



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00174

Matrícula: 2143800919

EFFECTO DE LA MODULACIÓN DEL RECEPTOR PARA CANNABINOIDE (RCB1) SOBRE MARCADORES BIOQUÍMICOS Y CONDUCTUALES DE NEUROTOXICIDAD ESTRIATAL INDUCIDOS POR EL ÁCIDO 3-NITROPROPIÓNICO (3-NP) EN RATAS

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 21 del mes de febrero del año 2017 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. NORMA EDITH LOPEZ DIAZ GUERRERO  
MTRA. ANA LAURA COLIN GONZALEZ  
DRA. JUANA VILLEDA HERNANDEZ  
DR. ARMANDO LUNA LOPEZ



MARISOL MAYA LOPEZ  
ALUMNA

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: MARISOL MAYA LOPEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

## APROBAR

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI  
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTA

DRA. NORMA EDITH LOPEZ DIAZ GUERRERO

VOCAL

MTRA. ANA LAURA COLIN GONZALEZ

VOCAL

DRA. JUANA VILLEDA HERNANDEZ

SECRETARIO

DR. ARMANDO LUNA LOPEZ

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD IZTAPALAPA



**Casa abierta al tiempo**

**“EFECTO DE LA MODULACIÓN DEL RECEPTOR PARA CANNABINOIDE 1  
(RCB1) SOBRE MARCADORES BIOQUÍMICOS Y CONDUCTUALES DE  
NEUROTOXICIDAD ESTRIATAL INDUCIDOS POR EL ÁCIDO 3-  
NITROPROPIÓNICO (3-NP) EN RATAS”**

**T E S I S**

Que para obtener el grado de  
**MAESTRA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**P R E S E N T A**

**QFB MARISOL MAYA LÓPEZ**

**COMITÉ TUTORAL**

**Co-Directores**

**DRA. MINA KÖNIGSBERG FAINSTEIN  
DR. ABEL SANTAMARÍA DEL ÁNGEL**

**Asesor Externo**

**DR. ARMANDO LUNA LÓPEZ**

**Febrero / 2017**

**“El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el nivel consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”**

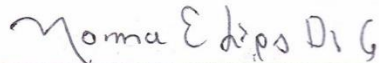
Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: 262025

## MIEMBROS DEL JURADO

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la tesis titulada: **“EFECTO DE LA MODULACIÓN DEL RECEPTOR PARA CANNABINOIDE 1 (RCB1) SOBRE MARCADORES BIOQUÍMICOS Y CONDUCTUALES DE NEUROTOXICIDAD ESTRIATAL INDUCIDOS POR EL ÁCIDO 3-NITROPROPIÓNICO (3-NP) EN RATAS”**, que presentó la **QFB Marisol Maya López**. El día 21 de Febrero del año 2017.

### Sinodales

Presidenta



**Dra. Norma Edith López Díaz Guerrero**  
Laboratorio de Bioenergética y  
Envejecimiento Celular  
Universidad Autónoma Metropolitana –  
Iztapalapa

Secretario



**Dr. Armando Luna López**  
Laboratorio de Envejecimiento y Estrés  
Oxidante  
Instituto Nacional de Geriátria

Vocal



**Dra. Juana Villeda Hernández**  
Laboratorio de Patología Experimental  
Instituto Nacional de Neurología y  
Neurocirugía

Vocal



**M. en C. Ana Laura Colín González**  
Dirección General: Adjunta Médica Banco  
de Tumores  
Instituto Nacional de Cancerología

## COMITÉ TUTORAL

### Co-Directora

#### **Dra. Mina Königsberg Fainstein**

Investigador Titular “C” de Tiempo Completo  
Laboratorio de Bioenergética y Envejecimiento Celular  
Departamento de Ciencias de la Salud  
Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa  
E-mail: [mkf@xanum.uam.mx](mailto:mkf@xanum.uam.mx)

### Co-Director

#### **Dr. Abel Santamaría del Ángel**

Investigador en Ciencias Médicas “F” de Tiempo Completo  
Laboratorio de Aminoácidos Excitadores  
Unidad De Investigaciones del Sistema Nervioso  
Instituto Nacional De Neurología y Neurocirugía  
E-mail: [absada@yahoo.com](mailto:absada@yahoo.com)

### Asesor Externo

#### **Dr. Armando Luna López**

Investigador en Ciencias Médicas “D”  
Laboratorio de Envejecimiento y Estrés Oxidante  
Subdirección de Investigación Biomédica  
Instituto Nacional de Geriátría  
E-mail: [allbioexp@yahoo.com](mailto:allbioexp@yahoo.com)

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Aminoácidos Excitadores del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suarez”, dirigido por el Dr. Abel Santamaría del Ángel.

Así como en el Laboratorio de Bioenergética y Envejecimiento Celular, en la Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa a cargo de la Dra. Mina Königsberg Fainstein.

## AGRADECIMIENTOS

La vida es un aprendizaje, en ella transcurre el tiempo, donde hay que caminar y correr, para llegar a una meta. Lo más importante de la vida, es encontrar gente brillante, que comparte su tiempo y sabiduría.

Es importante para mí agradecer el apoyo y las enseñanzas que me otorgaron durante todo este proceso. Y admiro, el talento, el trabajo, la nobleza, la atención, de mi comité, por transmitir a los estudiantes seguir aprendiendo y valorar nuestro trabajo.

Gracias, **Dr. Abel** por invitarme ser parte de su equipo de trabajo, ayudarme a generar este proyecto, y brindarme una bonita amistad.

Gracias **Dra. Mina** por aceptar ser parte de este proyecto, brindarme el tiempo para asesorar mis dudas; el espacio y material para completar los experimentos. Y por dirigir el trabajo para poder participar en este posgrado de Biología Experimental, aquí en la UAM.

Gracias **Dr. Armando** por aceptar ser parte de este proyecto por brindarme el tiempo para asesorar mis dudas y ayudarme con los experimentos.

También agradezco a los miembros del jurado, por el espacio que dieron para revisar el contenido de la tesis, darme sus observaciones y comentarios. Además porque también me ayudaron con los experimentos e interpretar mis resultados, para poder concluir este trabajo, lo mejor posible. Gracias: Dra. Norma, Dr. Armando, Dra. Juanita, Dra. Anita.

La ciencia es un trabajo en equipo. Porque para construir las ideas, es aprender de la experiencia de los demás. Tengo suerte por tener la oportunidad de estudiar en este posgrado aquí en la UAM, de recibir apoyo en los momentos de dificultad para entender los conceptos y aplicaciones de esta línea científica de Biología Experimental.

Gracias a mis compañeros de generación 2014-2016: Bety Mora, Bety Cabello, Memo, Wendoline, Fabiola, Mayra, Laura, Toño, Diana, Felipe, Juan, Gibran, Soraya, Arturo que me ayudaron durante la etapa de teoría y crítica para mi

Laboratorio de Bioenergética y Envejecimiento y Dra. Mina Königsberg, Agradezco por brindarme un espacio para trabajar y su amistad. También agradezco a Alejandro, a Paola, a Viridiana, a Pedro, y a Gibran porque siempre me ayudaron en el western-blot.

Gracias a mis compañeros: Anita, Gaby, Maricela, Carolina, Maria Eduarda, Ana Colpo, Dr. Edgar, del Laboratorio de Aminoácidos Excitadores y Dr. Abel Santamaría, porque siempre me ayudaron en los experimentos.

***Dedico esta tesis a mis PAPÁS,  
porque siempre han apoyado mis decisiones.  
Gracias por darme la vida.***

***No considero el estudio como una obligación,  
sino como una oportunidad para conocer  
el maravilloso mundo del saber. (Albert Einstein)***



## RESUMEN

Los receptores para cannabinoides 1 (RCB1) son parte del sistema endocannabinoide (SEC) y participan en diversas funciones del sistema nervioso central (SNC). En neuronas, los RCB1 inhiben la liberación del ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) y glutamato a nivel presináptico, mientras que a nivel postsináptico modulan la actividad de otros receptores que pueden ser GABAérgicos y glutamatérgicos, induciendo la hipofunción de receptores para N-metil-D-aspartato (NMDA). También se ha demostrado que participan en la modulación redox. El WIN 55,212-2 es un cannabinoide sintético con mayor afinidad a los RCB1 que se utiliza en la investigación para explorar los mecanismos del SEC. El ácido 3-nitropropiónico (3-NP) es una micotoxina derivada de hongos y plantas que bloquea irreversiblemente al complejo II mitocondrial, también conocido como succinato deshidrogenasa (SDH). El 3-NP inhibe la producción de ATP, aumenta la producción de radicales libres y favorece la excitotoxicidad indirecta por desregulación del voltaje neuronal, con la consecuencia activación de receptores tipo NMDA y el alto flujo de calcio que lleva a la muerte celular de neuronas GABAérgicas del estriado. El mecanismo de daño ejercido por el 3-NP produce características semejantes de la enfermedad de Huntington (EH). La EH es un trastorno cerebral autosómico dominante producido por la mutación de la huntingtina al presentar varias repeticiones del trinucleótido citosina-adenina-guanina (CAG) que codifica para el aminoácido glutamina. En este trabajo se evaluó si la posible activación de los RCB1 por el agonista selectivo WIN 55,212-2 (1 mg/kg i.p x 6 días) puede proteger el tejido estriatal de ratas Wistar adultas jóvenes (280–320 g) contra el daño inducido por el 3-NP (500 nmol/ $\mu$ L,

intraestriatal bilateral). Se estudiaron marcadores conductuales y bioquímicos. Los resultados muestran que la actividad motora, evaluada a través de la estimación de movimientos horizontales, tiempo gastado en el centro del dispositivo y tiempo total en reposo, se manifestó como hiperactividad vinculada al daño provocado por 3-NP. El tratamiento con WIN 55,212-2 disminuyó la hiperactividad inducida por el 3-NP. En el estudio histológico por H&E se observó un incremento del 82 % en el daño y muerte celular inducidos por 3-NP, evidenciado por picnosis y retracción nuclear, mientras que el WIN 55,212-2 previno este daño celular de manera significativa. La prueba bioquímica de lipoperoxidación indicó mayor oxidación de lípidos por radicales libres inducida por 3-NP y una protección significativa del daño a lípidos por el WIN 55,212-2. Se encontró que el empleo del WIN 55,212-2 como agonista selectivo de RCB1 generó protección estriatal contra la toxicidad inducida por el 3-NP, sugiriendo que el SEC participa activamente en mecanismos que modulan la motricidad y la actividad redox en un modelo farmacológico de la EH. Por lo tanto, el SEC constituye un factor de protección ante la toxicidad del 3-NP a través de mecanismos de prevención de daño neuronal por estrés oxidante.

