ellas a través de sinapsis, principalmente mediante la liberación desde la terminal presináptica de neurotransmisores; ésto representa la principal forma de comunicación en el SN. Las células gliales, constituidas por las células de Schwann en el Sistema Nervioso Periférico (SNP), y por astroglia, oligodendroglia y microglia en el SNC, representan otros tipos celulares fundamentales del SN (García-Marín y col., 2007).

En el caso de las células gliales, se ha estudiado su neuroanatomía desde el año de 1846, en el que aparecieron los trabajos de Rudolph Virchow, quien describió que la función de la astroglia era como aglutinante o pegamento; de ahí el significado en griego de glia del SN. Durante el último siglo, el conocimiento de la función de los astrocitos se han ampliado notablemente y se sabe actualmente que desempeñan funciones relevantes en numerosos aspectos del metabolismo, desarrollo y patologías del SN, siendo decisivos en el soporte trófico y metabólico neuronal (Azcoitia y col., 2001).

Los astrocitos representan la población de células gliales más abundante del

cerebro, constituyendo más del 50 % del total celular de la corteza cerebral. Los astrocitos juegan papeles activos en la fisiología cerebral, respondiendo a los neurotransmisores y modulando la excitabilidad neuronal y la función sináptica. En cuanto a su papel protector contra el daño por estrés oxidativo, se ha reportado que estas células contienen mayores concentraciones de GSH y de enzimas involucradas en el metabolismo de dicho péptido que las neuronas. Además, las células gliales son capaces de producir superóxido dismutasa (SOD) y secretarla al espacio extracelular. Se sabe que cuando las neuronas son cultivadas en presencia de astrocitos, se vuelven más resistentes a las lesiones inducidas por NO, O_2^- y H_2O_2 que cuando están solas.

Existen evidencias que apuntan que los efectos neuroprotectores de los astrocitos son mediados por la transferencia del GSH o sus precursores a las neuronas (Kahlert y Reiser, 2004; Takuma y col., 2004; Chen y Swanson, 2003). Ahora se sabe que ante cualquier deterioro del tejido nervioso, ya sea en situaciones de lesión neuronal, enfermedad o envejecimiento, la glía posee la capacidad de responder experimentando cambios morfológicos y funcionales de manera gradual y estereotípica, acompañados por la producción de citocinas proinflamatorias, lo que se denomina como "gliosis reactiva o glía activada". Se trata de una respuesta inflamatoria multifactorial que proporciona mecanismos de defensa frente a una gran diversidad de agresiones y que va dirigida a eliminar los agentes nocivos y a inhibir sus efectos perjudiciales. Al activarse, los astrocitos son capaces de migrar a los sitios de la lesión, donde proliferan y expresan moléculas co-estimuladoras que les permiten actuar como células presentadoras de antígeno, y además pueden adquirir un fenotipo fagocítico.

No obstante, a la par de la respuesta protectora, estas células astrogiales activadas producen una gran variedad de factores neurotóxicos y proinflamatorios que incluyen a las citocinas, metabolitos de los ácidos grasos y RL, por lo que a veces son capaces de amplificar la respuesta inflamatoria contribuyendo a exacerbar el daño (Hanisch, 2002; van Rossum y Hanisch, 2004; Ladeby y col., 2005; Kim y Vellis, 2005).

2. ANTECEDENTES

En los últimos años se ha estudiado ampliamente el papel que juega el estrés oxidativo (EO), ya sea directa o indirectamente, en la progresión de las enfermedades neurodegenerativas y el envejecimiento.

El cerebro es uno de los órganos más sensibles al EO, ya que posee un gran contenido de moléculas susceptibles a ser oxidadas como los ácidos grasos poli-insaturados y los neurotransmisores. Las neuronas son el tipo celular más susceptible al daño inducido por dicho estrés y es por ello que tradicionalmente la mayoría de las investigaciones que se han realizado en el campo han sido estudiando este tipo celular. Sin embargo, en los últimos años el rumbo de las investigaciones se ha dirigido hacia otro tipo celular muy importante, como los son los astrocitos, que además de ser la población glial más abundante en el cerebro, juegan un papel esencial en los mecanismos de defensa antioxidante (Peuchen y col., 1997; Darlington 2005).

Los astrocitos contienen niveles elevados de enzimas antioxidantes, y una de sus funciones es proteger a las neuronas del EO, una falla en sus funciones puede afectar negativamente la sobrevivencia de las neuronas. Estudios recientes muestran que la apoptosis de los astrocitos puede contribuir a la patogénesis de algunas enfermedades del cerebro (Kobayashi y col., 2002; Szydlowska y col., 2006), y los fármacos que logran inhibir el fenómeno de apoptosis pueden ofrecer una buena terapia para disminuir los efectos que favorecen a las enfermedades neurodegenerativas.

Entre algunos trabajos que se han realizado en este sentido se encuentra el de Chen Hui y col. (2008), en el cual cultivos primarios de astrocitos provenientes de ratas neonatas fueron tratados con el antioxidante Edavarona, logrando proteger a los astrocitos de la muerte neuronal y estimular el aumento en los niveles de GSH. Por ello se ha sugerido que los antioxidantes puedan ser utilizados para aumentar la capacidad de los astrocitos en contrarrestar el estrés oxidativo, así como para ejercer un papel protector sobre las neuronas.

El trabajo realizado por Braidy y col. en el 2008 en cultivos primarios de astrocitos humanos provenientes de fetos de 16 semanas, demostró el papel que juega el QUIN en la excitotoxicidad astrocitaria y su efecto sobre la producción de ERO, por el aumento en la actividad de la iNOS y la nNOS, incrementando la producción del radical NO•. Esto se ha relacionado con uno de los posibles mecanismos por los cuales el QUIN induce la muerte de los astrocitos. Por otra parte, Kim y col., en el 2001 ya habían demostrado la capacidad del Abeta para inducir daños oxidativos y disminuir la actividad de las enzimas antioxidantes en cultivos primarios de astrocitos de corteza de cerebro ratas neonatas, así como el efecto del extracto de *Bombycis corpus* sobre la activación de una respuesta adaptativa antioxidante en los astrocitos para contrarrestar el efecto del daño oxidativo inducido por el tóxico.

Por otro lado, se ha reportado que durante el envejecimiento disminuyen las defensas antioxidantes aumentando el EO de los astrocitos (García y col., 2010). Existen diversos estudios en donde se ponen a prueba este tipo celular, solo o en cocultivos con neuronas de rata o de líneas celulares de humano, con diferentes retos oxidativos en los que se estudian moléculas relacionadas con el proceso de

apoptosis (caspasa 3), así como también enzimas de defensa celular (GSH, NQO1 etc.) (Escartin y col., 2007). En estos estudios se encontró que las enzimas de defensa disminuyen considerablemente, lo cual provoca estrés oxidativo y muerte por apoptosis. Durante la activación de los astrocitos hay una alteración importante del transporte del glutamato, una inhibición del crecimiento axonal y la liberación de diversas moléculas, lo cual puede alterar la homeostasis neuronal, provocando una disfunción metabólica, y finalmente la muerte celular (Escartin y col., 2007; Kalman, 2004). En su conjunto, todos estos estudios indican que los astrocitos participan de manera activa en la homeostasis celular durante los diferentes procesos que ocurren dentro del SN.

Por todo lo anterior resulta relevante conocer el papel que juegan los astrocitos durante el desarrollo de condiciones degenerativas asociadas al envejecimiento; es decir, si responden igual o diferente ante los distintos estímulos agresores. En este trabajo se pretende analizar el efecto diferencial que pudieran ocasionar tres distintos tóxicos usados comúnmente como modelos farmacológicos de algunas enfermedades neurodegenerativas, en astrocitos obtenidos de animales de diferentes edades.

3. JUSTIFICACIÓN

El envejecimiento, aceptado como la acumulación de daños y la pérdida en la capacidad reparativa de las células y los tejidos a lo largo de la vida de un individuo, es un fenómeno multifactorial, por lo que resulta importante el tratar de entender cómo se desarrolla a nivel mecanístico con la inducción del estrés oxidante, lo cual permitirá diseñar alternativas terapéuticas experimentales y así disminuir el riesgo de adquirir nuevas enfermedades. Lo anterior es de suma relevancia en una sociedad como la nuestra, que se encuentra en una etapa de crecimiento, y que en algunos años más enfrentará la problemática de tener una población con un alto porcentaje de adultos mayores.

La relación que existe entre las enfermedades neurodegenerativas y el envejecimiento se ha estudiado en modelos animales, principalmente en los roedores. A nivel celular, la mayoría de los estudios se han centrado en las neuronas; sin embargo, otro modelo muy interesante pero poco estudiado son los cultivos primarios de astrocitos, ya que se ha comprobado que desempeñan un papel importante en muchos de los aspectos de la función del SN.

En este trabajo se utilizarán diferentes moléculas neurotóxicas para determinar como se afectan los astrocitos ante estos estímulos agresores durante dos distintas edades de un organismo, y poder así relacionarlo con el fenómeno del envejecimiento.

4. HIPÓTESIS

Puesto que los astrocitos participan activamente en la respuesta antioxidante en el SNC, y dado que la capacidad antioxidante disminuye con la edad, se espera que los astrocitos manifiesten una susceptibilidad y resistencia diferenciales frente al estrés oxidativo generado por diferentes agentes neurotóxicos en función de la edad del organismo del cual provienen.

5. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto citotóxico y el daño oxidativo generado por tres diferentes agentes neurotóxicos con perfiles mecanísticos distintos, en cultivos primarios de astrocitos provenientes de cerebro de ratas de dos diferentes edades.

5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Evaluar los cambios en la viabilidad celular de los cultivos primarios de astrocitos provenientes de corteza cerebral de ratas neonatas y adultas en respuesta al tratamiento con a los diversos agentes tóxicos (QUIN, Abeta y MPP+)
- ❖ Evaluar si existen cambios en la funcionalidad celular de los cultivos primarios de astrocitos provenientes de corteza cerebral de ratas neonatas y adultas en respuesta al tratamiento con a los tres agentes citotóxicos
- ❖ Evaluar el daño oxidativo sobre las biomoléculas inducido por la exposición a los diversos agentes citotóxicos sobre los cultivos primarios de astrocitos provenientes de corteza cerebral de ratas neonatas y adult

6. METODOLOGÍA

6.1 ANIMALES

Se utilizaron 25 ratas neonatas (cepa Wistar) de tres días de nacidas, y 25 ratas adultas de nueve meses de edad, todas de la cepa Wistar, las cuales fueron obtenidas del bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (UAM-I). Los animales se mantuvieron en condiciones estándar (temperatura ambiente, con un ciclo de luz normal y con libre acceso de comida y agua) y se manejaron de acuerdo a los criterios establecidos por la “Guía para el Cuidado de los Animales del Laboratorio” (Edición Mexicana auspiciada por la Academia Nacional de Medicina) y a la Norma Oficial Mexicana 062-ZOO-1999.

6.2 AISLAMIENTO DE ASTROCITOS

El cultivo primario de astrocitos se obtuvo de la corteza cerebral. Para ello, las ratas se sacrificaron por decapitación, se eliminó la piel y se extrajo el cerebro por la parte dorsal. El cerebro se colocó en 1 mL de solución 1 que contenía 5 mL de solución de Krebs, 45 mL de agua destilada, 0.3 % de albúmina sérica bovina, y 400 μ L de $MgSO_4$ al 3.8 %. Se realizó una disección fina, quitando meninges y vasos del cerebro. El fragmento del tejido se disgregó finamente con un bisturí. Se transfirió el tejido a 10 mL de la misma solución 1 y se centrifugó a 1,000 x g por un min a temperatura ambiente (TA). Se retiró el sobrenadante y se adicionaron 6 mL de la solución 2 que contenía 6.25 mL de la solución 0.026% de tripsina SIGMA T-4665 sobre el tejido, y se incubaron a 37° C durante 8 min. Se adicionaron 6 mL de de solución 4 para detener la reacción, la cual contenía 5 mL

de solución 1, 1 mL de solución 3 y 10 % de suero fetal bovino. se centrifugó a 1,000 x g por un min a TA y se retiró el sobrenadante. A continuación, se filtraron 2 mL de solución 3 que contenía 4.7 mL de la solución 1, 0.008% de DNAasa SIGMA D- S025, 40 μ L de $MgSO_4$ al 3.8 %, y 20 % de suero fetal bovino. Se disoció el tejido hasta que se obtuvo una suspensión homogénea al ser filtrada en una jeringa con malla. Se recuperó el filtrado y se depositó en una solución 5 que contenía 5 mL de la solución 1, 30 μ L de $MgSO_4$ al 3.8 %, 6 μ L de $CaCl_2$ al 1.2 %, y se centrifugó a 1,000 x g durante 6 min a 25°C. Se retiró el sobrenadante y disolvió el pellet en medio de cultivo. Se contaron las células y se sembraron en pozos de 1 cm. Al quinto día de sembrados, se les cambió el medio. Se cultivaron en medio MEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino al 0.11 %, glutamina, 0.15% de glucosa y 0.1 % de penicilina estreptomicina, para luego incubarse a 37° C y 5 % de CO_2 .

6.3 TRATAMIENTOS CON LOS AGENTES TÓXICOS

Se sembraron 3×10^5 células en placas multipozos de 1 cm de diámetro. Pasadas 24 h, se adicionaron diferentes concentraciones del agente tóxico a evaluar. Se determinó la viabilidad y la funcionalidad celular a 5 y 72 h posteriores al tratamiento. Se utilizaron concentraciones de 250 μM de QUIN, 50 μM de Abeta y 50 μM de MPP+.

6.4 VIABILIDAD CELULAR

La viabilidad celular se determinó contando los astrocitos vivos en los pozos a las 5 y 72 h posteriores al tratamiento. Las células se lavaron con PBS y se despegaron con tripsina-verseno al 0.1 %. Se tomó una alícuota de 20 μL de suspensión y se contaron las células utilizando un hemocitómetro y un microscopio de contraste de fase; se contaron 4 campos por determinación.

6.5 DETERMINACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD MITOCONDRIAL (ENSAYO MTT)

Esta técnica se utilizó para evaluar la actividad mitocondrial indirectamente (Mosman, 1983). El principio se basa en la reducción del compuesto MTT (3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio) por medio de la transferencia de electrones a través del complejo II o succinato deshidrogenasa de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Para realizar el ensayo se sembraron 3×10^5 astrocitos en pozos de 1cm, se aplicaron los tratamientos para cada uno de los experimentos descritos anteriormente, se les retiró el medio para cada tratamiento

y se lavaron con PBS. Se adicionaron 100 μ L de MTT (0.5 mg/mL) a un pH de 7.5. Las células se incubaron durante 3 h a 37°C. Se retiró el MTT y se agregaron 80 μ L de solución de extracción (HCl 0.04 M en isopropanol) a cada pozo. Las placas de cultivo se colocaron sobre un plato de agitación (Thermolyne AROS 160) durante 15 min a temperatura ambiente para disolver el formazan. El contenido de cada pozo se determinó midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 560 nm en un espectrofotómetro (Beckman DU 640). El valor del fondo se cuantificó a 630 nm, y se restó a la determinación anterior. La funcionalidad mitocondrial se determinó como densidad óptica (D.O.) por número de células, y los resultados se presentaron normalizados.

6.6 LIPOPEROXIDACIÓN (TBA-RS)

Una vez determinada la concentración y el tiempo de exposición en la cual se induce la muerte de los astrocitos, se evaluó la lipoperoxidación en cada uno de los tratamientos con QUIN, Abeta y MPP+. Se sembraron 3×10^5 de células, se aplicó cada tratamiento, se lavaron con PBS y se despegaron las células con un gendarme; posteriormente se adicionaron 500 μ L del reactivo TBA (ácido tiobarbitúrico, ácido tricloroacético y 2.54 mL de ácido clorhídrico), y se incubó la muestra durante 20 min a 94 ° C. Posteriormente, se incubaron sobre hielo durante 5 min y se centrifugó a 3,000 x g durante 5 min. Se recuperó el sobrenadante y se cuantificó en un espectro el producto de la reacción con TBA a 532 nm. El precipitado se lavó con PBS hasta eliminar la acidez, y se cuantificó la concentración de proteínas por medio de la técnica de Bradford. Los resultados se expresaron en nmol de TBA-RS/mg de proteína. Las concentraciones fueron calculadas con una curva de malondialdehído (MDA), la cual llevó el mismo

procesamiento que la muestra.

6.7 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS OXIDADAS

Esta determinación se llevó a cabo en las mismas condiciones antes determinadas. Para ello, se sembraron 5×10^5 células y se les aplicaron los mismos tratamientos; posteriormente, se lavaron las células con PBS y se despegaron con gendarme. Se recuperaron las células y se resuspendieron en 200 μ L del buffer de lisis M-per, el cual está suplementado con inhibidor de proteasas (DTT y PMSF). Se incubaron 15 min en hielo y posteriormente se centrifugaron a 14,000 x g durante 5 min; se recuperó el sobrenadante y se cuantificaron las proteínas por medio de la técnica de Bradford. A partir de 50 μ g de proteína, se determinaron los niveles de proteína oxidada con el kit oxy-blot, y se siguieron las especificaciones del proveedor.

Análisis estadístico

Para el tratamiento estadístico de los ensayos de viabilidad celular, funcionalidad celular y ensayos de oxidación de las biomoléculas se utilizó la prueba paramétrica ANOVA con una prueba de comparaciones múltiples Bonferroni con los niveles de confianza: $p < 0.05$, $p < 0.01$ y $p < 0.001$.

7. RESULTADOS

7.1 CULTIVO PRIMARIO DE ASTROCITOS

Se establecieron los cultivos primarios de astrocitos provenientes de la corteza cerebral de ratas de 3 días de nacidas, así como de ratas de 9 meses de edad; se identificó el cultivo por medio de microscopía óptica, en donde se observó la morfología típica de los astrocitos provenientes de cultivos de neonatos y adultos, como se puede observar en la Figura 1.

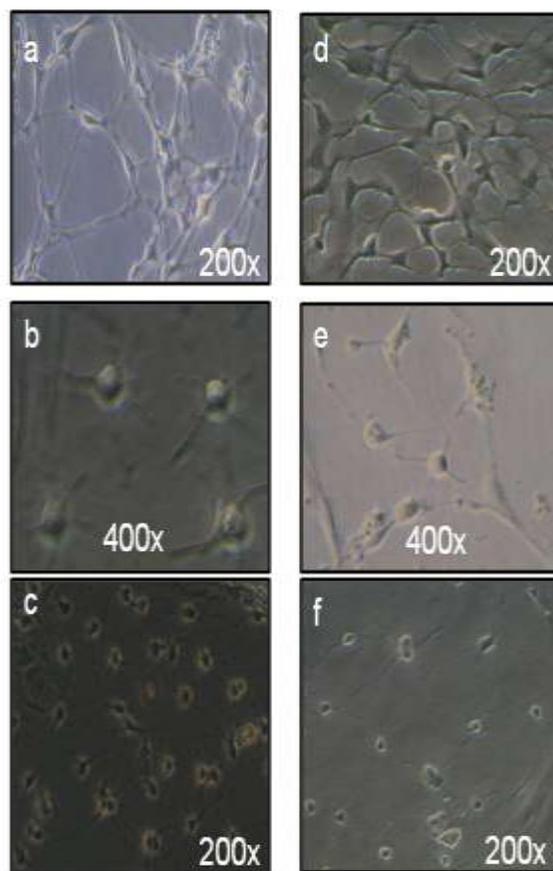


FIG.1 Microscopía óptica de cultivos primarios de astrocitos provenientes de ratas de 3 días de nacidos (a, b y c) y 9 meses de edad (d, e y f)

Para confirmar que las células aisladas eran efectivamente astrocitos, se realizó una inmunocitoquímica para identificar la presencia de la proteína glial fibrilar ácida (GFAP), que es un componente del citoesqueleto (filamentos intermedios) de los astrocitos, el cual no se encuentra en otros tipos celulares que componen el tejido nervioso. Como se puede observar en la Figura 2, los astrocitos fueron identificados por el fluorógeno fluoresceína acoplado al anticuerpo secundario que reconoce al anticuerpo primario de la proteína GFAP, y de esta manera se pudo determinar la presencia de astrocitos en el cultivo; con ello se establecieron y se aseguraron las condiciones para obtener el cultivo primario.

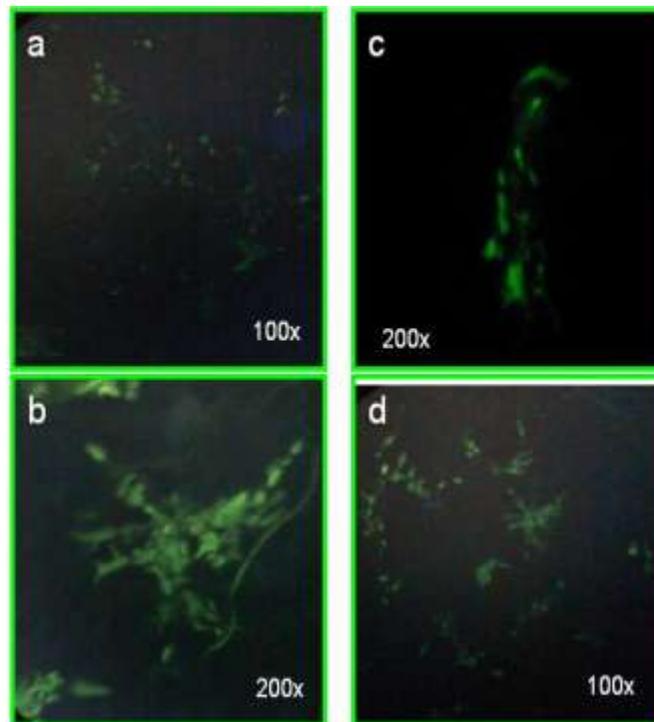
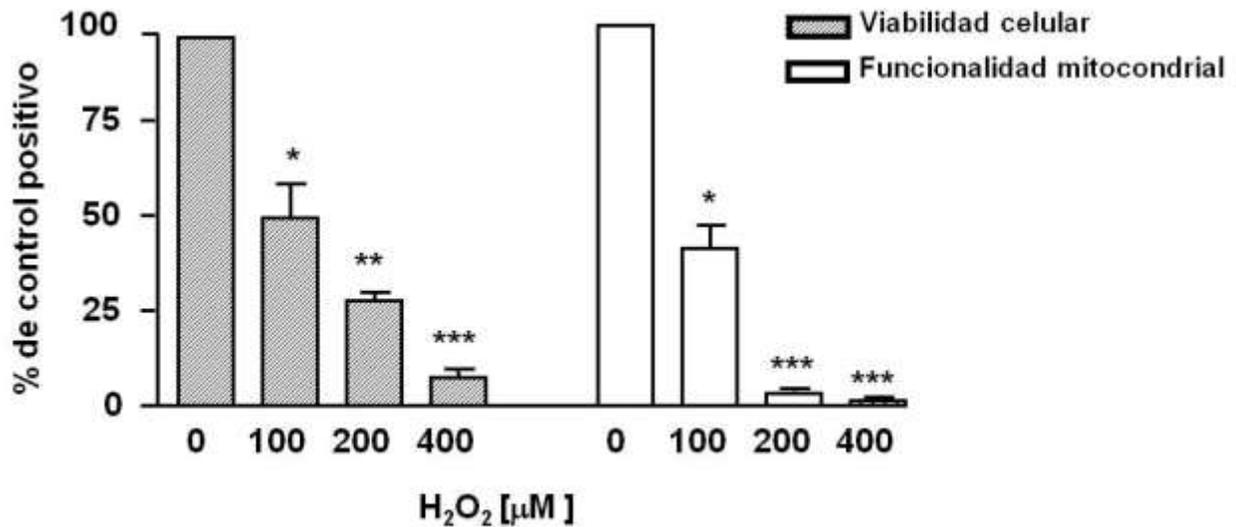


FIG.2 Microscopia de Fluorescencia de GFAP para identificar cultivos primarios de astrocitos provenientes de rata de 3 días de nacidos (a y b) y 9 meses de edad (c y d)

7. 2 CONTROL POSITIVO DE DAÑO POR ESTRÉS OXIDATIVO

Con la finalidad de disponer de un control positivo de daño a los astrocitos cuando el estrés oxidativo es severo, se trataron a los cultivos de astrocitos de neonatos con diferentes concentraciones de H_2O_2 (100, 200 y 400 μM) durante 1 h. En la Gráfica 1 se puede observar que el número de células disminuye en todos los tratamientos, encontrándose una viabilidad de 49 % para el tratamiento de 100 μM , 27 % para el de 200 μM , y 7 % para los tratados con 400 μM de H_2O_2 . En todos los casos se encontró una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control y entre los mismos tratamientos. Así mismo, se observó que la funcionalidad celular disminuía a 41 % para el tratamiento de 100 μM , y básicamente no se observó funcionalidad celular alguna a las concentraciones mayores: 3 % para el tratamiento de 200 μM y 1% para el de 400 μM . Todos los tratamientos fueron estadísticamente diferentes con respecto al Control.

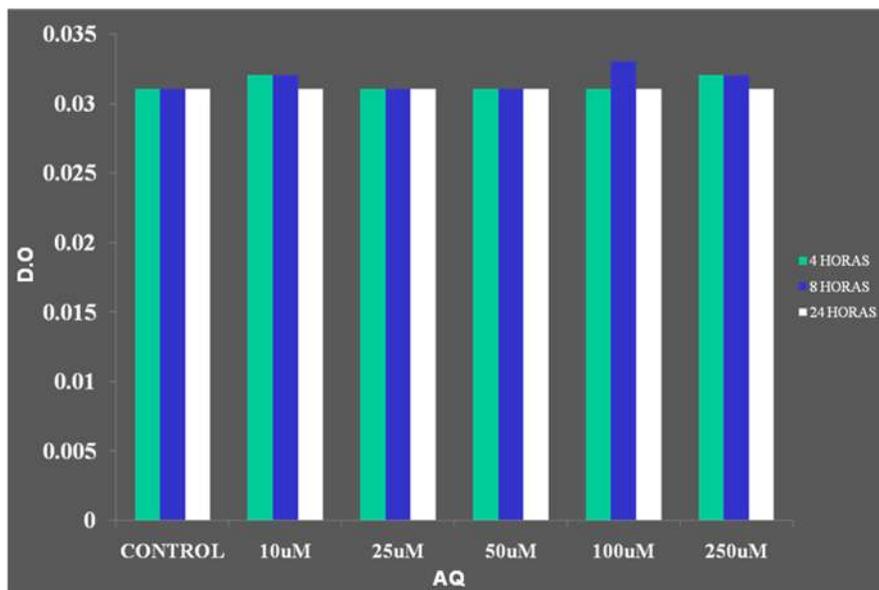
Como el tratamiento con la concentración de 100 μM de H_2O_2 por 1 h presentó una viabilidad de 49 % y una funcionalidad de 41 %, se decidió emplear esta condición como Control pro-oxidante para los siguientes experimentos.



GRÁFICA 1. **Determinación de viabilidad y funcionalidad mitocondrial Celular** en cultivos primarios de astrocitos de corteza cerebral de ratas neonatas expuestos a diferentes concentraciones de H₂O₂ (100, 200 y 400 uM) en un tiempo de exposición de 1 h. Promedios de 3 experimentos independientes por triplicado. Las diferencias observadas con \pm SD evaluados con una prueba de ANOVA y una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni con una $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$ y $p < 0.001^{***}$.