## **ABSTRACT**

CB1 receptors (also known as cannabinoid 1 receptors) are part of the endocannabinoid system (ESC) and participate in different physiological functions; they are abundant in the Central Nervous System and are mainly located in neuronal cells, where they regulate the synaptic functions at the presynaptic levels. Among these functions, CB1 inhibit the release of neurotransmitters such as glutamate (Glu) and gamma-aminobutyric acid (GABA). At the presynaptic level, they modulate the activity of GABAergic and glutamatergic receptors, inducing hypofunction of N-methyl-D-aspartate receptors (NMDAr). CB1 receptors also participate in redox modulation. In this work, some processes linked with CB1 activity were evaluated in a rodent model of Huntington's disease induced by the intrastriatal infusion of 3-nitropropionic acid (3-NP). 3-NP is a micotoxin derived from mushrooms and plants that blocks irreversibly the mitochondrial complex II (succinate dehydrogenase), thus inducing a decrease of ATP levels and an increase of free radical formation, favoring the process of secondary excitotoxicity due to neuronal depolarization and the subsequent NMDAr overactivation, which in turn allow a massive  $Ca^{2+}$  influx to further stimulate the death of striatal GABAergic neurons. First, we evaluated whether the CB1 receptor activation by the selective synthetic agonist of CB1, WIN 55,212-2, is able to protect the rat striatal tissue against the damage induced by 3-NP. For this purpose, WIN 55,212-2 (1 mg/kg i.p. x 6 days) was administered as a pretreatment to rats, and behavioral and biochemical parameters related with 3-NP-induced (500 nmol/ $\mu$ l, intrastriatal bilateral infusion) toxicity were evaluated in adult male Wistar rats

(280-320 g). Locomotor activity was estimated by the open field test, whereas the extent of tissue damage was evaluated by the hematoxylin & eosin (H&E) staining. Oxidative stress was measured by the thiobarbituric acid-reactive substances assay of lipid peroxidation. Our results show that motor activity -assessed as the number of horizontal movements, the time spent in the center of the device and the total resting time- was characterized by hyperactivity in those rats exposed to 3-NP infusion, whereas animals pretreated with WIN 55,212-2 + 3-NP displayed a normal motor activity. We also found that there was an increase of 82 % in tissue damage and cell death in animals exposed to 3-NP, mostly evidenced by pyknosis, whereas rats receiving WIN 55,212-2 as a pre-treatment to 3-NP showed a preserved striatal tissue. Lipid peroxidation was increased in the striatal tissue of 3-NP-treated rats, and a significant prevention of oxidative damage to lipids was achieved by the WIN 55,212-2 pre-treatment. In general terms, we found that WIN 55,212-2 prevented the striatal damage and toxicity induced by 3-NP, thus suggesting that the ECS participates actively in mechanisms modulating motor and redox activities in a pharmacological model of Huntington's disease. Therefore, the ECS stimulation constitutes an important pharmacological target to induce protection against 3-NP-induced toxicity possibly by activation of survival signals and/or modulation of redox activity.

## ABREVIATURAS

<b>·OH</b>	Radical hidroxilo
<b>·ON</b>	Óxido nítrico
<b>3-NP</b>	Ácido 3-Nitropropiónico
<b>3-NPA</b>	3-Nitropropionato
<b>AMPA</b>	$\alpha$ -Amino-3-hidroxy-5-metilsoxazole-4-propionato
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>BDNF</b>	Factor neurotrófico derivado del cerebro
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Calcio
<b>RCB</b>	Receptor cannabinoide
<b>RCB1</b>	Receptor cannabinoide 1
<b>RCB2</b>	Receptor cannabinoide 2
<b>Cu<sup>+</sup></b>	Cobre
<b>EH</b>	Enfermedad de Huntington
<b>ERN</b>	Especies reactivas de nitrógeno
<b>ERO</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>FAD</b>	Flavina adenina dinucleótido
<b>GABA</b>	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
<b>GPx</b>	Glutación peroxidasa
<b>H&amp;E</b>	Hematoxilina y eosina
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno

<b>HINT-1</b>	Proteína de unión a nucleótidos de triadas de histidina 1
<b>KA</b>	Ácido kainico
<b>MDA</b>	Malondialdehído
<b>mGluR</b>	Metabotrópicos de glutamato
<b>Mn<sup>2+</sup></b>	Manganeso
<b>Na<sup>+</sup></b>	Sodio
<b>NADH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido
<b>NEM</b>	Neuronas espinosas medianas de proyección
<b>NMDA</b>	Receptor N-metil-D-aspartato
<b>NOS</b>	Sintasa de óxido nítrico
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>	Oxígeno singulete
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Superóxido
<b>P3N</b>	Propionato-3-nitronato
<b>Prx</b>	Peroxirredoxinas
<b>QUIN</b>	Ácido quinolínico
<b>ROOH</b>	Peróxidos orgánicos
<b>SDH</b>	Succinato deshidrogenasa
<b>SEC</b>	Sistema Endocannabinoide
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>SOD</b>	Superóxido dismutasa
<b>TBARS</b>	Sustancias reactivas de ácido tiobarbitúrico
<b>Zn<sup>+</sup></b>	Zinc

**$\Delta^9$ -THC**  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol

**DA** Dopamina

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1 <i>LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON (EH)</i> .....	1
1.2 <i>CUERPO ESTRIADO</i> .....	3
1.3 <i>ÁCIDO-3-NITROPROPIÓNICO (3-NP)</i> .....	5
1.3.1 <i>HIPÓTESIS DE LA UNIÓN DEL 3-NP A LA ENZIMA SUCCINATO DESHIDROGENASA</i> .....	7
1.3.2 <i>EFFECTOS Y MECANISMOS IMPLICADOS EN LA TOXICIDAD DEL 3-NP</i> .....	8
1.4 <i>ÁCIDO QUINOLÍNICO (QUIN)</i> .....	9
1.5 <i>ESTRÉS OXIDANTE</i> .....	10
1.6 <i>EXCITOTOXICIDAD</i> .....	12
1.7 <i>SISTEMA ENDOCANNABINOIDE (SEC)</i> .....	15
1.7.1 <i>RECEPTORES RCB1</i> .....	18
1.7.2 <i>WIN 55,212-2</i> .....	19
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	<b>21</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>26</b>
<b>4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN</b> .....	<b>27</b>
<b>5. HIPÓTESIS</b> .....	<b>28</b>
<b>6. OBJETIVOS</b> .....	<b>29</b>
6.1. <i>OBJETIVO GENERAL</i> .....	29
6.2. <i>OBJETIVOS PARTICULARES</i> .....	29
<b>7. METODOLOGÍA</b> .....	<b>30</b>
7.1. <i>ANIMALES</i> .....	30



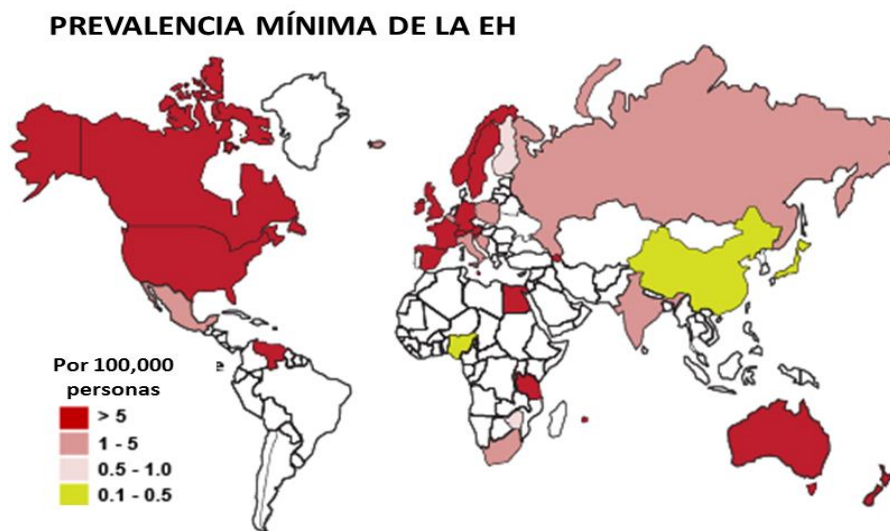
7.2	<i>DISEÑO EXPERIMENTAL – TRATAMIENTOS</i> .....	30
7.2	<i>GRUPOS EXPERIMENTALES</i> .....	31
7.4	<i>EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD MOTORA</i> .....	32
7.5	<i>ANÁLISIS HISTOLÓGICO</i> .....	32
7.6	<i>ENSAYO DE INMUNOFLUORESCENCIA PARA CO-LOCALIZACIÓN DE CB1, NR1 Y NeuN EN EL ESTRIADO</i> .....	33
7.7	<i>ENSAYO DE LIPOPEROXIDACIÓN</i> .....	34
7.8	<i>WESTERN BLOT</i> .....	35
7.9	<i>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</i> .....	37
<b>8.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>38</b>
8.1.	<i>LA POSIBLE ESTIMULACION DE CB1 POR WIN 55,212-2 DISMINUYÓ LA ALTERACIÓN CONDUCTUAL EN RATAS LESIONADAS CON 3-NP</i> .....	38
8.2	<i>EL WIN 55,212-2 PRESERVÓ LA INTEGRIDAD CELULAR ESTRIATAL DE RATAS EXPUESTAS A 3-NP</i> .....	41
8.3	<i>EL WIN 55,212-2 PREVINÓ LA DISMINUCIÓN EN LA DENSIDAD NEURONAL ESTRIATAL INDUCIDA POR 3-NP, Y AUMENTÓ LA EXPRESIÓN RELATIVA DE RCB1 Y NMDAR</i> .....	44
8.4	<i>EL WIN 55,212-2 DISMINUYÓ LOS NIVELES DE NR1 Y AUMENTÓ LOS NIVELES DE CB1 EN EL MODELO TÓXICO CON 3-NP EN RATAS</i> .....	48
8.5	<i>EL WIN 55,212-2 PREVIENÓ LA LIPOPEROXIDACIÓN INDUCIDA POR EL 3-NP EN EL ESTRIADO DE RATA</i> .....	50
<b>9.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>51</b>
<b>10.</b>	<b>CONCLUSION</b> .....	<b>61</b>
<b>11.</b>	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>62</b>
<b>12.</b>	<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>63</b>

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1 LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON ( EH )**

La EH se caracteriza por la presencia de movimientos prolongados e involuntarios del cuerpo, por la degeneración de neuronas GABAérgicas, tales como las neuronas espinosas medianas de proyección (NEM) del cuerpo estriado que participan principalmente en la modulación motora (Kreitzer y Malenka, 2008).. Esta enfermedad neurodegenerativa es un trastorno cerebral autosómico dominante producido por una mutación en el gen de la huntingtina que presenta una expansión del trinucleótido citosina-adenina-guanina (CAG). Este trinucleótido codifica para el aminoácido no esencial glutamina en la región codificante del gen IT15 localizado en la región 16.3 del brazo corto del cromosoma 4 (4p16.3) (Túnez et al., 2010) . La huntingtina se expresa en todas las células universalmente y está involucrada en varios procesos celulares del cerebro. Por ejemplo, la huntingtina modula la transcripción de BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro) que favorece la sobrevivencia celular, el transporte vesicular, la regulación de la apoptosis, la endocitosis y la exocitosis de neurotransmisores, la plasticidad sináptica, procesos de señalización y el metabolismo energético mitocondrial. La mutación de la huntingtina induce su agregación en la célula, obstruye el proceso de señalización, bloquea factores de transcripción, favorece la disfunción mitocondrial, contribuye a la excitotoxicidad y a la degeneración del cuerpo estriado (Bossy et al., 2008; Kreitzer y Malenka 2008). La EH es una enfermedad rara, con una prevalencia media de entre

de 4 y 8 afectados por cada 100,000 personas. Este desorden es más frecuente en personas adultas que en jóvenes, y una vez diagnosticado, el paciente tiene entre 15 y 17 años más de vida (Domaradzki, 2015; Mayer y Orth, 2014; Warby et al., 2011) (Figura 1 y Tabla 1; se describe la prevalencia de la EH).