7.3 EFECTO DEL QUIN SOBRE LA FUNCIONALIDAD Y VIABILIDAD CELULAR

Como una primera aproximación experimental (control positivo de daño), se evaluó la funcionalidad celular en los cultivos primarios de astrocitos provenientes de individuos neonatos, al ser tratados con concentraciones crecientes de QUIN, nuestro tratamiento de elección para estimar los primeros índices de toxicidad idóneo por su perfil neurotóxico. En la Gráfica 2 se observa que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas cuando se expusieron los cultivos primarios de astrocitos a las concentraciones de 10, 25, 50, 100 y 250 μ M de QUIN durante ninguno de los tiempos de exposición, que fueron 4, 8 y 24 h. Cabe aclarar que estas concentraciones se tomaron de los estudios que tradicionalmente se realizan es neuronas.



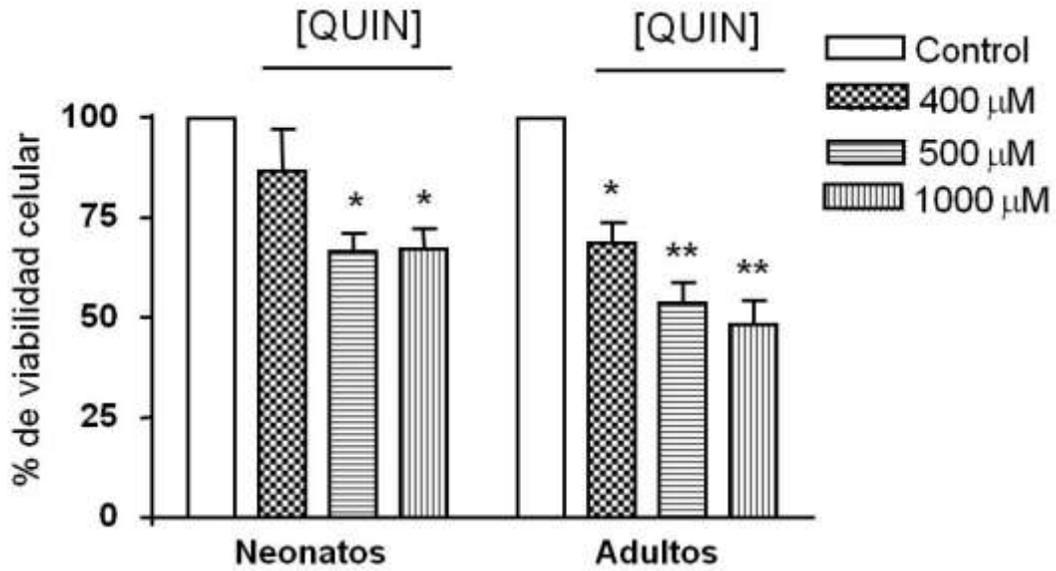
GRÁFICA.2 Determinación de la Funcionalidad Mitocondrial en cultivos primarios de astrocitos de corteza cerebral de ratas neonatas expuestos a diferentes concentraciones de QUIN (10,25, 50, 100, 250 μM) a diferentes tiempos 4, 8 y 24 h. Las diferencias observadas con \pm SD evaluados con una prueba de ANOVA $p < 0.05$.

Puesto que no se encontraron efectos con las primeras concentraciones probadas, se decidió incrementar las concentraciones. Para ello, se trató a los cultivos de neonatos con concentraciones más altas de QUIN, como son 400, 500 y 1000 μM , durante un tiempo prolongado de 72 h; se determinó tanto la viabilidad como la funcionalidad celular.

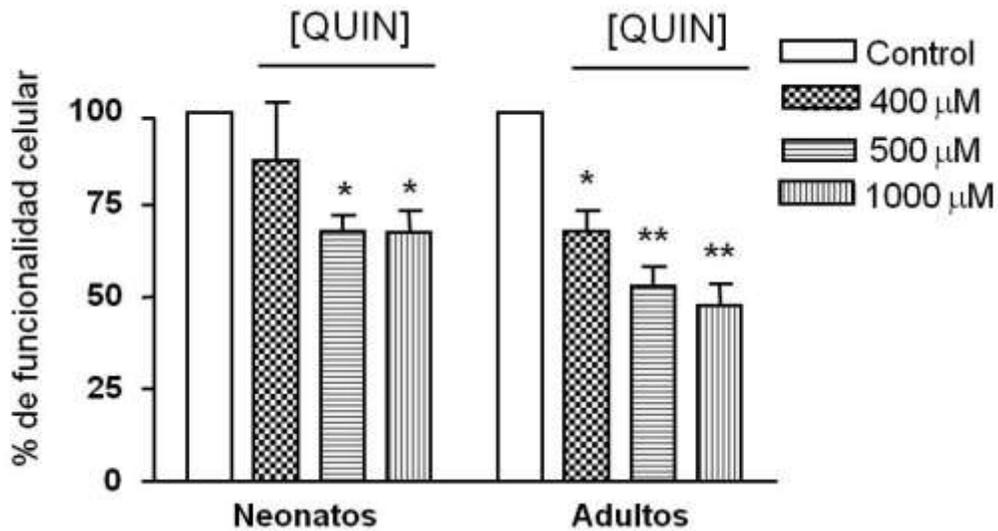
Se puede observar en la Gráfica 3 que la viabilidad celular fue de 80 % para las células tratadas con 400 μM de QUIN, de 68 % para las tratadas con 500 μM , y de 69 % para las tratadas con 1000 μM , siendo estadísticamente diferentes con respecto al control sólo los tratamientos de 500 y 1000 μM . Cuando se realizaron los mismos experimentos en los cultivos primarios de astrocitos provenientes de ratas adultas, se encontró que la viabilidad celular fue de 69 % para las tratadas

con 400 μM , 50 % para las tratadas con 500 y 47 % para las tratadas con 1000 μM . Todos los tratamientos fueron estadísticamente diferentes con respecto al Control ($P < 0.001$), y los tratamientos de 500 y 1000 μM fueron estadísticamente diferentes con respecto a los cultivos primarios de astrocitos neonatos.

En cuanto a la funcionalidad celular a las 72 h (Gráfica 4), en los cultivos primarios de neonatos se encontró que ésta fue de 79 % para el tratamiento con 400 μM , 69 % para el de 500 μM , y 70% para el de 1000 μM de QUIN, presentando diferencias estadísticamente significativas con respecto al Control pro-oxidante únicamente las dos concentraciones mayores. Cuando se analizaron los cultivos primarios de ratas adultas, se observó una funcionalidad de 68 % para el tratamiento de 400 μM , 50 % para el de 500 μM , y 47 % para el de 1000 μM , presentando todos los tratamientos diferencias estadísticamente significativas con respecto a su Control. Al igual que en la viabilidad celular, únicamente los dos tratamientos de concentraciones mayores fueron diferentes con respecto a los cultivos primarios de neonatos con las mismas concentraciones. Sin embargo, en lo sucesivo se decidió no usar concentraciones tan altas, ya que carecen de relevancia fisiológica, por lo que en los siguientes experimentos, la concentración de QUIN empleada fue de 250 μM , que es la concentración máxima que aún guarda una relevancia fisiopatológica.



GRÁFICA 3. **Determinación de la Viabilidad Celular** en cultivos primarios de astrocitos de corteza cerebral de ratas neonatas y adultas por un tiempo de exposición de 72 h. Los promedios representan tres experimentos independientes por triplicado c/u. Las diferencias observadas con \pm SD evaluados con una prueba de ANOVA y una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni con una $p < 0.05^*$ y $p < 0.01^{**}$.



GRÁFICA 4. **Determinación de la Funcionalidad Celular** en cultivos primarios de astrocitos de corteza cerebral de ratas neonatas y adultas por un tiempo de exposición de 72 h. Promedios de 3 experimentos independientes por triplicado. Las diferencias observadas con \pm SD evaluados con una prueba de ANOVA y una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni con una $p < 0.05^*$ y $p < 0.01^{**}$.

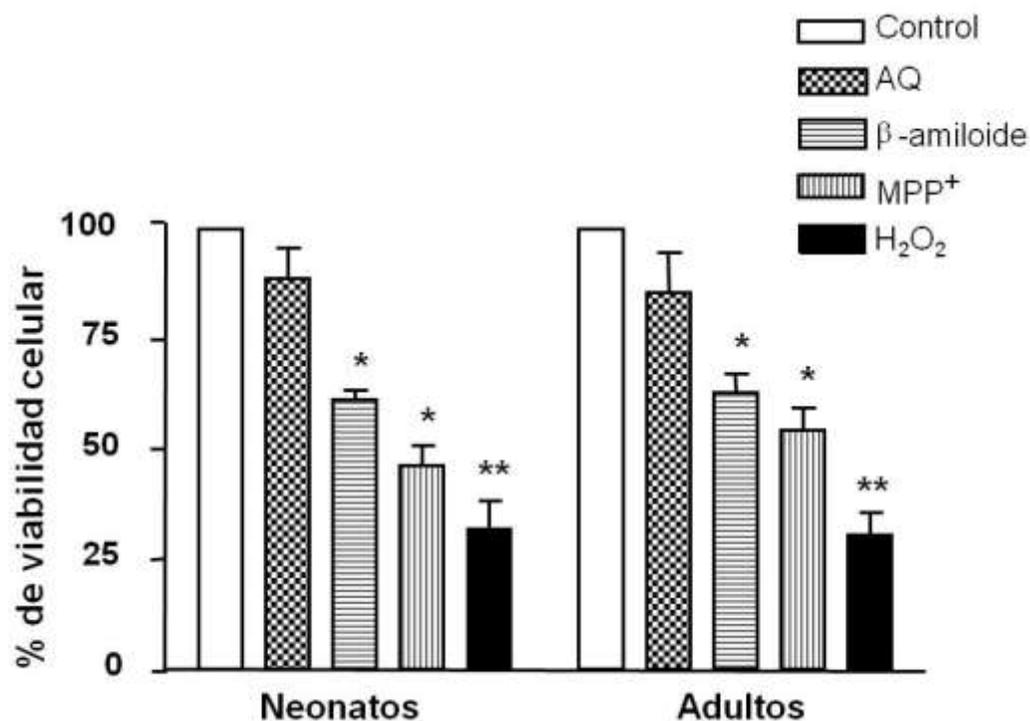
7.4 EFECTO DE LOS TRES AGENTES TOXICOS SOBRE LA FUNCIONALIDAD Y VIABILIDAD CELULAR

Se determinaron los cambios en la viabilidad y funcionalidad celular de los cultivos primarios de astrocitos provenientes de ratas neonatas y adultas en función del tratamiento con los agentes citotóxicos: QUIN (250 μ M), Abeta (50 μ M) y MPP+ (50 μ M). Se decidió utilizar la concentración de 250 μ M puesto que es la concentración más alta que aún se considera dentro del rango fisiopatológico; las concentraciones de los otros dos tóxicos se emplearon de acuerdo a los reportes bibliográficos descritos con anterioridad. Todos los tratamientos fueron realizados a corto (5 h) y a largo plazo (72 h).

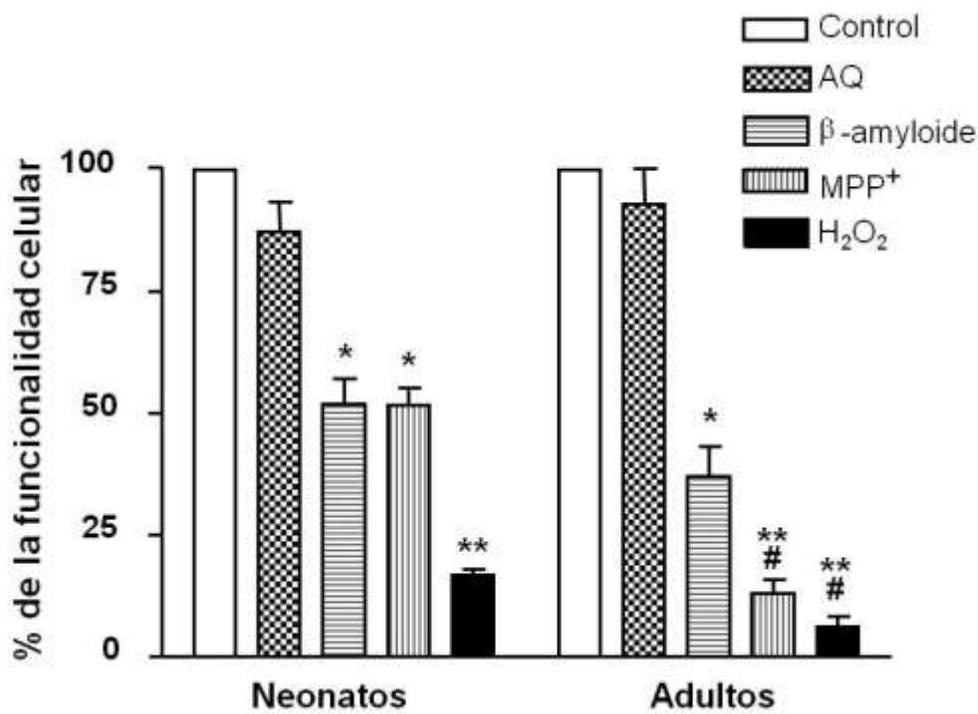
En la Gráfica 5 se muestran los resultados de viabilidad celular de los astrocitos tratados por 5 h. Solo se encontraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control para los astrocitos expuestos con los retos tóxicos con Abeta y MPP+, tanto en los cultivos primarios de adultos como en los de neonatos, al igual que su Control oxidativo (100 μ M durante 1 h). En el caso del tratamiento con Abeta, se encontró que la viabilidad después del tratamiento fue de 61 % en neonatas y 63 % para el caso de adultos, mientras que la viabilidad en el tratamiento con MPP+ disminuye a 46 y 54 % en neonatos y adultos, respectivamente. También se observa que no hay diferencias significativas entre las distintas edades. Así mismo, se observa que no hay diferencias estadísticamente significativas en los tratamientos con QUIN, ya que se encontraron valores de 89 % para los cultivos de neonatos y 85 % para adultos, ambos comparados con respecto a su Control pro-oxidante.