**Figura 1.** Esquema geográfico del padecimiento de la enfermedad de Huntington (Warby et al., 2011).

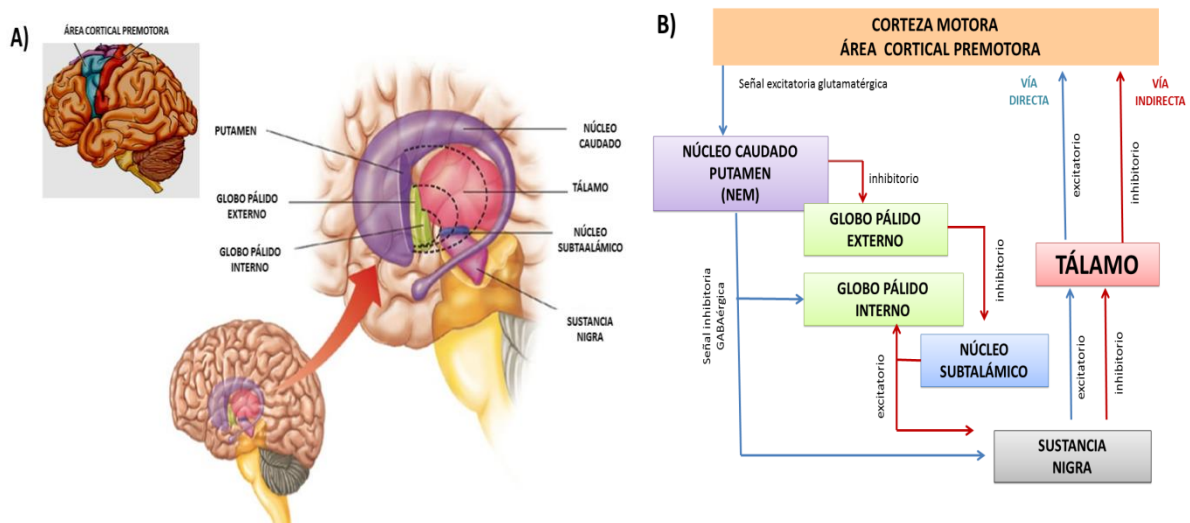
**Tabla 1. Prevalencia de la EH**

<b>LUGAR / AÑO</b>	<b>REFERENCIA</b>	<b>NÚMERO DE PERSONAS CON LA EH</b>
México 2010	Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN).	8,000
México 2016	Asociación Mexicana de la enfermedad de Huntington I.A.P	12,000
Mundial 2016	The potential Therapeutic Role of the Cannabinoid System in Neurological Disorders of the Basal Ganglia: An Overview (Aguilera y Santamaría, 2016).	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1-100 casos por millón en Europa y norte de América</li> <li>• 7 casos por millón en Hong Kong, Japón.</li> <li>• Columbia Británica en Canadá.</li> <li>• Maracaibo en Venezuela</li> </ul>

## **1.2 CUERPO ESTRIADO**

Los Ganglios Basales se dividen en cuerpo estriado, globo pálido, putamen, núcleo subtalámico y sustancia nigra (Figura 2A). El cuerpo estriado se encuentra en la parte del telencéfalo, y está formado por un núcleo caudado y un núcleo lenticular (globo pálido y putamen). Se caracteriza por la presencia de estriosomas y NEM, que participan en un circuito funcional formado por la corteza - ganglios basales - tálamo – corteza y que modula la conducta motora mediante las vías directa e indirecta (Waldvogel y Full, 2015; Kreitzer y Malenka, 2008). La vía directa es la proyección de

NEM estriato-nigral con alta expresión de receptores de dopamina D1 y receptores muscarínicos M4 en el estriado; esta vía recibe señales aferentes excitatorias de la corteza sensorimotora. Estas neuronas mandan señales GABAérgicas a las neuronas del globo pálido interno y a la sustancia nigra pars reticulata, se conectan a los núcleos motores del tálamo y dirigen sinapsis excitatorias a la corteza para la activación de movimientos en el circuito premotor cortical. Por su parte, la vía indirecta es la proyección de NEM estriato-palidal que exhibe una alta expresión de receptores de dopamina D2 y adenosina A2A, y sus axones están localizados junto a neuronas GABAérgicas del globo pálido externo. Estas neuronas inhibitorias se relacionan con neuronas glutamatérgicas del núcleo subtalámico. Los axones de las neuronas subtalámicas se dirigen al globo pálido interno y a la sustancia nigra pars reticulata, donde forman sinapsis excitatorias en las neuronas inhibitorias, generando así el efecto neto de inhibir la proyección de neuronas tálamo-corticales para detener los movimientos no deseados del circuito premotor cortical (Figura 2B) (Cepeda et al., 2008; Kreitzer y Malenka, 2008). En la EH ocurre la degeneración del cuerpo estriado, por lo que para modelar este tipo de daño celular se han empleado modelos tóxicos como el 3-NP y el ácido quinolínico (QUIN), que favorecen la disfunción motora (Santamaría et al., 2001).



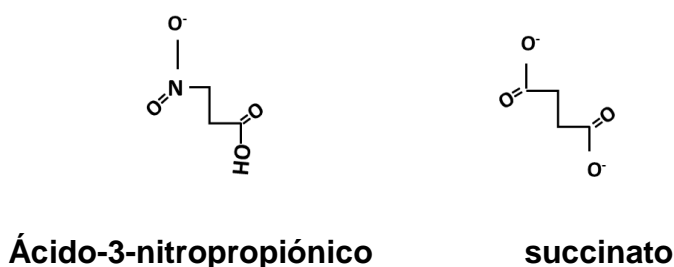
**Figura 2. Circuito de regulación motora en los ganglios basales:**

A) Representación esquemática de los ganglios basales. B) Circuito de los ganglios basales que modulan la motricidad a través de las NEM por vía directa (flechas azules) e indirecta (flechas rojas). (Kreitzer y Malenka, 2008; <https://kin450-neurophysiology.wikispaces.com/Huntington%27s+Disease>).

### 1.3 ÁCIDO-3-NITROPROPIÓNICO (3-NP)

El 3-NP es una toxina derivada de hongos (*aspergillus*, *artrinium*) y plantas (*astragalus sp.*, *indigofera endecaphylla*). Esta toxina es un análogo isoeléctrico (compuesto con número de electrones de valencia y la misma estructura) del succinato (Figura 3). El 3-NP es un etano que presenta en sus extremos un grupo nitro y un grupo carboxilo. El succinato es una estructura alifática, un etano que tiene

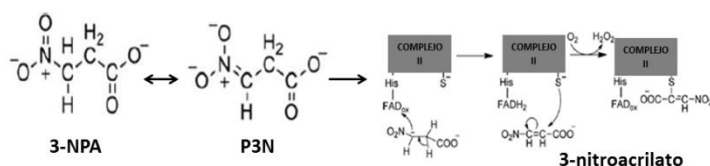
dos grupos carboxilos en sus extremos (Francis et al., 2013). Es un metabolito que forma parte del transporte de electrones y es oxidado por la enzima SDH. Esta enzima reduce al grupo prostético flavina adenina dinucleótido ( $FAD_{ox.} \rightarrow FADH_{2red.}$ ) para dar lugar al siguiente metabolito, el fumarato, del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. La enzima SDH también funciona como el complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial, transfiriendo electrones al complejo III vía de la ubiquinona para el bombeo de protones en el espacio intermembranal, resultando en un gradiente electroquímico que es utilizado para activar la enzima ATP sintasa para la síntesis de ATP, que es la molécula de energía utilizable para la célula. Por su parte, la toxina 3-NP participa como un inhibidor de la enzima SDH y lo hace de manera irreversible (Saraste, 1999; Acin y Enriquez, 2014).



**Figura 3.** Estructura molecular del 3-NP y del succinato (Francis et al., 2013).

### 1.3.1 HIPÓTESIS DE LA UNIÓN DEL 3-NP A LA ENZIMA SUCCINATO DESHIDROGENASA

Se dice que la flavina tiene reactividad con los nitratos, por ello se pensaba que el enlace irreversible se formaba por el nitroetano del 3-NP que se unía con el N(5) de la flavina, dado que los nitroalcanos son más reactivos. En un subsecuente estudio por Coles, quien usó la enzima aislada de corazón de res, se demostró la inactivación de SDH a través de las estructuras alcalinizadas del 3-NP. Estas estructuras son propionato-3-nitronato (P3N) y 3-Nitropropionato (3-NPA), las cuales reducen el grupo prostético de la flavina ( $FAD_{ox}$  a  $FADH_2$ ) para formar 3-nitroacrilato, el cual va a formar enlace covalente con los grupos tioles de la enzima SDH, mientras que el oxígeno favorece la unión, formando  $H_2O_2$  (Alston et al., 1977; Coles et al., 1979) (Figura 4).



**Figura 4. 3-NPA como inhibidor irreversible de la enzima succinato deshidrogenasa (SDH).** Estructuras moleculares del 3-nitropropionato (3-NPA) y propionato-3-nitronato (P3N), y enlace covalente con el complejo II (SDH) (Francis et al., 2013).