En la Gráfica 6 se determinó la funcionalidad celular de los cultivos frente a los diferentes citotóxicos durante 5h. Se observa que no hay una disminución estadísticamente significativa en el tratamiento con QUIN, comparándolo con el Control (87 % para los neonatos y 93 % para los adultos); sin embargo, las células tratadas con los otros tóxicos si presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al Control (52 % para los neonatos y 37 % para los adultos en el tratamiento con el Abeta y una funcionalidad del 51 % para los neonatos y 13 % para los adultos tratados con MPP+).

Al comparar la funcionalidad en los cultivos de las dos diferentes edades, únicamente los astrocitos tratados con MPP+ mostraron diferencias estadísticamente significativas.



GRÁFICA 5. **Determinación de la Viabilidad Celular** en cultivos primarios de astrocitos de corteza cerebral de ratas neonatas y adultas por un tiempo de exposición de 5 h. Promedios de 3 experimentos independientes por triplicado. Las diferencias observadas con \pm SD evaluados con una prueba de ANOVA y una prueba de comparaciones multiples de Bonferroni con una $p < 0.05^*$ y $p < 0.01^{**}$.

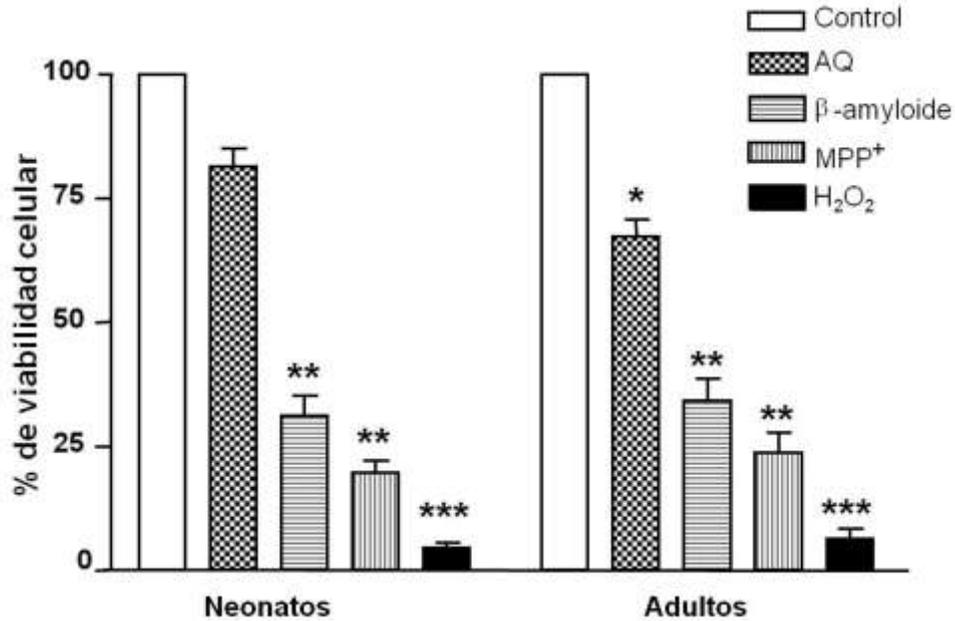


GRÁFICA 6. Determinación de la Funcionalidad Celular en cultivos primarios de astrocitos de corteza cerebral de ratas neonatas y adultas por un tiempo de exposición de 5 h. Promedios de 3 experimentos independientes por triplicado. Las diferencias observadas con \pm SD evaluados con una prueba de ANOVA y una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni con una $p < 0.05^*$ y $p < 0.01^{**}$

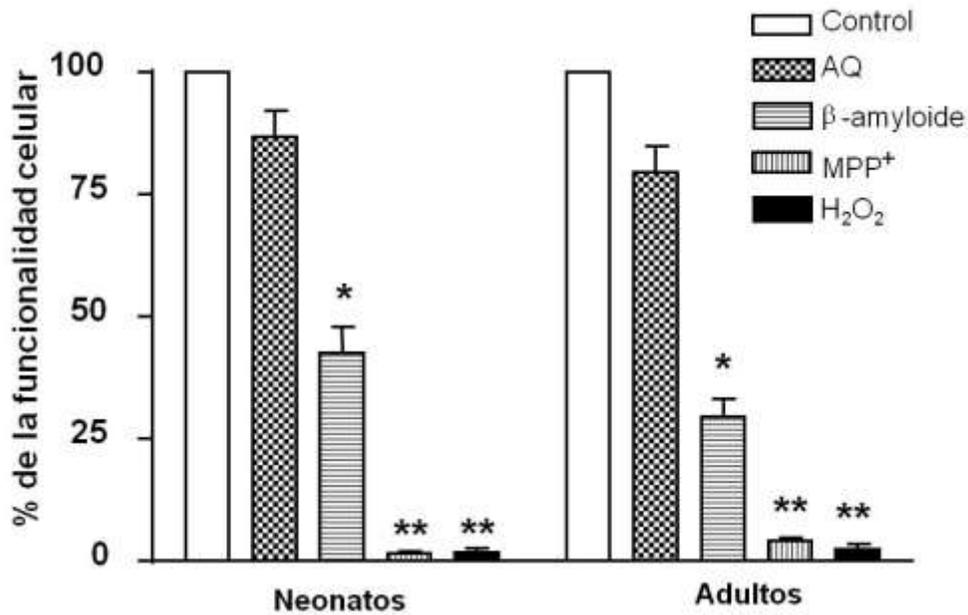
A continuación en las graficas 7 y 8 se observan los resultados obtenidos para determinar el porcentaje de viabilidad y funcionalidad celular ante una exposición tóxica de Abeta, MPP+ y QUIN en los cultivos primarios de astrocitos de ratas recién nacidas y adultas durante un tiempo de 72 h. Al determinar la viabilidad se observaron diferencias estadísticamente significativas en el caso de los neonatos con respecto a su Control para los tratamientos con los tóxicos MPP+ y Abeta, siendo la viabilidad de 19 y 31 %, respectivamente. El tratamiento con QUIN presentó una viabilidad de 81 % que no fue diferente estadísticamente de su

Control pro-oxidante.

En el caso de los astrocitos provenientes de los organismos adultos, se encontró una diferencia estadísticamente significativa con respecto al Control en el caso de los tres tóxicos: el tratamiento con QUIN presentó una viabilidad de 67 %, el tratamiento con Abeta de 34 %, y del 23 % para el tratamiento con MPP+, como se puede observar en la Gráfica 7. Al evaluar la funcionalidad celular con los diferentes tratamientos citotóxicos en los dos cultivos, pudimos observar que en los cultivos primarios provenientes de ratas neonatas se observaron funcionalidades de 86 % para el QUIN, 42 % para el Abeta y 1 % para el MPP+, siendo diferentes estadísticamente únicamente los tratamientos con Abeta y MPP+. En el caso de los cultivos primarios provenientes de ratas adultas, se observó que la funcionalidad celular fue de 79 % para el tratamiento con QUIN, 29 % para el de Abeta y 4% para el de MPP+, presentando diferencias estadísticamente significativas con respecto a su Control los últimos dos tratamientos, como se puede observar en la Gráfica 8.



GRÁFICA 7. Determinación de la Viabilidad Celular en cultivos primarios de astrocitos de corteza cerebral de ratas neonatas y adultas por un tiempo de exposición de 72 h. Promedios de 3 experimentos independientes por triplicado. Las diferencias observadas con \pm SD evaluados con una prueba de ANOVA y una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni con una $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$ y $p < 0.001^{***}$.



GRÁFICA 8. Determinación de la Funcionalidad Celular en cultivos primarios de astrocitos de corteza cerebral de ratas neonatas y adultas por un tiempo de exposición de 72 h. Promedios de 3 experimentos independientes por triplicado. Las diferencias observadas con \pm SD evaluados con una prueba de ANOVA y una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni con una $p < 0.05^*$ y $p < 0.01^{**}$.

7.5 -EFECTO DE LOS TRES AGENTES TOXICOS SOBRE LA OXIDACIÓN DE LÍPIDOS Y PROTEÍNAS

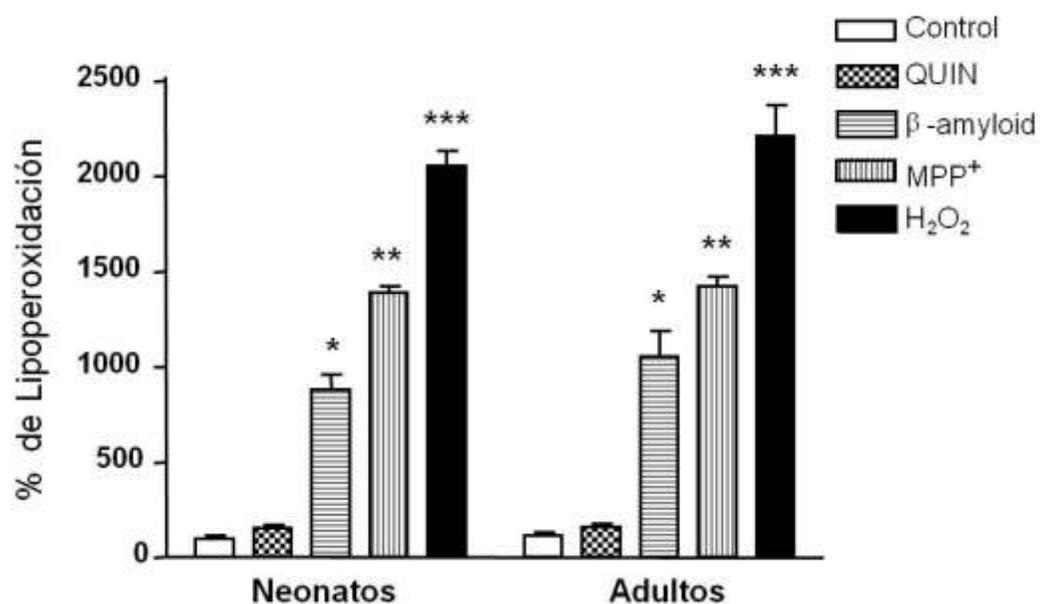
En las Gráficas 9 y 10 se muestran los resultados obtenidos de la evaluación del daño oxidativo a lípidos en cultivos primarios de astrocitos provenientes de neonatos y adultos, el cual fue inducido por la exposición de todos los citotóxicos QUIN, Abeta y MPP+ con las concentraciones antes mencionadas durante 5 y 72 h de exposición y un Control positivo de H₂O₂. En la Gráfica 9 se puede observar el incremento en la oxidación de lípidos con respecto al Control, siendo 1.1 veces para el tratamiento con QUIN, 9 veces para el Abeta y 14 veces para el MPP+, presentando una diferencia estadísticamente significativa con respecto al Control pro-oxidante únicamente los tratamientos con Abeta y MPP+ en los cultivos de neonatos durante 5 h.

Con respecto a los cultivos primarios de astrocitos provenientes de ratas adultas se observó un incremento en la lipoperoxidación con respecto al control de 1.15 veces para el tratamiento con QUIN, 10 veces para el Abeta y 14 veces para el MPP+, presentando una diferencia estadísticamente significativa los tratamientos con Abeta y MPP+. Los tratamientos con los diferentes citotóxicos no presentan diferencias estadísticamente significativas en la lipoperoxidación cuando se comparan los resultados obtenidos de los cultivos primarios de ratas adultas contra los obtenidos de ratas neonatas tratados durante 5 h.

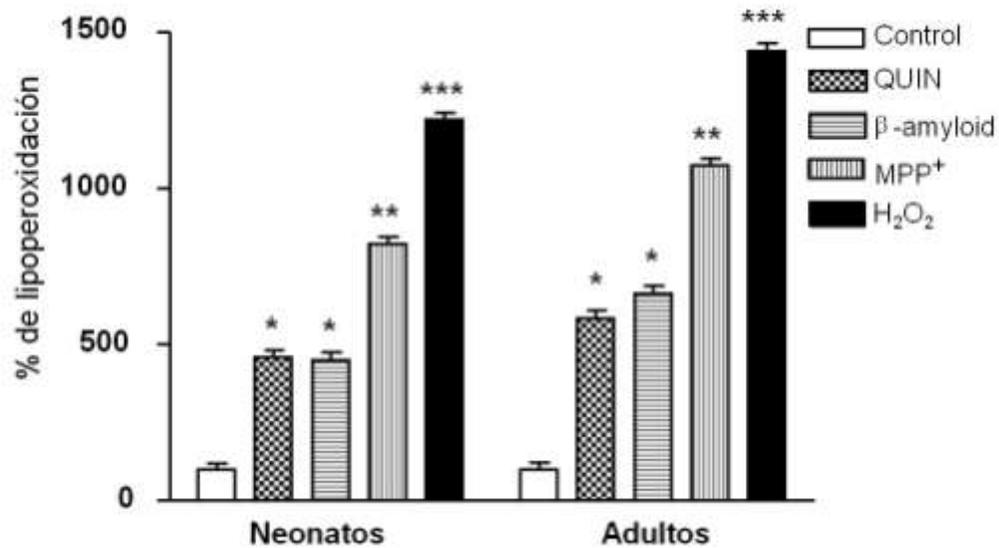
En la Gráfica 10 se observa que el aumento en la lipoperoxidación con respecto al Control al ser tratadas por 72 h fue de 4 veces para el QUIN, al igual que para el Abeta, y 7 veces para el MPP+ en los cultivos primarios de ratas neonatas, presentando todos diferencias estadísticamente significativas con respecto al

Control, mientras que la lipoperoxidación observada en los cultivos primarios de astrocitos provenientes de ratas adultas se incrementó en 5.5 veces para el tratamiento con QUIN, 6 veces para el de Abeta y 10 veces para el de MPP+. Todos los tratamientos a las 72 h presentan diferencias estadísticamente significativas con respecto a su Control pro-oxidante.