### **1.3.2. EFECTOS Y MECANISMOS IMPLICADOS EN LA TOXICIDAD DEL 3-NP**

Como se mencionó en el apartado anterior, el principal mecanismo propuesto para la función del 3-NP es a través de su papel como inhibidor irreversible del complejo II (SDH) de la cadena de transporte de electrones (Nishimura et al., 2008; Francis et al., 2013). Existen estudios donde se ha sugerido que la inhibición de este complejo induce la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), baja el consumo de oxígeno, y activa mecanismos de apoptosis que aún no son completamente conocidos (Kluckova et al., 2015). El enlace covalente del 3-nitroacrilato con la enzima SDH sugiere que el oxígeno favorece dicha unión, dando lugar a la formación de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), un precursor para producir al agresivo radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ), y para la formación directa de otras ERO como el anión superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ) (Francis et al., 2013). La inhibición del complejo II disminuye la síntesis de ATP; además, el daño por 3-NP induce mecanismos de muerte celular por apoptosis y activa la cascada de Apaf-1-caspasa 9 (Túnez et al., 2010). La disfunción mitocondrial es un factor clave para alterar la sinapsis neuronal, la cual genera eventos de excitotoxicidad tales como el incremento de calcio citoplasmático, y la activación de receptores glutamatérgicos tipo NMDA y de receptores D1. La motricidad modulada por los ganglios basales es una función fundamental que requiere mucha energía, y por lo tanto, esta región debe contener una mayor cantidad de mitocondrias. Debido a esta circunstancia, cuando el 3-NP ingresa al sistema por diferentes vías de administración (cutánea, intraperitoneal, intracerebral),

alcanzará al estriado y dañará las mitocondrias, por lo que la motricidad es afectada, generando así hipercinesia temprana e hipocinesia tardía, dado el carácter progresivo degenerativo del modelo tóxico sobre el cuerpo estriado y otras regiones del SNC. En este punto cabe enfatizar que la DL<sub>50</sub> para el 3-NP en ratas adultas es de 67 mg/kg de peso, una dosis muy por arriba de la necesaria para inducir suficiente degeneración neuronal para evocar los efectos relatados con anterioridad en modelos experimentales (Borlongan et al., 1995; Francis et al., 2013).

#### **1.4 ÁCIDO QUINOLÍNICO (QUIN)**

El QUIN o ácido 2,3-piridin dicarboxílico es un metabolito de la vía de la kinurenina involucrado principalmente en la degradación del triptófano. En enfermedades neurodegenerativas, los niveles del QUIN incrementan y la molécula actúa como un agonista competitivo del glutamato sobre los receptores tipo NMDA, sosteniendo la activación de este receptor. De esta manera, niveles altos de QUIN pueden desencadenar desórdenes neurológicos que involucran excitotoxicidad y estrés oxidante a través de dichos receptores, lo cual es muy común en las enfermedades neurodegenerativas. El uso del QUIN a nivel estriatal en ratas favorece la generación de alteraciones motoras, tales como las observadas en la EH (Colin et al., 2014).

## **1.5 ESTRÉS OXIDANTE**

El estrés oxidante se define como el desequilibrio entre la producción de agentes oxidantes (que son las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (ERO y ERN), respectivamente) y la disminución de enzimas antioxidantes y elementos no enzimáticos antioxidantes. Las ERO y ERN son moléculas inestables y altamente reactivas que pueden ser radicales libres al presentar un electrón desapareado en su último orbital, como  $O_2^-$ ,  $\cdot OH$ , oxígeno singlete ( $^1O_2$ ), y óxido nítrico ( $\cdot ON$ ). También hay especies no radicales, como  $H_2O_2$ , ozono ( $O_3$ ), peróxidos orgánicos (ROOH), anión nitroxilo ( $NO^-$ ), y peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) (Königsberg, 2008).

Cabe señalar que mientras estas especies generalmente son inductoras de daño oxidativo en procesos patológicos, las ERO y ERN también son moléculas generadas bajo condiciones fisiológicas controladas de concentración y tiempo, y participan en la señalización para la muerte celular, como sensores de proteínas para activar factores de transcripción, para la síntesis de proteínas de regulación inmunológica como las citocinas, y proteínas de crecimiento como IL-2, IL-8, entre otras funciones (Gómez et al., 2008). En términos generales, la presencia de ERO y ERN durante el desarrollo neuronal del SNC está vinculada con la señalización celular y la inducción de apoptosis selectiva “positiva”.

En cambio, en condiciones patológicas, el incremento exacerbado de ERO y/o ERN favorece el daño celular oxidando a biomoléculas lipídicas, carbohidratos, proteínas y

ácidos nucleicos y conduce a la disfunción celular. El oxígeno es el principal precursor para la formación de ERO y la mitocondria es una fuente de producción de estas especies debido a la fuga de electrones ( $e^-$ ) de la cadena respiratoria, a través de una serie de reacciones redox (oxidación: elementos que donan  $e^-$  ó H, y aceptan oxígeno. Reducción: elementos que reciben  $e^-$  ó H, y donan oxígeno), donde hay una transferencia de  $e^-$  en los grupos prostéticos de los complejos proteicos anfipáticos que están en la membrana interna mitocondrial; estos son: NADH deshidrogenasa (complejo I), succinato deshidrogenasa (complejo II), ubiquinona citocromo c oxidoreductasa (complejo III), y citocromo c oxidasa (complejo IV) (Miranda y Königsberg, 2008; Königsberg et al., 2013). Esta transferencia de  $e^-$  en los cuatro complejos genera un gradiente electroquímico de protones en el espacio intermembranal por la reducción de los complejos I, III y IV, que ayuda a la reducción del oxígeno molecular ( $O_2$ ) para la formación de  $H_2O$  en el complejo IV. Además, el gradiente electroquímico es importante para la síntesis de ATP, activando al complejo V ( $F_1F_0$  ATPasa ó ATP sintetasa). Todo este mecanismo en la mitocondria es llamado fosforilación oxidativa (Saraste, 1999).

Durante la síntesis de ATP se forma el anión  $O_2^{\cdot-}$ , el cual a su vez se reduce a  $H_2O_2$  en presencia de la enzima superóxido dismutasa (SOD), que es una enzima antioxidante con cofactores  $Cu^+$ ,  $Zn^+$ ,  $Mn^{2+}$ , donde el cofactor indica el lugar que tiene en la célula: SOD  $Cu^+/Zn^+$  está en el citoplasma y espacio intermembranal de la mitocondria, mientras que SOD  $Mn^{2+}$  está en la matriz mitocondrial. El  $H_2O_2$ , mediante la reacción de Fenton, oxida a metales de transición como Fe (II) ó Cu (I), formando un radical  $\cdot OH$  y un anión hidroxilo ( $^{\cdot}OH$ ). El  $\cdot OH$  es de muy alta energía y

puede oxidar fácilmente a biomoléculas. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  mitocondrial es reducido en una molécula de agua por la enzima glutatión peroxidasa (GPx) ó por peroxirredoxinas (Prx). La GPx depende de la oxidación del glutatión reducido (GSH) a glutatión oxidado (GSSG), y este a su vez es reducido por la enzima glutatión reductasa (GR). Las peroxirredoxinas (Prx) dependen de la reducción de tiorredoxina-2 (Trx) por la enzima tiorredoxina reductasa-2 (TrxR), y estas enzimas dependen a su vez de NADPH (Murphy, 2009). Otras fuentes de producción de ERO como el  $\text{O}_2^{\cdot-}$  son: NADPH oxidasa, xantina oxidasa, y lipooxigenasa. La enzima sintasa óxido nítrico (NOS) se encarga de producir  $\cdot\text{ON}$  a partir del rompimiento de la arginina y citrulina, participando en la vasodilatación. El  $\cdot\text{ON}$ , al unirse con el  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , forma una molécula oxidante y nitrante muy fuerte conocida como peroxinitrito ( $\text{ONOO}^{\cdot-}$ ) (Königsberg, 2008). El daño a biomoléculas por la formación de radicales libres puede inducir la peroxidación de membranas mitocondriales y celulares, que están fundamentalmente formadas de fosfolípidos (fosfatidilinositol, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, cardiolipinas). Los productos de la lipoperoxidación pueden ser aldehídos llamados 4-hidroxinonenal (HNE) y malondialdehído (MDA), los cuales reaccionan con proteínas, generando mutaciones y disfunción celular (Barrera et al., 2016).

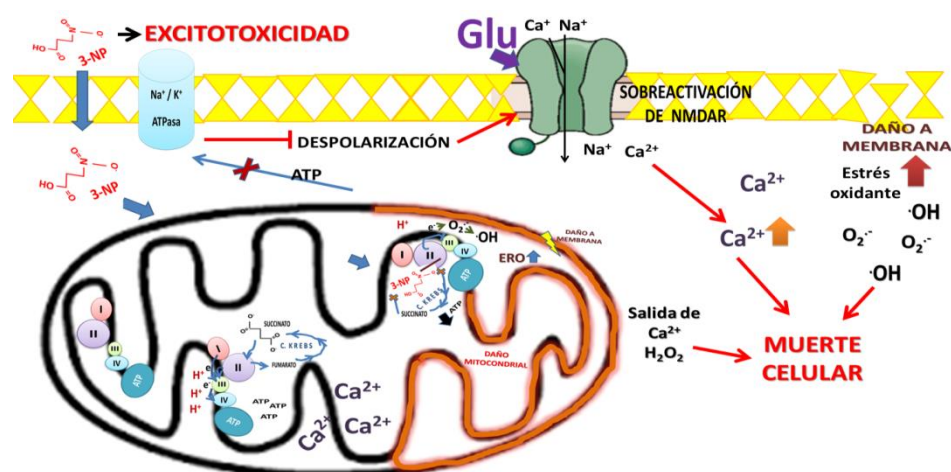
## **1.6 EXCITOTOXICIDAD**

La excitotoxicidad es un proceso patológico que induce lesión y muerte neuronal por acciones tóxicas de aminoácidos excitatorios como el glutamato, y se acompaña del

flujo excesivo de iones de carga positiva al interior de la célula, como son  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$ . El  $\text{Ca}^{2+}$  se considera particularmente neurotóxico en concentraciones elevadas porque activa enzimas que degradan proteínas, lípidos, azúcares y ácidos nucleicos. El glutamato es el neurotransmisor más importante de las sinapsis excitatorias, pero la excesiva activación de receptores glutamatérgicos (GluR) por este ligando resulta en la disfunción celular y muerte neuronal. Los efectos excitatorios del glutamato son ejercidos por la activación de tres tipos de receptores ionotrópicos que tienen asociados canales iónicos permeables a cationes. También existen diferentes tipos de receptores metabotrópicos glutamatérgicos que están acoplados a proteínas G. Los canales iónicos permeables a cationes activados por glutamato son NMDA,  $\alpha$ -amino-3-hidroxy-5-metiloxazol-4-propionato (AMPA) y ácido kaínico (KA). La activación de NMDA, especialmente de la subunidades NR1 y NR2B, conduce a un incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$  intracelular que activa enzimas catabólicas, lo que a su vez puede desencadenar cascadas apoptóticas y necróticas; estos efectos incluyen la despolarización, la activación de caspasas, la producción de ERO y ERN, y la toxicidad celular. Los receptores no-NMDA, como los AMPA, son muy poco permeables a  $\text{Ca}^{2+}$  y más permeables a  $\text{Na}^+$ . El KA puede inducir vías de autofagia y activación de enzimas lisosomales a través de estos receptores. Los receptores mGluR, principalmente los mGluR1 y mGluR5, activan la vía de transducción de señales inositol/trifosfato (IP3)/ $\text{Ca}^{2+}$  para la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular del retículo endoplásmico (Fan y Raymond, 2007; Dong et al, 2009).