Al comparar la lipoperoxidación observada en ambos cultivos con todos los citotóxicos durante 72 h se observa que los tratamientos con Abeta y MPP+ fueron los únicos que presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de edad.



GRÁFICA 9. Lipoperoxidación (TBARS) en cultivos primarios de astrocitos de corteza cerebral de ratas neonatas y adultas por un tiempo de exposición de 5 h. Promedios de 3 experimentos independientes por triplicado. Las diferencias observadas con \pm SD evaluados con una prueba de ANOVA y una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni con una $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$ y $p < 0.001^{***}$.



GRAFICA 10. **Lipoperoxidación (TBARS)** en cultivos primarios de astrocitos de corteza cerebral de ratas neonatas y adultas por un tiempo de exposición de 5 h. Promedios de 3 experimentos independientes por triplicado. Las diferencias observadas con \pm SD evaluados con una prueba de ANOVA y una prueba de comparaciones multiples de Bonferroni con una $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$ y $p < 0.001^{***}$.

En las Figuras 3 y 4 se muestran imágenes de membranas representativas donde se observan los resultados del ensayo de oxidación de proteínas en los cultivos primarios de astrocitos provenientes de neonatos y adultos.

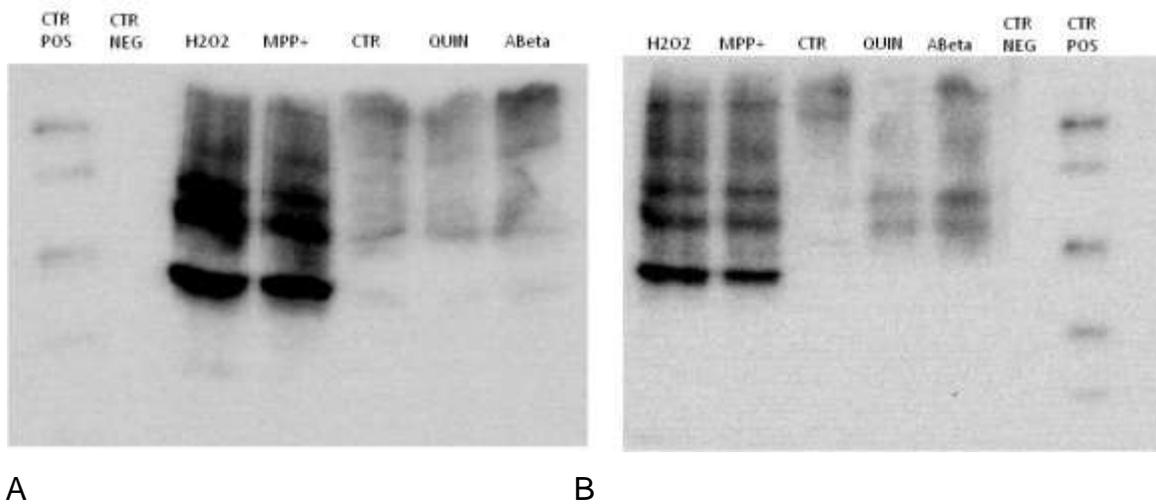


FIGURA 3. Oxyblots representativos de la determinación de oxidación de proteínas en cultivos primarios de astrocitos neonatos (A) y adultos (B) tratados con diferentes tóxicos, a diferentes concentraciones y un tiempo de exposición de 5 h.

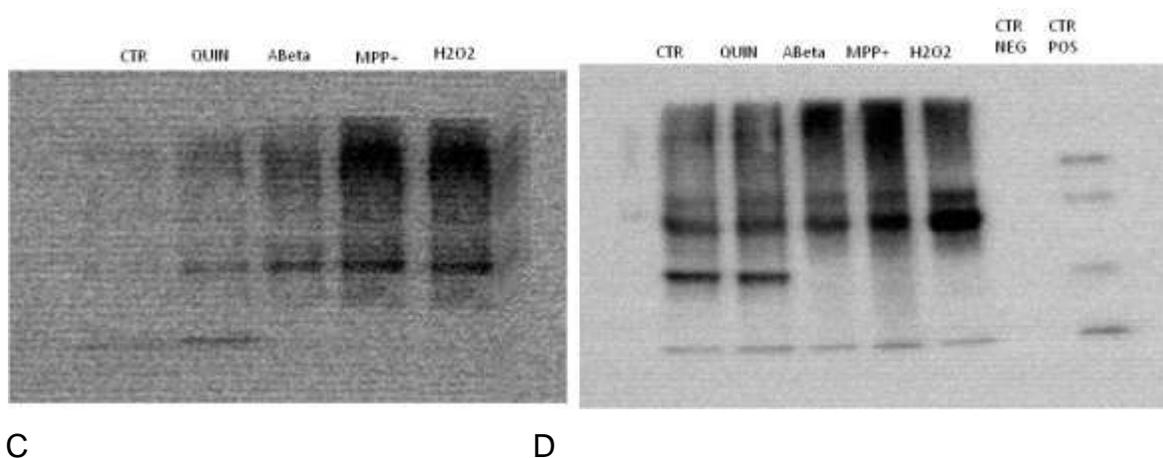


FIGURA 4. Oxyblots de la determinación de oxidación de proteínas en cultivos primarios de astrocitos neonatos (C) y adultos (D) tratados con diferentes tóxicos, a diferentes concentraciones y un tiempo de exposición de 72 h.

Se observa que en los astrocitos provenientes de organismos neonatos y adultos existe una mayor oxidación de proteínas ante los retos oxidativos de 50 μM de MPP+ y 50 μM de Abeta en ambos tiempos, así como es el caso del Control pro oxidante con H_2O_2 . En contraste, no se detecta oxidación en los cultivos primarios de astrocitos provenientes de organismos neonatos expuestos a 250 μM del tóxico QUIN a las 5 h, pero al tiempo de 72 h si se observó una oxidación marcada únicamente en el caso de los cultivos primarios de astrocitos adultos.

8. RESUMEN DE RESULTADOS

* El H₂O₂ alteró la viabilidad y funcionalidad celular a partir de una concentración de 100 µM durante 1 h en cultivos primarios de rata neonata, constituyéndose como un buen Control positivo de daño y validando así nuestros cultivos.

* El QUIN no alteró la viabilidad celular en tratamientos agudos en cultivos primarios de rata neonata ni adulta, sino hasta el empleo de concentraciones suprafisiológicas.

*El QUIN solo alteró la funcionalidad celular durante el tratamiento crónico de 72 h a una concentración de 1mM en cultivos primarios de rata de neonata y adulta, pero no se encontraron diferencias con respecto a la edad.

* Los tratamientos con QUIN no produjeron daños oxidativo en proteínas ni en lípidos en cultivos primarios de astrocitos provenientes de organismos neonatos ni adultos a ningún tiempo probado.

* Los cultivos de astrocitos provenientes de organismos neonatos y adultos presentaron diferencias en la viabilidad y funcionalidad celular al tratarse con los tóxicos Abeta y MPP+, a los dos tiempos probados, pero solamente se encontraron diferencias en función a la edad en la funcionalidad de los astrocitos tratados con MPP+.

* Los tratamiento con Abeta y MPP+ produjeron daño oxidativo en lípidos y proteínas en los cultivos provenientes de ambos organismos tanto a 5 como a 72 h, pero no se encontraron diferencias con respecto a la edad.

9. DISCUSIÓN

El envejecimiento y las enfermedades neurodegenerativas son procesos fisiológicos que están relacionados con el estrés oxidativo. Para determinar las relaciones entre el estrés oxidante y las enfermedades neurodegenerativas se han establecido diferentes modelos biológicos de estudio tanto *in vivo* como *in vitro*, en los cuales el uso de diferentes moléculas ha ayudado a simular algunas de las características fisiológicas o bioquímicas de las enfermedades neurodegenerativas relacionadas con el envejecimiento, entre las que destacan las enfermedades de Huntington, Alzheimer y Parkinson. El estudio de estas patologías es complicado debido a la diversidad de eventos que las pueden originar, entre los que se encuentran los procesos genéticos, bioquímicos y ambientales, así como el tipo celular que se ve afectado en dichas patologías.

Durante largo tiempo, el estudio de las enfermedades neurodegenerativas se ha enfocado en el análisis del tipo celular más importante en el SNC, las neuronas, ya que la disfunción en la comunicación neuronal es el evento más relevante y característico de dichas enfermedades. No obstante, en este trabajo tratamos de destacar la participación y la importancia de otro tipo celular en el SNC, como son los astrocitos. En esta preparación se probaron los efectos de algunas de las moléculas mimetizadoras más empleadas en los modelos de estudio de las enfermedades neurodegenerativas asociadas al envejecimiento. En particular, el QUIN para la EH, el Abeta para la EA y el MPP+ para la EP.

Un aspecto novedoso del trabajo fue el establecimiento del modelo de cultivos primarios de astrocitos provenientes de individuos neonatos y adultos. Esto representa un avance importante en el estudio de la relación entre las

enfermedades neurodegenerativas y el envejecimiento, ya que dicho modelo permite determinar las diferencias en la susceptibilidad de este tipo celular frente a los diferentes neurotóxicos en individuos adultos y neonatos.

El primer resultado interesante que se obtuvo en este estudio fue que los astrocitos mostraron una alta resistencia frente al QUIN. Sin embargo, existen reportes donde la citotoxicidad del QUIN ha sido demostrada al inducir la apoptosis tanto en células neuronales como en astrocitos (Braidy y col., 2009). Fisiológicamente, la producción del QUIN está relacionada con la vía metabólica de la kineurina (KP), que es la principal ruta del catabolismo del triptofano en donde se produce principalmente nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) (Stone, 1993). Sin embargo, también se producen algunos otros metabolitos neuro-activos como el QUIN, el cual es un agonista del receptor NMDA, y éste es reconocido por tener una importante actividad toxicológica (Heyes, 1993; Stone, 2001).

El QUIN es conocido por estar asociado con la neuropatogénesis de la EA (Guillemin y Brew, 2002), la EH (Finkbeiner y Cuero, 2006), la esclerosis lateral amiotrófica (Guillemin y col., 2005a), y el virus de la inmunodeficiencia humana (Guillemin y col., 2005b., Heyes y col., 1991., Heyes y col., 1992). Aunque el mecanismo citotóxico del QUIN no ha sido totalmente descrito, se ha observado que existe un incremento en las ERO posiblemente mediado por la vía del receptor NMDA (Behan y col., 1999; Guillemin y Brew, 2002; Kerr y col., 1998).

Hace algunos años se demostró la presencia de QUIN en cerebros postmortem de pacientes epilépticos, lo cual sugirió que una deficiente degradación del triptófano y su posterior acumulación tóxica, pudiera estar asociada al posible mecanismo

convulsionante (Feldblum y col.,1988). Por lo que en diversos trabajos se ha cuantificado la actividad de dos enzimas directamente responsables con el metabolismo del triptófano y la generación del QUIN, la 3-hidroxiantranílico oxigenasa (3HAO) y la Quinolínico fosforribosil transferasa (QPRT), las cuales promueven síntesis y degradación respectivamente. Incluso algunos autores han encontrado diferentes subtipos de 3HAO Y QPRT en neuronas y en astrocitos. La mayoría de estos subtipos se localizaron en astrocitos, lo que sugiere que muy probablemente los astrocitos estén más protegidos ante un daño por este tóxico (Kohler y col., 1988; Poston y col., 1991)

Se ha comprobado que la activación de los receptores NMDA por agonistas como el glutamato y el QUIN abre canales iónicos permeables a Na^+ y Ca^{2+} (Guillemin y col., 2005b; Stone y Perkins, 1981). Un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular se ha observado en diferentes procesos dañinos, en donde se induce un incremento en la actividad de la oxido nítrico sintetasa (NOS), la cual promueve el incremento del radical oxido nítrico ($\text{NO}\bullet$) y el daño por radicales libres, y todos estos eventos han sido relacionados con una disfunción mitocondrial y daños en las cadenas de DNA (Atlante y col., 1997; Behan y col., 1999; Velazquez y col., 1997).

En otros trabajos se ha demostrado que el QUIN induce la generación de ERO que se han evaluado por la inducción de lipoperoxidación en cerebro de ratas (Behan y col., 1999; Santamaria et al., 2001). Se ha reportado que la transcripción de la iNOS es inducida en respuesta a estímulos con citocinas (Possel y col., 2000) y otras endotoxinas entre las que se encuentra el QUIN (Ryu y col., 2004). La actividad de la nNOS se incrementa después de una inyección de QUIN en la

región del estriado de rata (Aguilera y col., 2007; Perez-Severiano y col., 1998). La activación de los receptores NMDA por QUIN se ha reportado por inducir apoptosis en las neuronas (Kelly y Burke, 1996; Kerr y col., 1995; Stone, 2001). Por otra parte, la citotoxicidad del QUIN sobre los astrocitos parece ser mediada por una vía muy similar a la que se presenta en las neuronas, en donde hay inducción de la actividad de la iNOS a través de la activación de receptores gliales NMDA, aunque la existencia de receptores funcionales NMDA en astrocitos todavía es controversial (Conti y col., 1996; Guillemín y col., 2005b).

En este trabajo nosotros demostramos que la toxicidad del QUIN sobre cultivos primarios de astrocitos provenientes de ratas neonatas y adultas se presenta únicamente a partir de tratamientos con concentraciones mayores de 500 μM de QUIN para los neonatos y de 400 μM para los adultos. Las concentraciones que manejamos son mucho mayores a las reportadas en otros trabajos con astrocitos, en donde las concentraciones se encuentran en rangos nanomolares; sin embargo, hay que destacar que los modelos utilizados provienen de organismos fetales o de tejidos *post mortem* (Braidý y col., 2008; Guillemín y col., 2005).

Los astrocitos provenientes de los fetos humanos presentan la problemática de que no adquieren la maduración requerida (ni los mecanismos de defensa) para contrarrestar los efectos oxidativos inducidos por el QUIN, y por tanto la susceptibilidad se asume que es mayor. En el caso de los astrocitos provenientes de organismos *post mortem* con SIDA, la susceptibilidad es mayor probablemente porque los astrocitos ya presentaban un daño previo por efecto del insulto viral que sensibilizó la viabilidad celular de los astrocitos. Al final de cuentas, los

astrocitos sanos de rata no pueden ser comparados con astrocitos de humanos en condiciones patológicas. De esta manera, podemos destacar que la resistencia a la citotoxicidad del QUIN depende del origen de los astrocitos. Por su parte, la probable diferencia observada entre los cultivos de astrocitos de neonatos y adultos pudiera ser debida al hecho de que se ha observado que los niveles de QUIN en el SNC se encuentran incrementados con la edad (Moroni y col., 1984). Este último hecho resulta de gran interés por que es una relación interesante entre la EH y el envejecimiento, en donde el QUIN es un protagonista importante. Nuestros resultados también avalan el hecho de que la citotoxicidad del QUIN ocurre mediante la inducción de un estado de EO, ya que al evaluar parámetros oxidativos en biomoléculas como lípidos y proteínas, los encontramos incrementados en esta condición.

Sin embargo, aún queda la duda de cuál es el mecanismo inductor de EO que se presenta en los tratamientos con QUIN. Para ello, como hemos mencionado anteriormente, es necesario evaluar tanto a las enzimas inductoras de EO como lo son las NOS y el papel que pudieran tener los receptores tipo NMDA en estas células y determinar su participación en la inducción de daño oxidativo.

Por otra parte, aún quedan otras cuestiones por resolver: ¿Por qué los organismos neonatos resisten más que los adultos al tratamiento con QUIN? Esta cuestión muy probablemente esté relacionada con la respuesta celular antioxidante, en donde los astrocitos son el tipo celular con mayor potencial antioxidante, mucho mayor que el de las neuronas (Makar y col., 1994). Es posible que exista una disminución en la expresión o actividad de las enzimas

antioxidantes con la edad, ya que posiblemente estén bajo mecanismos de regulación epigenética.

En cuanto a los resultados obtenidos con el tóxico Abeta, se sabe que en la EA, la disfunción de los procesos neurológicos es precedida por el desarrollo de dos lesiones, la deposición fibrilar del péptido β -amiloide, el cual es un agregado extracelular insoluble que forma el corazón de las placas seniles (Arnold y col., 1998), y la aparición de marañas neurofibrilares intracelulares. Las estructuras cerebrales más afectadas son el hipocampo y la corteza cerebral (Goedert, 1998), particularmente la microglia reactiva y los astrocitos alrededor de las placas seniles (Araujo y Cotman, 1992). Estas estructuras podrían ser las responsables de la neuroinflamación en la EA (Baltrons y col., 2002).

Las células astrogliales son inmunocompetentes en el SNC bajo condiciones neuroprotectoras (Streit, 2002). Estas células, similares a los macrófagos en función, producen diferentes citocinas responsables de la regulación autocrina y la comunicación con las neuronas, astrocitos y leucocitos infiltrados (Hanisch, 2002; Xiao y col., 1996). Así, la activación gradual de la astrogliía es necesaria para proteger la homeostasis del SNC, la defensa de tejidos y la reactividad inmune. Las células gliales también secretan moléculas que promueven la sobre-vivencia celular en cultivos.

La muerte celular apoptótica es observada cuando estos factores son inhibidos, removidos o sus funciones son bloqueadas (Rubin, 1998). No obstante, las células gliales también liberan una gran variedad de moléculas, como lo son las ERO y ERN, nitrógeno, mediadores pro-inflamatorios relacionados a citocinas, quimiocinas, factores del complemento, etc., que bien podrían inducir daños

celulares posteriores (Akiyama y col., 2000; Eikelenboom y col., 2002). El Abeta tiene efectos tóxicos sobre las neuronas e induce la activación glial (Malchiodi-Albedi y col., 2001; Rogers y col., 2002), particularmente los astrocitos *in vitro* (Hu y col., 1998; Malchiodi-Albedi y col., 2001). La descontrolada sobre-activación de la astrogliá puede ser dañina, induciendo la liberación de citocinas potencialmente tóxicas (Hanisch, 2002; Prinz y col., 1999).

Por otra parte, los astrocitos son considerados la estructura y el soporte trófico del SNC (Giulian y col., 1993; Kirchhoff y col., 2001; Nedergaard, 1994), así como el mecanismo de defensa antioxidante, ya que ellos contienen a las enzimas superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa, el glutatión y a las vitaminas C y E (Wilson, 1997). Los astrocitos estimulados por moléculas proinflamatorias secretan IL-1 β (Willis y Nisen, 1996) y el factor de crecimiento neural (NGF), que potencialmente incrementan la viabilidad de neuronas dañadas (Oderfeld-Nowak y col., 1992). También incrementan los niveles de expresión del mRNA para TGF- β 1 en cultivos de astrocitos expuestos al lipopolisácarido proveniente de bacterias Gram-negativas (LPS), interferón gamma (IFN- γ), y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (Wesselingh y col., 1990).

La administración de IL-1 β incrementa los niveles de TGF- β 1 en el cerebro, provocando un efecto sinérgico con la actividad neuroprotectora del NGF (Chalazonitis y col., 1992). Estos son, ciertamente, reportes contradictorios sobre el papel protector de los astrocitos. Algunos autores sugieren que los astrocitos protegen a las neuronas del daño inducido por el Abeta (Giulian y col., 1993; Wilson, 1997), mientras que otros reportan que los astrocitos inducen una citotoxicidad potencial (Hu y col., 1998; Johnstone y col., 1999; Malchiodi-Albedi y

col., 2001). Nuestros resultados sugieren que la disminución en la viabilidad celular por el tratamiento con el citotóxico Abeta tiene un fuerte componente asociado al EO por un posible aumento de las ERO, observándose en el daño a las biomoléculas estudiadas. Este daño se encontró con una mayor severidad en los cultivos primarios provenientes de individuos adultos. Los reportes sugieren que la protección contra el citotóxico Abeta es mediante el tratamiento con antioxidantes para contrarrestar el incremento de la ERO.

Estos reportes nos sugieren que existe una disminución en la respuesta antioxidante, principalmente en donde participa el mecanismo del GSH. Coincidentemente con los otros neurotóxicos que evaluamos en este trabajo, parece ser que la disminución en la respuesta antioxidante es la principal causa del daño citotóxico inducida por estos compuestos, y que ésta es más evidente en los individuos adultos.

En cuanto a los resultados que obtuvimos con el modelo por MPP+ y su toxicidad en los astrocitos, éstos resultan ser muy parecidos a los reportados por otros grupos de investigación en donde las concentraciones que se trabajan se encuentran entre los 10-100 μM y las variaciones se encuentran en los tiempos de exposición que van desde las 5 y hasta las 72 horas, mientras que los cultivos de astrocitos primarios son provenientes de ratas neonatas (Chuang y Chen, 2004; Chen y col., 2008; Hu y col., 2005). Debe recordarse que el papel fundamental de los astrocitos es el proteger y dar sostén a las neuronas. Entre los muchos procesos fisiológicos que realizan se encuentra la biotransformación de moléculas exógenas, como es el caso de la molécula MPTP, la cual se encontró que al ser empleada por algunos drogadictos después de consumir la toxina, ellos

presentaban características similares a las de la EP. El mecanismo descrito hasta el momento sugiere que el MPTP es biotransformado por la monoaminooxidasa tipo B (MAO-B) en una molécula más tóxica como lo es el MPP+, y esto ocurre en los astrocitos (Brooks et al., 1989; Di Monte y col., 1989). Para demostrar que el MPTP es biotransformado por la MAO-B en los astrocitos, en esos reportes se utilizaron inhibidores específicos contra la enzima y también se utilizó a la gliotoxina ácido α -aminoadípico, bloqueando así la toxicidad del MPTP (Heikkila y col., 1984; Chang y col., 1993). Los astrocitos tratados con MPTP perdieron su viabilidad como resultado de la generación de MPP+ y la disminución en los niveles de ATP inducidos por este último subproducto tóxico (Di Monte y col., 1992). No obstante, el efecto citotóxico del MPP+ sobre los astrocitos es todavía desconocido. Después de que el MPP+ es liberado desde los astrocitos dentro del espacio extracelular, éste es tomado selectivamente por las neuronas dopaminérgicas a través de los transportadores de dopamina (Javitch y col., 1985; Uhl 1998) y acumulado en la mitocondria (Ramsay y Singer, 1986). Los elevados niveles de MPP+ inhiben entonces la actividad del complejo mitocondrial I, generando una despolarización mitocondrial, pérdida de ATP e inducción de ERO en diferentes células (Cassarino y col., 1999; Nakamura y col., 2000; Wu y col., 1993). Nosotros determinamos los niveles de oxidación de lípidos y proteínas, y observamos que la disminución en la viabilidad aumentaba con el tratamiento de MPP+, por lo que el mecanismo de toxicidad de esta molécula también está relacionado con un estado de EO. Igualmente observamos que la viabilidad disminuye con respecto al tiempo de exposición, lo que sugiere que el efecto del MPP+ es continuo y persistente, y por ello desencadena otros procesos

oxidativos. Sin embargo, en nuestro estudio solo trabajamos con una concentración, y sí el efecto es constante, entonces ¿por qué no observamos la misma disminución en la viabilidad? Para tratar de explicar este efecto, revisamos lo reportado por Chuang y Chen en un modelo de línea celular de astrocitoma U373MG. Estos autores reportan que en tiempos cortos de exposición al MPP+, los astrocitos tratan de responder eliminando las ERO mediante el sistema antioxidante del GSH, mientras que cuando se expone a la línea celular U373MG por tiempos prolongados a la toxina, se observa que este mecanismo ya no es efectivo, y por tanto se incrementa el daño oxidativo y se induce la muerte celular, sugiriendo que en tiempos de exposición larga, la administración de antioxidantes produce una disminución en la mortalidad celular.

De acuerdo con estos resultados, y tratando de explicar los propios en los que no observamos diferencias entre los cultivos celulares provenientes de individuos neonatos y adultos, proponemos para un siguiente estudio el empleo de tratamientos con diferentes concentraciones de MPP+ y a diferentes tiempos de exposición, evaluando esta vez la respuesta antioxidante y determinar si existen diferencias en la susceptibilidad al tóxico MPP+ y por tanto establecer una relación de este tóxico con la enfermedad de Parkinson y el envejecimiento.

En resumen, los resultados revisados anteriormente nos sugieren que el efecto de los tres tóxicos utilizados en nuestro trabajo induce un estado de estrés oxidativo que se evidenció al evaluar el daño en las biomoléculas estudiadas. Ello podría explicar la disminución en la viabilidad y funcionalidad celular en los modelos de estudio.

Un aspecto muy importante que salió a relucir de este trabajo fue que los mecanismos de inducción del estado oxidativo generados por cada uno de los tres tóxicos debe ser diferente, ya que sus efectos sobre los astrocitos fueron distintos. Es posible que ésto se deba a la naturaleza química de los tóxicos, pues el QUIN y el Abeta son propiamente moléculas que forman parte del metabolismo celular, por lo que en un momento dado las células sanas o no sensibilizadas podrían tener menor susceptibilidad a dichos tóxicos, ya que se sabe que los astrocitos poseen mecanismos para eliminarlos o atenuar sus efectos; sin embargo, estos mecanismos al parecer son insuficientes cuando los tóxicos se encuentran en concentraciones mayores a las fisiológicas, lo cual induce un estado de estrés oxidativo y la muerte celular.

El caso del MPP+ es distinto, ya que es una molécula sintética, que es por consiguiente no es fácilmente metabolizada, y por lo tanto su efecto es totalmente directo sobre la fisiología u homeostasis celular, afectando principalmente a cadena de transporte de electrones mitocondrial. Se ha sugerido que este sea el sitio en donde se genera el EO, probablemente por ello es que a dosis menores sus efectos sean letales.

De esta manera, para poder ahondar en esta discusión sería importante evaluar la respuesta antioxidante de los astrocitos ante los tres tóxicos evaluados en futuros estudios. En cuanto a la comparación de astrocitos provenientes de animales de diferentes edades, queda claro que en la mayoría de los casos no se encontraron diferencias significativas entre los dos cultivos evaluados, parece ser que ambos cultivos presentan las mismas condiciones de respuesta y

susceptibilidad. Únicamente se encontraron diferencias en el tratamiento con MPP+; sin embargo, sería interesante determinar el daño oxidativo que se induce por los tres tóxicos en un modelo de astrocitos provenientes de individuos de una edad más avanzada (24 meses). En este caso, también sería oportuno analizar las posibles variaciones que pudieran encontrarse en la respuesta antioxidante, ya que se espera que ésta esté disminuida en los individuos seniles. Ello podría ser una causa primordial de la susceptibilidad ante los tóxicos.

10. CONCLUSIONES

- ✓ La susceptibilidad de la viabilidad y funcionalidad celular de los astrocitos de cultivos primarios provenientes de la corteza cerebral de ratas neonatas y adultas al QUIN es dependiente del tiempo de exposición y de concentraciones superiores a las fisiológicas.
- ✓ El efecto citotóxico sobre los astrocitos del QUIN es a tiempos prolongados de exposición.
- ✓ La citotoxicidad del Abeta y el MPP+ sobre los cultivos de primarios de astrocitos de corteza cerebral de neonatos y adultos no depende del tiempo de exposición con las concentraciones utilizadas.
- ✓ Los cultivos primarios de astrocitos provenientes de ratas adultas son más susceptibles al MPP+ que los de provenientes de ratas neonatas.
- ✓ El tratamiento con ABETA y MPP+ producen daño oxidativo en lípidos de cultivos provenientes de organismos neonatos y adultos a 5h.