También se presenta excitotoxicidad por la despolarización excesiva de las membranas postsinápticas; esto resulta por el desbalance osmótico en el flujo de

iones  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y de agua. El incremento de ERO y la disfunción mitocondrial por los niveles bajos de síntesis de ATP, favorecerán la despolarización de la membrana por la pérdida de la función de las ATPasas de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  y a la consecuente activación de receptores NMDA sensibles a voltaje, en un proceso conocido como excitotoxicidad secundaria (Túnez et al., 2010) (Figura 5).



**Figura 5. La toxina 3-NP produce excitotoxicidad secundaria y daño mitocondrial.** Se esquematiza el proceso de excitotoxicidad secundaria inducido por daño mitocondrial por la toxina 3-NP, la micotoxina que inhibe la función de la enzima SDH, desencadena la formación de EROS, la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol, la baja síntesis de ATP y la despolarización membranal. Esto facilita que receptores para NMDA sean abiertos, permitiendo la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y activando mecanismos de muerte celular (Túnez et al., 2010; Kluckova et al., 2015).

## 1.7 SISTEMA ENDOCANNABINOIDE (SEC)

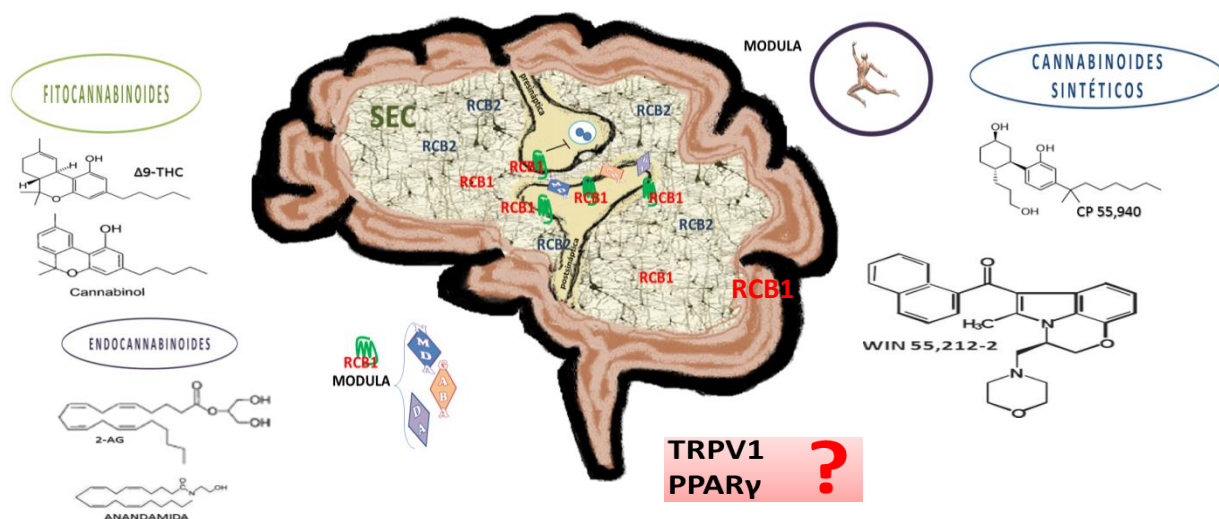
El sistema endocannabinoide (SEC) representa un importante campo de estudio para el desarrollo de agentes terapéuticos para aliviar síntomas y controlar la progresión de enfermedades en numerosas patologías del SNC, incluyendo dolor crónico, desorden alimenticio, tumores cerebrales y enfermedades neurodegenerativas. Además, participa en diversas funciones tales como la memoria, la función cognitiva, la motricidad, el sueño, la reproducción, y la percepción al dolor (ver figura 6, esquema de la importancia del SEC en el SNC). Este sistema fue descubierto por Mechoulam y Gaoni, quienes en 1964 aislaron un componente de la planta *cannabis sativa* (comúnmente llamada marihuana): el  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC). A partir de este compuesto se dio a conocer el SEC por sus propiedades fisiológicas y farmacológicas. El SEC está formado por varios tipos de receptores y tiene sus ligandos particulares. Los receptores más estudiados son RCB1 y RCB2, que se encuentran acoplados a la proteína G (Gi/Go), seguidos de los receptores acoplados a proteínas G 35 y 55 (GPR35 y GPR55), y el receptor de potencial transitorio Vanilloide 1 (TRPV1) (Colín et al., 2016). Los receptores RCB1 están presentes en tejidos periféricos como los pulmones, el sistema vascular, los músculos, el tracto gastrointestinal, y órganos reproductivos. Su localización en el SNC se da en neuronas de corteza, hipocampo, ganglios basales, hipotálamo, cerebelo, amígdala y médula espinal. Los receptores RCB2 se encuentran en tejidos periféricos como el bazo, huesos, y piel, y están presentes en el sistema inmune del SNC, abundando en astrocitos y microglia (Howlett et al., 2002; Fernandez et al., 2011).



Diferentes ligandos que se unen a estos receptores RCB1 y RCB2 incluyen los fitocannabinoides, los endocannabinoides, y los cannabinoides sintéticos. Entre los fitocannabinoides, el  $\Delta^9$ -THC es el producto primario de la planta *cannabis sativa*, y se ha considerado el principal compuesto psicotrópico y agonista parcial de los dos receptores. El cannabino (CBN) es derivado del  $\Delta^9$ -THC, es ligeramente psicoactivo, es un sedante y un calmante. El cannabidiol (CBD) es el segundo producto del  $\Delta^9$ -THC, no es psicoactivo, modera los efectos del  $\Delta^9$ -THC, y tiene mayor afinidad por RCB2, además de los receptores nucleares a PPAR $\gamma$ . Los endocannabinoides son lípidos llamados N-acetanolamidas. La anandamida (ANA) es derivado del ácido araquidónico, y junto con otros endocannabinoides como el 2-araquidonoilglicerol (2-AG), el 2-araquidonoilgliceroleter, y la oleamida (OLE), se unen al RCB1, generando respuestas de sedación, hipotermia, antinocicepción, y modulación del sueño. Existe además una gran variedad de cannabinoides sintéticos, entre los cuales destacan el CP 55,940, la metanandamida, el JW-H015, y el WIN 55,212-2, que son los más estudiados en investigación y se han caracterizado por ser agonistas de ambos receptores (Howlett et al., 2002; Mendez et al., 2008) (Figura 6).

Asimismo, se han caracterizado las funciones de los receptores a cannabinoides. Los RCB1 se encuentran en ambas terminales sinápticas: en el axón presináptico para modular la liberación de neurotransmisores, y en el axón postsináptico, a un lado de receptores glutamatérgicos, GABAérgicos, dopaminérgicos, noradrenérgicos y serotoninérgicos, modulando su actividad. Los RCB2 modulan mecanismos inflamatorios tales como la expresión de interleucinas 10 y 1 (IL10 e IL1) y el factor de crecimiento transformante  $\beta$ 1 (TGF-  $\beta$ 1), y disminuyen los niveles de  $\cdot$ ON, de ERO

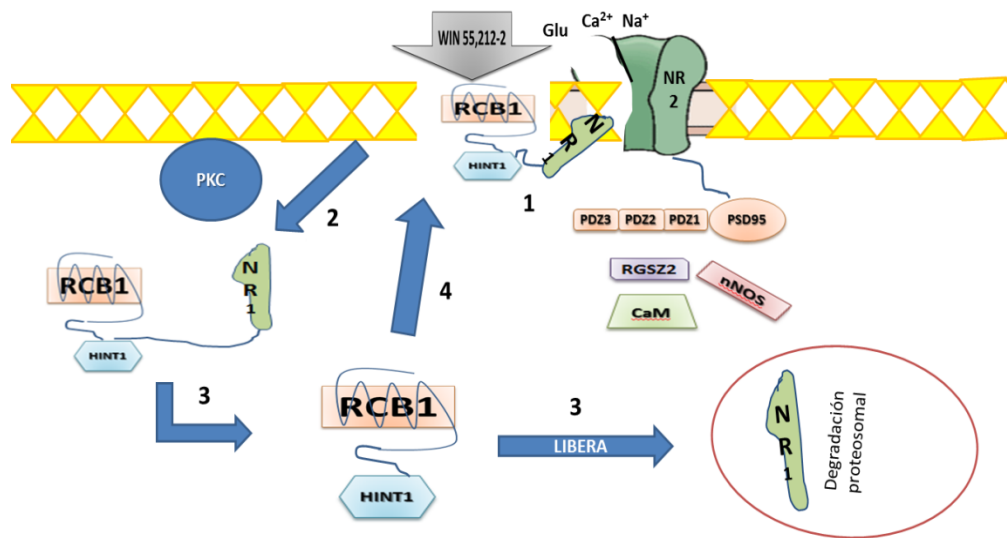
y de citocinas pro-inflamatorias (Fernández et al., 2011). Además, es importante mencionar que la continua activación de estos receptores o el uso no terapéutico en humanos puede ocasionar cuadros psicóticos y esquizofrénicos, presentando alucinaciones visuales y auditivas, aislamiento social, y problemas cognitivos (en pensamiento, aprendizaje y memoria) (Sánchez et al., 2014)



**Figura 6. Representación del sistema endocannabinoide (SEC) en el SNC y agonistas a cannabinoides.** El SEC representa una importante temática de estudio en el SNC en función de sus receptores donde RCB1, al encontrarse en neuronas pre-sinápticas, regula la liberación de neurotransmisores, mientras que en neuronas post-sinápticas, modula mecanismos en función de receptores NMDA, GABA, DA en la sinapsis de los ganglios basales para regular la actividad motora. La variedad de compuestos que participan como ligandos sobre ellos incluye a los fitocannabinoides, los endocannabinoides y los cannabinoides sintéticos (Howlett et al., 2002).

### **1.7.1 RECEPTORES RCB1**

RCB1 es un receptor acoplado a proteínas G que activa la subunidad Gi/Go, inhibe a la proteína adenilato ciclasa y a canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , disminuye AMPc, no genera fosforilación de PKA, activa canales de  $\text{K}^+$ , activa MAPcinasa y, en neuronas presinápticas, disminuye la liberación de neurotransmisores como glutamato, GABA, noradrenalina y dopamina. En tanto, en neuronas post-sinápticas modula la actividad de receptores NMDA, GABA, y DA. Los RCB1 están presentes en corteza, hipocampo, hipotálamo, abundan en los ganglios basales y en el cerebelo. Estos receptores modulan la motricidad en ganglios basales, dependiendo de los agonistas empleados y la dosis, generando respuestas de hipoactividad y catalepsia (Morera et al., 2016). Los RCB1 son altamente expresados en terminales GABAérgicas donde se genera la inhibición dependiente de endocannabinoides para la liberación de GABA, y previenen la muerte neuronal activando mecanismos de actividad neuroprotectora por el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Blazquez et al., 2015). Uno de los mecanismos sugeridos para controlar la excitotoxicidad por el SEC es mediante la hipofunción de receptores NMDA a través de la actividad de RCB1, promoviendo la co-internalización de la subunidad NR1 de NMDA que se encuentra unida al dominio PDZ de la proteína de densidad postsináptica 95 (PSD95). La unión de RCB1 y NR1 dependen de la proteína HINT1 (proteína de unión a nucleótidos de triadas de histidina 1), para llevar a NR1 a degradación proteosomal (Sánchez-Blazquez et al., 2014) (Figura 7).



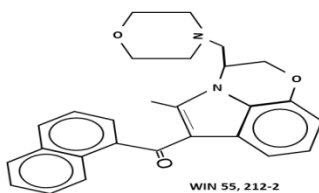
**Figura 7. Mecanismo de modulación (por hipofunción) de NMDAR.**

Mecanismo propuesto por los estudios de Sánchez-Blazquez et al (2014), a través del cual la activación de CB1 internaliza la subunidad NR1 de NMDA. Una vez que la HINT1 se une a RCB1 y NR1 (1), el complejo se dirige al interior celular (2), donde se libera NR1 para ser degradado por proteosoma (3), y el complejo RCB1/HINT1 regresa a la membrana para volver a realizar la misma función (4) (Sanchez et al., 2014).

### 1.7.2 WIN 55,212-2

El WIN 55,212-2 (R-(+)-[2,3-dihidro-5-metil-3-[(morfolinil)metil]pirrolo[1,2,3-de]-1,4-benzoxazinil]-(1-naftalenil) metanona mesilato es una pravadolina que pertenece a la familia aminoalquilindol (AAI); es un compuesto que está formado por un grupo morfolino, un indol y un pirrol, y tiene un enantiómero (-)WIN 55,212-3 que carece de

actividad in vivo e in vitro. El (+)WIN 55,212-2 actúa como agonista en ambos receptores a cannabinoides (RCB1 y RCB2), y su actividad es semejante al  $\Delta^9$ -THC. Este compuesto se comporta como un agente anti-inflamatorio no esteroideo y analgésico neuropático, y suprime la actividad locomotora, incrementando la catalepsia. Se ha reportado que la dosis efectiva del WIN 55,212-2 para los receptores RCB1 es 1.89 nM, y para RCB2 es 0.28 nM, mientras que el  $\Delta^9$ -THC, el fitocannabinoide de la planta *Cannabis sativa*, tienen dosis efectivas de 41 nM para RCB1 y 36 nM para RCB2 (Howlett et al., 2002; Wiley et al., 2014). Este compuesto se ha contemplado para el estudio del SEC en la modulación de receptores pre-sinápticos para inhibir la liberación del glutamato ante la presencia del QUIN, que se emplea para generar un modelo de la EH que estimula la salida masiva del neurotransmisor glutamato y la excitotoxicidad {Pintor, 2006 #18}, como se mencionó antes (Pintor et al., 2006). Por su parte, el  $\Delta^9$ -THC se ha aprobado como un agente anticonvulsivante, una característica que muchos agonistas del SEC podrían compartir (Vilela et al., 2013). El interés de este trabajo se centra en probar los efectos del WIN 55,212-2 en virtud de sus propiedades farmacológicas evocadas a través de su capacidad para estimular los RCB1 (Figura 8).

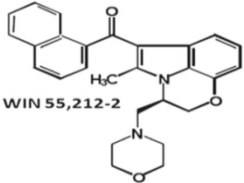
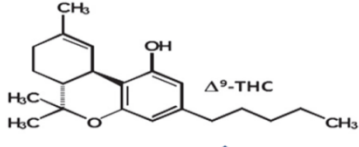


**Figura 8.** Estructura molecular del agonista sintético cannabinoide WIN 55,212-2.

## 2. ANTECEDENTES

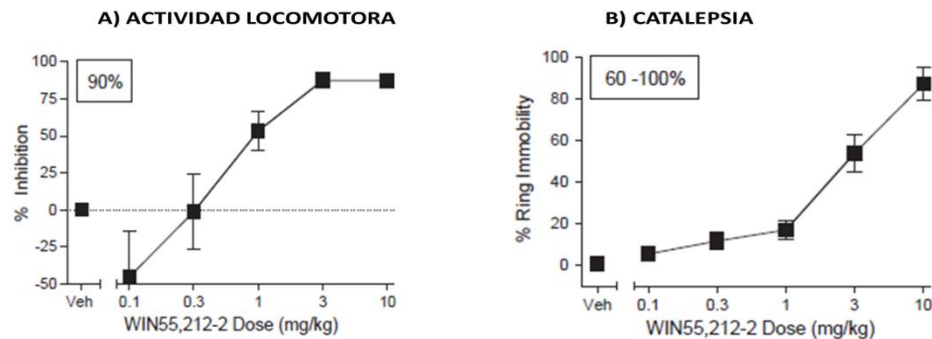
El WIN 55,212-2 constituye una herramienta terapéutica de gran valor dado que se ha reportado que tiene mejor afinidad sobre ambos receptores a cannabinoides en comparación con  $\Delta^9$ -THC. Su sitio de unión en los RCB1 es a través de GTP $\gamma$ S, y la molécula del WIN 55,212-2 con afinidad es el grupo morfolino, mientras que para el  $\Delta^9$ -THC es su cadena lateral (Wiley et al., 2014) (Tabla 2).

**Tabla 2. Afinidad de los cannabinoides sobre el sitio de unión de los RCB1**

WIN55, 212-2	$\Delta^9$ -THC
<ul style="list-style-type: none"><li>Afinidad a: RCB1; Ki= 1.89 nM RCB2; Ki= 0.28 nM</li><li>Agonista total a RCB1</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>Afinidad a: RCB1; Ki=41 nM RCB2; Ki= 36 nM</li><li>Agonista parcial a RCB1</li></ul>
 WIN 55,212-2 ↑ morfolino	 $\Delta^9$ -THC ↑ Cadena lateral fenilo
<b>RCB1</b> GTP $\gamma$ S	

El RCB1 se ha caracterizado por las principales respuestas fisiológicas generadas, como la supresión de la actividad motora, hipotermia, catalepsia y antinocicepción. Esta respuesta depende de la dosis de WIN 55,212-2 empleada en roedores: a dosis bajas incrementa la actividad locomotora, mientras que a dosis altas la suprime (Wiley et al., 2014) (**Figura 9**). Por estas características, sugerimos su empleo para

el estudio del papel que el SEC juega en un modelo de daño neuronal producido por el 3-NP.



**Figura 9. Dosis respuesta del WIN 55,212-2.**

Se muestra el empleo de diferentes dosis del WIN 55,212-2 en un estudio previo: 0.1 - 10 mg/kg. A) Actividad locomotora. Está gráfica expresa el % de inhibición de la actividad, donde la dosis de 3 mg/kg representa el máximo % de inhibición. B) Catalepsia. Se mide el % de inmovilidad: al aumentar la dosis aumenta el % en la inmovilidad (Wiley et al., 2014).

El WIN 55,212-2 se ha caracterizado farmacológicamente como un agonista eficaz para receptores a cannabinoides. Su utilidad ha sido fundamentalmente experimental, y se ha reportado su efecto protector en modelos de enfermedades como la epilepsia, y neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson, Alzheimer, y EH, particularmente en ratones transgénicos R6/1 (Pietropaolo et al., 2015; Bisogno et al., 2016). Esto ha demostrado el efecto de la molécula en la

protección de neuronas NEM y la mejoría en aspectos cognitivos y motores (Pietropaolo et al., 2015). En el modelo transgénico en ratones R6/2 se ha propuesto la señalización por WIN 55,212-2 sobre RCB1 en la función glutamatérgica y GABAérgica (Chiodi et al., 2012). En modelos tóxicos como el producido por el QUIN (Santamaría et al., 2001), este agonista cannabinoide también ha generado perfiles de neuroprotección (Santamaría et al., 2001; Pintor et al., 2006).

El 3-NP genera un modelo experimental de la EH cuando es aplicado sistémica o intraestriatalmente a roedores. A través de su administración sistémica, el 3-NP atraviesa la barrera hematoencefálica, causa atrofia del SNC -especialmente en el estriado dorsal-, y afecta la actividad motora. Los animales administrados con 3-NP (10 mg/kg, i.p.) presentan hiperactividad a los 12 días, y a los 28 días, hipoactividad (Hamilton y Gould, 1987; Borlongan et al., 1995; Borlongan et al., 1997). La administración intraestriatal a una sola dosis de 370 nmol (recomendada por Lastres-Becker), o una sola dosis de 500 nmol (recomendada por Borlongan), también es de utilidad para el modelo de EH (Borlongan et al., 1995; Lastres et al., 2003) (Tabla 3).

**Tabla 3:** Se describen la dosis empleada y la vía de administración del 3-NP, así como el daño que genera al SNC y las alteraciones conductuales que fueron observados en ratas en diferentes modelos (Borlongan et al., 1997; Lastres et al., 2003).



**Tabla 3: Dosis y tipo de daño por el 3-NP**

<b>Referencias</b>	<b>Tipo de administración del 3-NP</b>	<b>Daño al SNC</b>	<b>Manifestaciones conductuales</b>
Hamilton y Gould, 1987	Sistémica s.c. Una sola dosis 30 mg/kg Por 4 días 10 mg/kg	Cambios simétricos bilaterales en caudado-putamen y ligera lesión en hipocampo, en tálamo y en el cuarto ventrículo	Somnolencia, hiperactividad, estereotipias, rigidez muscular, hipoactividad.
Ludolph et al., 1991	Sistémica s.c. Una sola dosis de 30-50 mg/kg		
Brouillet et al., 1993	Sistémica s.c. 20 mg/kg por 5 días	Cambios degenerativos severos en el estriado	No reportado
	Intraestriatal 500 nmol		
Beal et al., 1993	Sistémica i.p. 20 mg/kg por 5 días 12 mg/kg todos los días por un mes	Lesión bilateral en el estriado en la región rostralateral y en CA1 del hipocampo	Marcha inestable, rigidez de los miembros posteriores
Koutouzis y Borlongan et al., 1994	Sistémica i.p. 10mg/kg cada 4 días por 28 días	Lesión en el estriado dorsolateral	Hiperactividad a los 12 días. Hipoactividad, rigidez de los miembros posteriores a los 28 días
Koutouzis y Borlongan et al., 1994 y 1995	Intraestriatal 500 mg/kg, 750 mg/kg	Daño en el estriado, corteza, globo pálido, hipocampo.	Hipoactividad, rigidez de los miembros posteriores.
Borlongan et al., 1995	Unilateral Intraestriatal 500 nmol	Daño en el estriado	Alteración motora, presentando rotación ipsilateral por activación Dopaminérgica por el agonista apomorfina.
Lastres Becker et al., 2003	Intraestriatal Bilateral 370 nmol	No reportado	Hiperactividad a las dos semanas. Hipoactividad en la cuarta semana.