- ✓ El QUIN induce daño oxidativo a lípidos y proteínas en tiempos de exposición largos en cultivos de astrocitos provenientes de la corteza cerebral de ratas adultas, lo que induce una disminución en la funcionalidad y viabilidad celular.

- ✓ La disminución de la viabilidad y funcionalidad celular de los cultivos primarios de astrocitos provenientes de la corteza cerebral de ratas neonatas y adultas expuestas a los tóxicos Abeta y MPP+ es debido al incremento de lípidos y proteínas oxidadas.

- ✓ En general los cultivos primarios de astrocitos provenientes de la corteza cerebral de ratas adultas son más susceptibles a los tres citotóxicos utilizados.

- ✓ Los tres citotóxicos utilizados inducen daños oxidativos a las biomoléculas.

- ✓ La disminución en la respuesta antioxidante en los cultivos de astrocitos provenientes de ratas adultas podría ser la causa de la susceptibilidad a los citotóxicos.

- ✓ Los cultivos primarios de corteza cerebral de ratas adultas son más susceptibles al QUIN que los provenientes de ratas neonatas.

- ✓ Los astrocitos de adultos son más susceptibles al daño oxidativo inducido por los tóxicos QUIN, Abeta y MPP+.

- ✓ La disminución en la respuesta antioxidante en los cultivos de astrocitos provenientes de ratas adultas podría ser la causa de la susceptibilidad a los citotóxicos QUIN, Abeta y MPP+.

11. PERSPECTIVAS

- Evaluar el daño oxidativo inducido por QUIN, Abeta y MPP+ en cultivos primarios de astrocitos provenientes de ratas seniles de 24 meses
- Evaluar la toxicidad de estos compuestos mediante curvas de dosis respuestas y diferentes tiempos de exposición en cultivos primarios de astrocitos provenientes de ratas seniles de 24 meses
- Determinar la respuesta antioxidante en cultivos primarios de astrocitos provenientes de ratas seniles de 24 meses ante la inducción de estrés oxidativo por los tres compuestos tóxicos.
- Amplificar la respuesta antioxidante para contrarrestar la toxicidad de QUIN, Abeta y MPP+ en cultivos primarios de astrocitos provenientes de ratas seniles de 24 meses.

12. APÉNDICE

SOLUCIONES

Solución Krebs 10x (500ml)

- NaCl 1.2M
- KCl 0.048M
- KH₂PO₄ 0.12M
- NaHCO₃ 0.25M
- Glucosa 0.14M
- Rojo Fenol 0.00043M

Solución 1

- Solución Krebs 5mL
- H₂O₂ destilada 45mL
- Albúmina Sérica Bovina 150mg
- MgSo₄ (3.8%) 400uL

Solución 2

- Solución 1 6.25mL
- Tripsina 1.6mL

Solución 3

- Solución 1 4.7mL
- DNAasa 0.4 mg
- MgSo₄ (3.8%) 40uL
- Suero Fetal Bovino 1mL

Solución 4

- Solución 1 5mL
- Solución 3 1mL
- Suero Fetal Bovino 600uL

Solución 5

- Solución 1 5mL
- MgSo₄ (3.8%) 30uL
- CaCl₂ (1.2%) 6uL

13. BIBLIOGRAFÍA

Aguilera P., Chánez-Cárdenas M.E., Floriano-Sánchez E., Barrera D., Santamaría A., Sánchez-González D.J., Pérez-Severiano F., Pedraza-Chaverri J., Jiménez P.D. (2007) Time-related changes in constitutive and inducible nitric oxide synthases in the rat striatum in a model of Huntington's disease. *Neurotoxicology*. 28(6):1200-1207.

Akiyama H., Arai T., Kondo H., Tanno E., Haga C., Ikeda K. (2000) Cell mediators of inflammation in the Alzheimer disease brain *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 1:47-53.

Atlante A., Gagliardi S., Minervini G.M., Ciotti M.T., Marra E., Calissano P. (1997) Glutamate neurotoxicity in rat cerebellar granule cells: a major role of xanthine oxidase in oxygen radical formation *J Neurochem*. 68 (5):2038–2045.

Araujo D.M., Cotman C.W. (1992) Basic FGF in astroglial, microglial, and neuronal cultures: characterization of binding sites and modulation of release by lymphokines and trophic factors. *J Neurosci*. 12(5):1668-1678.

Arnold S.E., Smutzer G.S., Trojanowski J.Q., Moberg P.J. (1998) Cellular and molecular neuropathology of the olfactory epithelium and central olfactory pathways in Alzheimer's disease and schizophrenia *Ann N Y Acad Sci*. 855:762-775.

Azcoitia I., Garcia-Ovejero D., Chowen J.A., Garcia-Segura L.M. (2001) Astroglia play a key role in the neuroprotective actions of estrogen. *Prog Brain Res*. 469-478
Beckman J.S.(1996) Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite *Chem Res Toxicol*.132:836-844.

Baltrons M.A., Pedraza C.E., Heneka M.T., García A. (2002) Beta-amyloid peptides decrease soluble guanylyl cyclase expression in astroglial cells *Neurobiol Dis*.10(2):139-149.

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(8):1754–1760.

Braidy N., Grant R., Adams S., Brew B.J., Guillemin G.J. (2009) Mechanism for quinolinic acid cytotoxicity in human astrocytes and neurons. *Neurotox Res.*16(1) 77-86.

Braidy N., Guillemin G., Grant R. (2008) Promotion of cellular NAD(+) anabolism: therapeutic potential for oxidative stress in ageing and Alzheimer's disease *Neurotox Res.* 13:173-184.

Braidy N., Grant R., Adams S., Bruce J. Brew ., Gilles J. Guillemin. (2009) Mechanism for Quinolinic Acid Cytotoxicity in Human Astrocytes and Neurons *Neurotox Res* 16(1):77–86.

Brooks W.J, Jarvis M.F., Wagner G.C. (1989) Astrocytes as a primary locus for the conversion MPTP into MPP+ *J Neural Transm.* 76(1):1-12.

Cassarino D.S., Parks J.K., Parker W.D. Jr., Bennett J.P. Jr. (1999) The parkinsonian neurotoxin MPP+ opens the mitochondrial permeability transition pore and releases cytochrome c in isolated mitochondria via an oxidative mechanism *Biochim Biophys Acta.* 1:49-62.

Chalazonitis A., Kalberg J., Twardzik D.R., Morrison R.S., Kessler J.A. (1992) Transforming growth factor beta has neurotrophic actions on sensory neurons in vitro and is synergistic with nerve growth factor *Dev Biol.*152 (1):121-132.

Chang F.W., Wang S.D., Lu K.T., Lee E.H.(1993) Differential interactive effects of gliotoxin and MPTP in the substantia nigra and the locus coeruleus in BALB/c mice *Brain Res Bull.* 31:253-266.

Cepeda C., Cummings D.M., André V.M., Holley S.M., Levine M.S. (2010) Genetic mouse models of Huntington's disease: focus on electrophysiological mechanisms *ASN Neuro.*7(2):103-114.

Chen Hui., Wang Sen., Ding Jian-Hua., Hu Gang. (2008) Edaravone protects against MPP+ -induced cytotoxicity in rat primary cultured astrocytes via inhibition of mitochondrial apoptotic pathway. *J Neurochem.*106 (6):2345-2352.

Chen Y., Swanson R.A. (2003) Astrocytes and brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab.*23 (2):137-149.

Chuang J.I., Chen T.H. (2004) Effect of melatonin on temporal changes of reactive oxygen species and glutathione after MPP (+) treatment in human astrocytoma U373MG cells *J Pineal Res.* 36(2):117-125.

Claire D., Clelland., Roger A., Barker., Colin Watts. (2008) Cell therapy in Huntington disease. *Neurosurg Focus.* 24(4) :1-12.

Conti F., DeBiasi S., Minelli A., Melone M. (1996) Expression of NR1 and NR2A/B subunits of the NMDA receptor in cortical astrocytes. *Glia*. 17(3):254–258.

Danielson S.R., Andersen K. (2008) Oxidative and nitrative protein modifications in Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med*. 44 (10):1787–1794.

Darlington C. L. (2005) Astrocytes as targets for neuroprotective drugs. *Curr. Opin. Investig. Drugs*. 6(7):700–703.

Di Monte D., Wu E.Y., Smith M.T. (1989) Commentary on "Biochemical mechanism of action of the dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) *Toxicol Lett*. 48(2):117-119.

Di Monte D.A., Wu E.Y., Langston J.W. (1992) Role of astrocytes in MPTP metabolism and toxicity *Ann N Y Acad Sci*. (11):219-228

Ebadi M., Sharma S. (2006) Metallothioneins 1 and 2 attenuate peroxynitrite-induced oxidative stress in Parkinson disease. *Exp Biol Med*.(9)1576–1583.

Eikelenboom P., Bate C., Van Gool W.A., Hoozemans J.J., Rozemuller J.M., Veerhuis R., Williams A. (2002) Neuroinflammation in Alzheimer's disease and prion disease *Glia*. 40(2):232-239.

Escartin C., Pierre K., Colin A., Brouillet E., Delzescaux T., Guillemier M., Dhenain M., Deglon N., Hantraye P., Pellerin L., Bonvento G. (2007) Activation of Astrocytes by CNTF Induces Metabolic Plasticity and Increases Resistance to Metabolic Insults. *J Neurosci* 27:7094 –7104.

Feldblum S., Rougier A., Loiseau H., Loiseau P., Cohadon F., Morselli P.L., Lloyd K.G. (1988) Quinolinic-phosphoribosyl transferase activity is decreased in epileptic human brain tissue. *Epilepsia*. 29 (5): 523-529.

Finkbeiner S., Cuero A.M. (2006) Disease modifying pathways in neurodegeneration. *J Neurosci*. 26(41):10349–10357.

García-Matas S., de Vera N., Aznar A.O., Marimon J.M., Adell A., Planas A.M., Cristofol R., Sanfeliu C. (2010) In vitro and in vivo activation of astrocytes by amyloid-beta is potentiated by pro-oxidant agents. *J Alzheimers Dis*. 20(1):229-245.

García-Marín V., García-López P., Freire M. (2007) Cajal's contributions to glia research. *Trends Neurosci*. 30 (9):479-487.

Giulian D., Vaca K., Corpuz M. (1993) Brain glia release factors with opposing actions upon neuronal survival. *J Neurosci*. 13(1): 29-37.

Goedert M. (1998) Neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease and other tauopathies. *Prog Brain Res.* 117:287-306.

Guidetti P., Bates G.P., Graham R.K., Hayden M.R., Leavitt B.R., MacDonald M.E., Slow E.J., Wheeler V.C., Woodman B., Schwarcz R. (2006) Elevated brain 3-hydroxykynurenine and quinolinate levels in Huntington disease mice *Neurobiol Dis.* 23(1):190-197.

Guillemin G.J., Brew B.J. (2002) Implications of the kynurenine pathway and quinolinic acid in Alzheimer's disease *Redox Rep.* 7(4):199-206.

Guillemin G.J., Meninger V., Brew B.J. (2005a) Implications for the kynurenine pathway and quinolinic acid in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegener Dis.* 2(3): 166–176.

Guillemin G.J., Kerr S.J., Brew B.J. (2005b) Involvement of quinolinic acid in AIDS dementia complex. *Neurotox Res.* 7(1):103–123.

Goda K., Kishimoto R., 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.

Halliwell B. (1992) Reactive oxygen species and the central nervous system *J Neurochem.* 59(5):1609-1623

Hanisch U.K. (2002) Microglia as a source and target of cytokines. *Glia.* 40(2):140-55.

Harman D. (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation Chemistry. *J Gerontol.* 11(3):298-300.

Harman D. (2001) Aging: overview. *Ann NY Acad Sci K.* 928:1-21.

Hashimoto T., Nishi K., Nagasao J., Tsuji S., Oyanagi K. (2008) Magnesium exerts both preventive and ameliorating effects in an in vitro rat Parkinson disease model involving 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) toxicity in dopaminergic neurons. *Brain Research.* 4(1197):143-151.

Heikkila R.E., Manzino L., Cabbat F.S., Duvoisin R.C. (1984) Protection against the dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine by monoamine oxidase inhibitors *Nature.* 31 (311):467-469.

Heui-Joon K., Woo-Hun L., Cheol-Ho Y., Ji-Cheon J., Kyung-Soo N., Hyung-Min K., Young-Kug C., Myung-Chul L., Cheol-Ho K. (2001) *Bombycis Corpus extract*

prevents amyloid-induced cytotoxicity and protects superoxide dismutase activity in cultured rat astrocytes *Pharmacological Research*. 43(1):11-16.

Heyes M.P., Brew B.J., Martin A., Price R.W., Salazar A.M., Sidtis J.J., Yergey J.A., Mouradian M.M., Sadler A.E., Keilp J. (1991) Quinolinic acid in cerebrospinal fluid and serum in HIV-1 infection: relationship to clinical and neurological status. *Ann Neurol*. 29(2):202–209.

Heyes M.P., Jordan E.K., Lee K., Saito K., Frank J.A., Snoy P.J., Markey S.P., Gravell M. (1992) Relationship of neurologic status in macaques infected with the simian immunodeficiency virus to cerebrospinal fluid quinolinic acid and kynurenic acid. *Brain Res*. (1-2):237–250.