A través del modelo animal con 3-NP, en este trabajo se evaluaron marcadores de daño tisular, oxidación lipídica, alteraciones conductuales y regulación de proteínas, y se evaluó la estimulación del SEC mediante el agonista a RCB1, WIN 55,212-2, para estimar su efecto contra el daño tisular generado por la toxina. Con estos criterios, el presente trabajo tiene como justificación la realización de experimentos tendientes a caracterizar la participación del SEC en las alteraciones producidas por una toxina mitocondrial con la finalidad de proveer información relevante sobre los mecanismos de daño y su prevención en procesos neurodegenerativos. Aquellos procesos evaluados a tiempos cortos en nuestros experimentos denotan la intención de caracterizar eventos causales que originarán el daño celular y tisular posteriormente.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

El SEC representa un campo fértil de estudio en el desarrollo de agentes terapéuticos orientados a aliviar los síntomas y controlar la progresión de la EH. Por ello, se genera la necesidad de proveer información relevante sobre sus mecanismos precisos y su posible atenuación; por lo tanto, en este estudio se propone evocar un modelo de protección neuronal por activación preferencial de RCB1 en ratas tratadas con WIN 55,212-2, un agonista sintético de dichos receptores, en un modelo excitotóxico producido por 3-NP.

#### **4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿La activación de los RCB1 es capaz de proteger al tejido estriatal de ratas contra la toxicidad inducida por el 3-NP?

## **5. HIPÓTESIS**

Dado que la activación del SEC por estimulación de RCB1 es capaz de reducir la transmisión glutamatérgica mediada por NMDA, entonces el empleo del cannabinoide WIN 55,212-2 promoverá la protección neuronal contra el daño excitotóxico inducido por 3-NP y también preservará la actividad motora, la función celular y la citoarquitectura estriatal en ratas.

## **6. OBJETIVOS**

### **6.1. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el papel de la modulación de RCB1 sobre marcadores conductuales y bioquímicos a nivel estriatal generados por la disfunción mitocondrial causada por la lesión estriatal con 3-NP en ratas.

### **6.2. OBJETIVOS PARTICULARES**

- Estimar el papel de la modulación de RCB1 sobre la alteración conductual en ratas lesionadas en el estriado con 3-NP.
- Evaluar la posible protección tisular del WIN 55,212-2 en el estriado de ratas lesionadas con 3-NP.
- Cuantificar los efectos del WIN 55,212-2 sobre marcadores bioquímicos de estrés oxidante después del tratamiento estriatal con 3-NP.
- Estudiar el efecto del WIN 55,212-2 sobre la regulación de RCB1 y NMDA en el estriado de ratas lesionadas con 3-NP.

## **7. METODOLOGÍA**

### **7.1. ANIMALES**

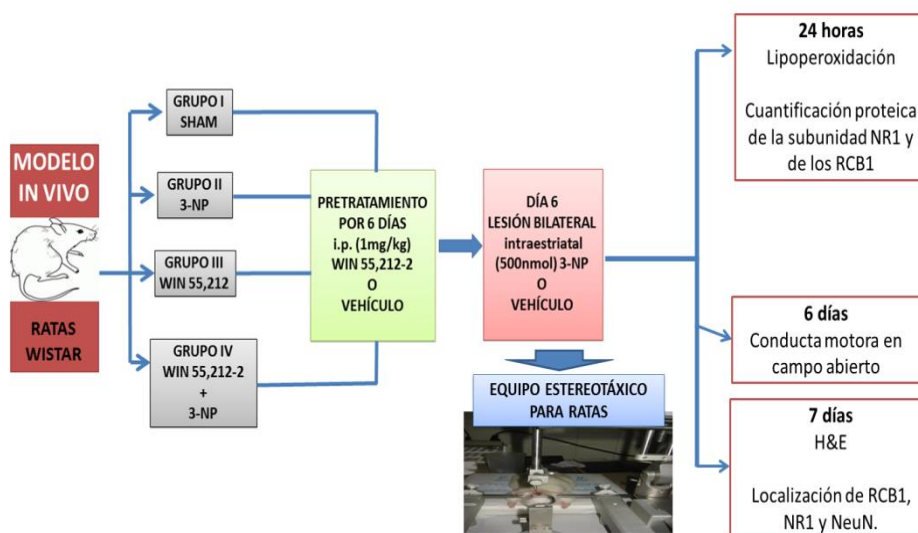
Se utilizaron un total de 80 ratas macho de la cepa Wistar de edad adulta, con peso de 280 a 320 gramos. Los animales fueron obtenidos de los bioterios del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN) y del Instituto Nacional de Cardiología (INC), México. Los animales se mantuvieron en condiciones estándar de temperatura ambiente ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ), con un ciclo de 12 horas de luz y oscuridad, con libre acceso de agua y alimento; se manejaron con los procedimientos establecidos por la Norma Oficial Mexicana 062-ZOO-1999, y por la “Guía para el Cuidado de los Animales de Laboratorio” (Edición Mexicana auspiciada por la academia Nacional de Medicina).

### **7.2 DISEÑO EXPERIMENTAL – TRATAMIENTOS**

El estudio involucró un pretratamiento con la administración i.p. de 1 mg/kg de peso del agonista a CB1 WIN 55,212-2 (vehículo solución salina con 0.5% de DMSO) por seis días consecutivos. El último día de la aplicación del agonista, las ratas fueron sometidas a cirugía estereotáxica para inyectar la micotoxina 3-NP (500 nmol/ $\mu\text{L}$  en vehículo agua desionizada) a nivel bilateral estriatal con una jeringa Hamilton, siguiendo las coordenadas establecidas por el Atlas Estereotáxico de cerebro de rata de Paxinos y Watson (1998). Las coordenadas para localizar el estriado dorsal derecho fueron 0.5 mm anterior a bregma, 2.6 mm/-2.6 mm lateral a bregma, y -4.5 mm ventral a la duramadre. La aguja se dejó por 2 minutos adicionales después de la infusión para la adecuada difusión del vehículo.

## 7.2 GRUPOS EXPERIMENTALES

Se formaron cuatro grupos de 5 ratas cada uno. Grupo I o Sham: fueron administrados con vehículo *i.p.* y sometidos a cirugía para inyectar vehículo intracerebralmente. Grupo II: con vehículo *i.p.* y la inyección estriatal con 3-NP. Grupo III: WIN 55,212-2 *i.p.* y vehículo en la inyección estriatal. Grupo IV: WIN 55,212-2 *i.p.* y 3-NP inyección estriatal. El diseño experimental de este proyecto se presenta de manera esquemática en la Figura 10.



**Figura 10. Diseño experimental.** Tratamiento y pruebas que se realizaron en un modelo *in vivo* con la toxina 3-NP y el agonista a RCB1, WIN 55,212-2.



#### **7.4 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD MOTORA**

Después de los tratamientos, los animales se dejaron 6 días en recuperación sin ninguna manipulación. Al sexto día, se realizó la prueba de campo abierto que consiste en estimar los movimientos totales del animal en el equipo VERSAMAX 4510 (AccuScan Instruments, Inc. Columbus, Ohio USA) por 15 minutos. Este equipo consiste de una serie de sensores luminosos que generan un cuadrante a través del cual los movimientos horizontales, verticales, ambulatorios y las estereotipias, son todos cuantificados en un software. El equipo fue limpiado con alcohol al 70% entre ensayos. La prueba se realizó sin luz y sin ruido (Kudo et al., 2014; Tatem et al., 2014).

#### **7.5 ANÁLISIS HISTOLÓGICO**

En el séptimo día, los animales fueron administrados con una dosis letal del anestésico pentobarbital de sodio (500  $\mu$ L), se perfundieron vía transcardiaca con 0.9 % de solución salina (1 L) + 5 mL de heparina seguida de 1 L de paraformaldehído en buffer de fosfatos (PBS) al 4 % a 4°C para la fijación de los tejidos. Los cerebros fueron extraídos y posteriormente colocados en paraformaldehído al 4 % por dos días para favorecer su fijación. Los cerebros se deshidrataron en alcoholes graduales por 30 minutos en cada uno (60 %, 70 %, 80 %, y 90 %) y 24 horas en alcohol al 100 %, en alcohol-xilol 30 minutos, xilol-puro 24 horas, y después se pasaron a parafina líquida en agitación por una hora (cambio de parafina a los 30 minutos), para posteriormente ser incluidos en parafina. Se obtuvieron secciones coronales de 5  $\mu$ m

de espesor (cada 100  $\mu\text{m}$ , cubriendo una distancia total de 300  $\mu\text{m}$ : 100  $\mu\text{m}$  anteriores, en el sitio y 100  $\mu\text{m}$  posteriores al trayecto de la aguja) del cuerpo estriado en serie en un micrótomo 820 HistoSTAT (American Instrument Exchange Inc., Haverhill, MA, USA). Todas las secciones fueron teñidas con hematoxilina-eosina (H&E), Los tejidos obtenidos en portaobjetos fueron procesados para visualizar los cuerpos celulares, usando un analizador de imágenes IM100 (Leica Cambridge, UK) (Colí et al., 2011).

#### ***7.6 ENSAYO DE INMUNOFLUORESCENCIA PARA CO-LOCALIZACIÓN DE CB1, NR1 Y NeuN EN EL ESTRIADO***

Se tomaron secciones coronales del estriado, obtenidas desde el procesamiento histológico. Estas fueron tratadas con anticuerpos primarios (Anti-NeuN de ratón; Anti-NMDAR1 policlonal de conejo abcam ab17345; Anti-CB1 policlonal de conejo abcam ab3558). Los antígenos fueron disueltos con buffer de citratos (0.1 M ácido cítrico monohidratado y 0.1 M de citrato trisódico dihidratado). Los anticuerpos no específicos fueron bloqueados con una solución bloqueadora universal (Biogenex, Fremont, CA). Las rebanadas fueron incubadas toda la noche con el anticuerpo correspondiente (todos con una dilución 1/200), y enseguida fueron lavadas por 10 minutos con PBS-TWEEN (0.2%, pH 7.2). Las rebanadas fueron entonces incubadas con 0.6 M de glicina por 20 minutos con el fin de eliminar la autofluorescencia de aldehídos, y recibieron además tres lavados con 0.5 % de PBA (PBS albumina). Los anticuerpos anti-rabbit Alexa-488 (Thermo Fisher, Waltham, MA) y anti-mouse

Rodamine (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) se usaron como anticuerpos secundarios diluidos (1:400) e incubados por 60 minutos a temperatura ambiente. Las rebanadas fueron lavadas tres veces más con PBS-TWEEN (0.2%, pH 7.2), y los núcleos se tiñeron de azul con DAPI (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Las secciones se montaron con solución fluorescente (DakoCytomation, Glostrup, Denmark), y se obtuvieron imágenes (20X) en un Microscopio confocal LSM-780 NLO (Carl Zeiss, Germany), usando un láser a 405 nm para DAPI, y un láser de Ar/ML 458/488/514 para fluoróforos Alexa 488 y Rodamina. Para el análisis de imágenes se utilizó el software ZEN 2010 6.0 (Carl Zeiss, Germany).