Heyes M.P. (1993) Metabolism and neuropathologic significance of quinolinic acid and kynurenic acid *Biochem Soc Trans*. 21(1)83-89

Hu J., Akama K.T., Krafft G.A., Chromy B.A., Van Eldik L.J.(1998) Amyloid-beta peptide activates cultured astrocytes: morphological alterations, cytokine induction and nitric oxide release *Brain Res*.(2):195-206.

Hu L.F., Wang S., Shi X.R., Yao H.H., Sun Y.H., Ding J.H., Liu S.Y., Hu G. (2005) ATP-sensitive potassium channel opener iptakalim protected against the cytotoxicity of MPP+ on SH-SY5Y cells by decreasing extracellular glutamate level. *J Neurochem*. 94(6):1570-1579.

Imlay J.A.(2003) Pathways of oxidative damage *Annu Rev Microbiol*. (57):395-418.

Jankovic J, Stacy M. (2007) Medical management of levodopa-associated motor complications in patients with Parkinson's disease. *CNS Drugs*. 21(8):677-692.

Javitch J.A., D'Amato R.J., Strittmatter S.M., Snyder S.H. (1985) Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 -tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity *Proc Natl Acad Sci U S A*. 82(7):2173-2177.

Johnstone M., Gearing A.J., Miller K.M. (1999) A central role for astrocytes in the inflammatory response to beta-amyloid; chemokines, cytokines and reactive oxygen species are produced *J Neuroimmunol*. 93(1-2):182-193.

Kahlert S., Reiser G. (2004) Glial perspectives of metabolic states during cerebral hypoxia--calcium regulation and metabolic energy. *Cell Calcium*.36(3-4):295-302.

Kalman M. (2004) Glial reaction and reactive glia. In: *Non neuronal cells of the nervous system: function and dysfunction Physiological Reviews*. 31:787–835.

Beckman K.B., Bruce N. Ames. (1998) The Free Radical Theory of Aging Matures. *Physiological Reviews*.78(2):547-581.

Kelly W.J., Burke R.E. (1996) Apoptotic neuron death in rat substantia nigra induced by striatal excitotoxic injury is developmentally dependent. *Neurosci Lett* . 220(2):85–88

Kerr S.J., Armati P.J., Brew B.J. (1995) Neurocytotoxicity of quinolinic acid in human brain cultures. *J Neurovirol* 1(5-6):375–380.

Kerr S.J., Armati P.J., Guillemin G.J., Brew B.J. (1998) Chronic exposure of human neurons to quinolinic acid results in neuronal changes consistent with AIDS dementia complex. *AIDS*. 12(4):355–363.

Kent, A. (2004). Huntington's disease. *Nursing Standard*. 18(32):45-51.

Kidd P.M. (2008) Alzheimer disease, amnesic mild cognitive impairment, and age-associated memory impairment: current understanding and progress toward integrative prevention. *Altern Med Rev*. 13(2):85–115.

Kim S.U., De Vellis J. (2005) Microglia in health and disease. *J Neurosci Res*.81(3):302-313.

Kim S.H., Suh Y.H. (2001) Neurotoxicity of a carboxyl-terminal fragment of the Alzheimer's amyloid precursor protein. *J Neurochem* 67(3):1172–1182.

Kirchhoff F., Dringen R., Giaume C. (2001) Pathways of neuron-astrocyte interactions and their possible role in neuroprotection *Psychiatry Clin Neurosci*. 251(4):159-169.

Kobayashi K., Hayashi M., Nakano H., Fukutani Y., Sasaki K., Shimazaki M., Koshino Y. (2002) Apoptosis of astrocytes with enhanced lysosomal activity and oligodendrocytes in white matter lesions in Alzheimer's disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol*. 28(3):238–251.

Kohler C., Lars G.E., Per R.F., Jon A.H., Okuno E., Shwarcz R.(1988) Quinolinic Acid Metabolism in the Rat Brain. Immunohistochemical Identification of 3-Hydroxyanthranilic Acid Oxygenase and Quinolinic Acid Phosphoribosyltransferase in the Hippocampal Region. *J Neurosci*. 8(3):975-987.

Kumar P, Kalonia H, Kumar A.(2010) Huntington's disease: pathogenesis to animal models *Pharmacol Rep*. 62(1):1-14.

Ladeby R., Wirenfeldt M., Garcia-Ovejero D., Fenger C., Dissing-Olesen L., Dalmau I., Finsen B. (2005) Microglial cell population dynamics in the injured adult central nervous system. *Brain Res Brain Res Rev*. 48(2):196-206

- Leeuwenburgh C., Heinecke J.W. (2001) Oxidative stress and antioxidants in exercise *Curr Med Chem.* 8(7):829-838.
- Malchiodi-Albedi F., Domenici M.R., Paradisi S., Bernardo A., Ajmone-Cat M.A., Minghetti L. (2001) Astrocytes contribute to neuronal impairment in beta A toxicity increasing apoptosis in rat hippocampal neurons *Glia.* 34(1):68-72.
- Mancuso C., Bates T.E., Butterfield D.A., Calafato S., Cornelius C., De Lorenzo A., Dinkova Kostova A.T., Calabrese V. (2007) Natural antioxidants in Alzheimer's disease. *Expert Opin Investig Drugs.* 16(12):1921-1931.
- Martin F.L., Williamson S.J., Paleologou K.E., Allsop D., El-Agnaf O.M. (2004) Alpha-synuclein and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Protein Pept Lett.* 11(3): 229-237.
- Martin J.B., Gusella J.F. (1986) Huntington's disease: pathogenesis and management. *N Engl J Med.* 315(20):1267-1276.
- 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(1):51-55.
- Nakaso K., Ito S., Nakashima K. (2007) Caffeine activates the PI3K/Akt pathway and prevents apoptotic cell death in a Parkinson's disease model of SH-SY5Y cells. *Neurosci Lett.* 432(2):1-12.
- Nakamura K., Bindokas V.P., Marks J.D., Wright D.A., Frim D.M., Miller R.J., Kang U.J. (2000) The selective toxicity of 1-methyl-4-phenylpyridinium to dopaminergic neurons: the role of mitochondrial complex I and reactive oxygen species revisited *Mol Pharmacol.* 58(2):271-278.
- Nedergaard M. (1994) Direct signaling from astrocytes to neurons in cultures of mammalian brain cells *Science.* 263(5154):1768-1771.
- Nunomura A., Castellani R.J., Zhu X., Moreira P.I., Perry G., Smith M.A. (2006) Involvement of oxidative stress in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 65(7):631-641.
- Oderfeld-Nowak B., Bacia A., Gradkowska M., Fusco M., Vantini G., Leon A., Aloe L. (1992) In vivo activated brain astrocytes may produce and secrete nerve growth factor-like molecules *Neurochem Int.* 21(3):455-461.
- Parsons P.A. (2003) From the stress theory of aging to energetic and evolutionary expectations for longevity. *Biogerontology.* 4(2):63-73.

Perez-Severiano F., Escalante B., Rios C. (1998) Nitric oxide synthase inhibition prevents acute quinolinate-induced striatal neurotoxicity *Neurochem Res* 23(10):1297–1302.

Pertusa M., García-Matas S., Rodríguez-Farre E., Sanfeliu C., Cristófol R. (2007) Astrocytes aged in vitro show a decreased neuroprotective capacity. *Journal of Neurochemistry*. 29(9):794-805.

Peuchen S., Bolanos J. P., Heales S. J., Almeida A., Duchen M. R. and Clark J. B. (1997) Interrelationships between astrocyte function, oxidative stress and antioxidant status within the central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 52(4):261–281.

Phillips W., Morton A.J., Barker R.A. (2005) Abnormalities of neurogenesis in the R6/2 mouse model of Huntington's disease are attributable to the in vivo microenvironment. *J Neurosci.* 25(50):11564-11576.

Possel H., Noack H., Putzke J., Wolf G., Seis H. (2000) Selective upregulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) by lipopolysaccharide (LPS) and cytokines in microglia: in vitro and in vivo studies. *Glia.* 32(1):51–59.

Poston M.R., Bailey M.S., Schwarcz R., Shipley M.T. (1991) Differential complementary localization of metabolic enzymes for quinolinic acid in olfactory bulb astrocytes. *J Comp Neurol.* 311(3):367-374.

Prinz M., Kann O., Draheim H.J., Schumann R.R., Kettenmann H., Weber J.R., Hanisch U.K. (1999) Microglial activation by components of gram-positive and -negative bacteria: distinct and common routes to the induction of ion channels and cytokines *J Neuropathol Exp Neurol.* 58(10):1078-1089.

Ramsay R.R., Singer T.P. (1986) Energy-dependent uptake of N-methyl-4-phenylpyridinium, the neurotoxic metabolite of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, by mitochondria *J Biol Chem.* 39(7):7585-7587.

Reynolds A., Laurie C., Mosley R. L. and Gendelman H. E. (2007) Oxidative stress and the pathogenesis of neurodegenerative disorders. *Int. Rev. Neurobiol.* 82:297–325.

Rogers J., Strohmeyer R., Kovelowski C.J., Li R. (2002) Microglia and inflammatory mechanisms in the clearance of amyloid beta peptide. *Glia.* 40(2):260-269.

Rubin L.L. (1998) Neuronal cell death: an updated view. *Prog Brain Res.* 117: 3-8.

Rya 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(1):150–159.

Santamaria A., Jimenez-Capdeville M.E., Camacho A., Rodriguez Martinez E., Flores A., Galvan-Arzate S. (2001) In vivo hydroxyl radical formation after quinolinic acid infusion into rat corpus striatum. *Neuroreport*. 12(12):2693–2696.

Santamaría A., Jiménez M. E. (2005) Oxidative/nitrosative stress, a common factor in defferent neurotoxic paradigms: an overview. *Neurochemistr Review*. 4:1-20.

Stone T.W., Perkins M.N. (1981) Quinolinic acid: a potent endogenous excitant at amino acid receptors in CNS. *Eur J Pharmacol*. 72(4):411–412.

Stone T.W. (1993) Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids. *Pharmacol Rev*. 45(3):309-379.

Stone T.W.(2001) Kynurenic acid antagonists and kynurenine pathway inhibitors. *Expert Opin Investig Drugs*. 10(4):633-645.

Stone T.W. (2001a) Endogenous neurotoxins from tryptophan. *Toxicon* 39(1):61–73.

Schilling G., Savonenko A.V., Klevytska A., Morton J.L., Tucker S.M., Poirier M., Gale A., Chan N., Gonzales V., Slunt H.H., Coonfield M.L., Jenkins N.A., Copeland N.G., Ross C.A., Borchelt D.R. (2004) Nuclear-targeting of mutant huntingtin fragments produces Huntington's disease-like phenotypes in transgenic mice. *Hum Mol Gene*. 13(15):1599-1610.

Streit W.J.(2002) Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS *Glia*. 40(2):133-139.

Szydlowska K., Zawadzka M., Kaminska B. (2006) Neuroprotectant FK506 inhibits glutamate-induced apoptosis of astrocytes in vitro and in vivo. *J. Neurochem*. 99(3): 965–975.

Takuma K., Baba A., Matsuda T. (2004) Astrocyte apoptosis: implications for neuroprotection. *Prog Neurobiol*. 72(2):111-127.

Túnez I., Drucker-Colín R., Jimena I., Medina F.J., Muñoz Mdel C., Peña J., Montilla P. (2006) Transcranial magnetic stimulation attenuates cell loss and oxidative damage in thestriatum induced in the 3-nitropropionic model of Huntington's disease. *J Neurochem*.97(3):619-630.

Uhl G.R. (1998) Hypothesis: the role of dopaminergic transporters in selective vulnerability of cells in Parkinson's disease *Ann Neurol*. 43(5):555-560.

- Van Rossum D., Hanisch U.K. (2004) Microglia. *Metab Brain Dis.* 19(3-4):393-411.
- Velazquez J.L.P., Frantseva M.V., Carlen P.L. (1997) In-vitro ischemia promotes glutamate-mediated free radical generation and intracellular calcium accumulation in hippocampal pyramidal neurones. *J Neurosci.* 17(23):9085–9094.
- Von Bernhardi R. (2007) Glial cell dysregulation: a new perspective on Alzheimer disease. *Neurotox Res.* 12(4):215-32.
- Wesselingh S.L, Gough N.M., Finlay-Jones J.J., McDonald P.J.(1990) Detection of cytokine mRNA in astrocyte cultures using the polymerase chain reaction *Lymphokine Res.* 9(2):177-185.
- Wilcock D.M., Lewis M.R., Van Nostrand W.E., Davis J., Previti M.L., Gharkholonarehe N., Vitek M.P., Colton C.A. (2008) Progression of amyloid pathology to Alzheimer's disease pathology in an amyloid precursor protein transgenic mouse model by removal of nitric oxide synthase 2 *The Journal Neurosci.* 28(7):1537-1545.
- Wilson J.X. (1997) Antioxidant defense of the brain: a role for astrocytes. *Can J Physiol Pharmacol* 75(1041):1149–1163.
- Willis S.A., Nisen P.D. (1996) Differential induction of the mitogen-activated protein kinase pathway by bacterial lipopolysaccharide in cultured monocytes and astrocytes *Biochem J.*313: 519-524.
- Wu R.M., Chiueh C.C., Pert A., Murphy D.L.(1993) Apparent antioxidant effect of l-deprenyl on hydroxyl radical formation and nigral injury elicited by MPP+ in vivo *Eur J Pharmacol.* 243(3):241-247.
- Xiao B.G., Bao W.J., Bai X.F., Link H.(1996) Induction of cytolysin mRNA in glial cells by IFN-gamma: a possible cytotoxic pathway in the CNS. *Neuroreport.* 8(1):329-333.
- Yankner B.A. (1996) Mechanisms of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neuro.*16(5):921-932.
- Zuccato C., Cattaneo E. (2007) Role of brain-derived neurotrophic factor in Huntington's disease. *Progress in Neurobiology.*81(5-6): 294-330.