## **7.7 ENSAYO DE LIPOPEROXIDACIÓN**

La lipoperoxidación se midió 24 horas después de terminar los tratamientos. Los animales fueron decapitados y se extrajo el cuerpo estriado, el cual se homogenizó con buffer de lisis (150 mM de NaCl, 0.1 % de Tritón, Tris HCl 50 mM, y 0.085 gramos de sacarosa). El homogenado fue centrifugado a 12,000 rpm por 10 minutos a 4°C. Cincuenta µL de sobrenadante se agregaron a 100 µL del reactivo de ácido tiobarbitúrico (TBA), conteniendo 0.75g de TBA + 15 g de ácido tricloroacético + 2.54 mL de HCl, y luego incubados a 100°C por 20 minutos. Se observó un color rosado producido en las muestras en función directa de la cantidad de productos peroxidados. Después, las muestras se mantuvieron en hielo por 5 minutos y se centrifugaron a 1,200 rpm a 4°C por 20 minutos. Se tomaron los sobrenadantes y se midió la densidad óptica en un espectrómetro a 532 nm. La cantidad final de

sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) correspondiente al malondialdehído (MDA) producido, fue calculada por la interpolación de valores en una curva estándar construida con tetrametoxipropano (TMPO) (Colín et al., 2015).

## **7.8 WESTERN BLOT**

Para el inmunoblot, los estriados fueron extraídos 24 horas después de haber terminado los tratamientos. Las muestras fueron homogenizadas con 100  $\mu$ L de buffer de lisis (100  $\mu$ L de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 0.1 M, 100  $\mu$ L de ditioneitol (DTT) 1 M, 10 mL de reactivo de extracción de proteína de tejido (T.PER) pastilla complete (inhibidor de proteasas), y se centrifugaron a 13,500 rpm por 18 minutos a 4°C. Se cuantificó la proteína del sobrenadante por el método de Bradford (800  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O + 200  $\mu$ L de Bradford + 1  $\mu$ L de muestra) y se tomó una concentración de 80 mg estándar de proteína. Las proteínas se separaron por SDS-PAGE. El gel de resolución fue al 12 % (gel de corrida y el concentrador), donde se colocaron las muestras con buffer de carga (para 10 mL, se mezclaron 6 mL de 0.5 M de bifosfato de sodio (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) + 3 mL de glicerol + 0.75 g de SDS + 0.015 g de DTT + 0.005 g de azul de bromofenol) y el marcador de peso molecular.

*El gel de corrida consistió en:* 2.5 mL de buffer con pH 8.8 (para 50 mL, 4.54 g de 0.75 M de Tris-HCl + 0.1 g de 0.2 % de SDS) + 2 mL de Acrilamida (Bio Rad) + 0.5 mL de agua destilada (H<sub>2</sub>O destilada) + 7  $\mu$ L de tetrametiletilendiamina (TEMED) + 25  $\mu$ L de persulfato de amonio (PSA) al 13 %. Una vez agregado el TEMED y el

PSA, enseguida se adicionó la mezcla en los vidrios de preparación para el gel y se adicionó etanol ó isopropanol al gel.

El *gel concentrador* consistió en: 0.18 mL de Acrilamida (Bio Rad) + 0.75 mL de buffer con pH 6.8 (para 50 mL, 1.51g de Tris-Base + 0.1 g de SDS) + 0.6 mL de H<sub>2</sub>O dest. + 3.75 µL de TEMED + 15 µL de PSA.

Las proteínas que se colocaron en el gel y pasaron por una etapa de electroforesis, en la cual se colocaron en una cubeta con buffer de electroforesis a un pH 8.3 (para 1 L, 6.05 g de Tris-base + 28.8 g de glicina + 1 g de SDS y se aforó con H<sub>2</sub>O destilada) y se conectaron a la corriente por una hora y media aproximadamente, subiendo el voltaje de 60 V a 120 V. Enseguida, las proteínas fueron transferidas a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF, Amersham Hybond<sup>TM</sup>-P), que se activó con metanol, y se colocaron en un cassette de transferencia en una cubeta con buffer de transferencia a un pH de entre 8.1–8.5 (para 1 L, 3.03 g de Tris-base + 14.4 g de glicina + 200 mL de metanol y se aforó con H<sub>2</sub>O destilada). Se conectaron a la corriente aproximadamente una hora y media a 120 V. La transferencia se mantuvo en agitación y en frío. Al término de la transferencia, la membrana se bloqueó por 1 h a temperatura ambiente con 8 % (w/v) de leche descremada sin grasa en TBS-TWEEN (buffer TBS con un pH 7.6: para 1 L, 2.42 g de Tris-HCl 20 mM + 8 g de NaCl 137 mM + 1 mL de TWEEN 20 y se aforó con H<sub>2</sub>O destilada). Se realizaron 3 lavados a temperatura ambiente con TBS-T por 10 minutos. La membrana se incubó con anticuerpo primario (Anti-Actina de ratón), y subsecuentemente se realizó un lavado con TBS-TWEEN por 10 minutos. Enseguida, la membrana se bloqueó por 15 minutos a temperatura ambiente con

leche y se lavó dos veces con TBS-TWEEN por 10 minutos. Después, se incubó a temperatura ambiente con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano en buffer TBS-TWEEN (Anti-ratón, sc-2005, Santa Cruz), y posteriormente se realizaron dos lavados a temperatura ambiente con buffer TBS-TWEEN por 10 minutos. Las bandas se detectaron por quimioluminiscencia (Inmobilon<sup>TM</sup> Western, Millipore, Bellerica, USA), y se cuantificó la intensidad en pixeles mediante el programa de Kodak [LOGIC 1500]. La membrana se limpió con 2 lavados de 10 minutos en buffer de stripping con un pH 2.2 (para 1L se mezclaron 15 g de glicina + 1 g de SDS + 10 mL de Tween 20 y se aforaron con H<sub>2</sub>O destilada), y después se realizaron dos lavados de PBS por 10 minutos y dos lavados con TBS-TWEEN por 10 minutos. La membrana se volvió a bloquear con 0.8 % (w/v) de leche descremada sin grasa para volver a incubar con otro anticuerpo primario (Anti-NMDAR1 policlonal de conejo abcam ab17345; Anti-CB1 policlonal de conejo abcam ab3558); posteriormente, se incubó con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (Anti-conejo, sc-2004, Santa Cruz) (Alarcón et al., 2014).

## **7.9 ANALISIS ESTADÍSTICO**

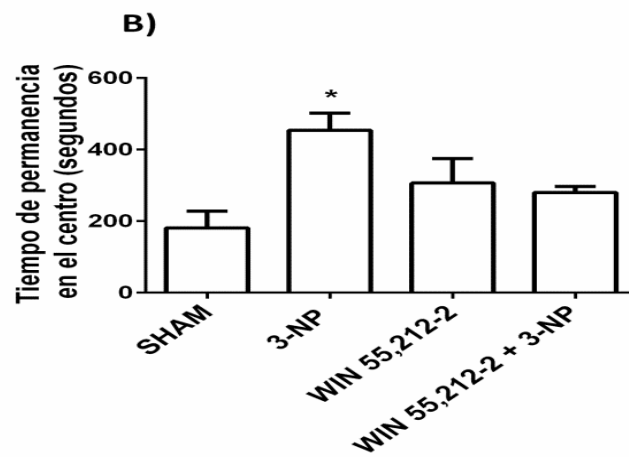
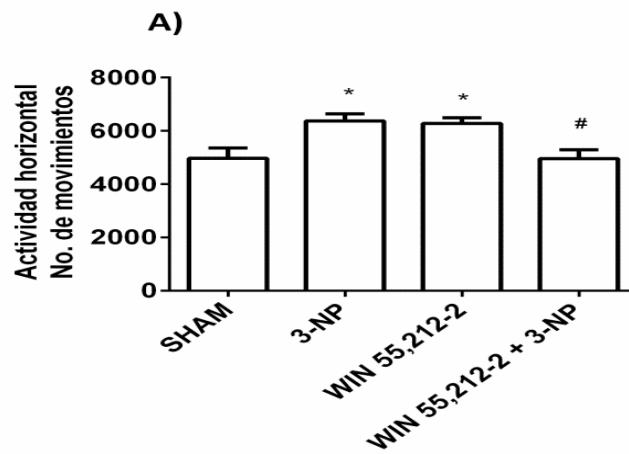
Pruebas de ajuste de normalidad de datos fueron realizadas para todos los resultados. Análisis de varianza de una vía seguidos de pruebas de comparación múltiple de Bonferroni fueron aplicadas a los grupos de resultados. Valores desde  $p < 0.05$  fueron considerados como significativos.

## 8. RESULTADOS

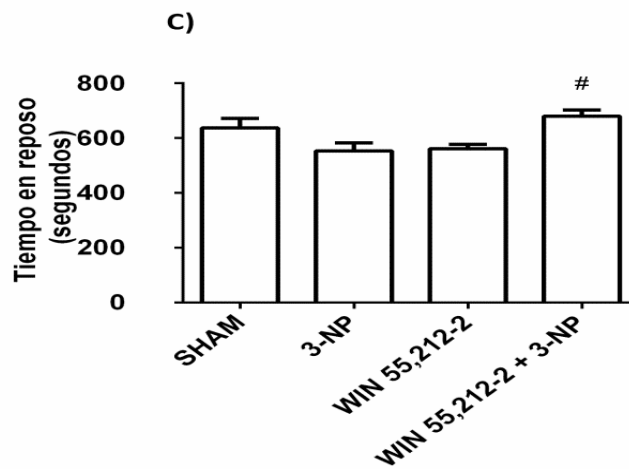
### **8.1. LA POSIBLE ESTIMULACION DE CB1 POR WIN 55,212-2 DISMINUYÓ LA ALTERACIÓN CONDUCTUAL EN RATAS LESIONADAS CON 3-NP**

En la figura 11 se muestran tres parámetros de actividad motora que se encuentran alterados en ratas lesionadas con 3-NP intraestriatal. Se observa que el 3-NP incrementó significativamente los movimientos horizontales (29 % más que el grupo Sham;  $p < 0.05$ ; panel A) y el tiempo de permanencia en el centro del dispositivo de campo abierto (139 % más que el grupo Sham;  $p < 0.05$ ; panel B), sugiriendo un patrón de hiperactividad motora y desorientación. Cuando los animales lesionados con 3-NP fueron tratados con WIN 55,212-2, el número de movimientos horizontales de los animales disminuyó con respecto a los que fueron tratados solo con 3-NP (2 % por arriba del grupo Sham y 27 % por debajo del grupo tratado con sólo 3-NP;  $p < 0.05$ ; panel A). El tratamiento con WIN 55,212-2 en las ratas dañadas con 3-NP también disminuyó el tiempo que los animales permanecieron en el centro en comparación con el tratamiento con 3-NP (39 % menos que el grupo con 3-NP; panel B). Aunque el grupo lesionado sólo con 3-NP no disminuyó significativamente el tiempo en reposo de los animales en comparación con el grupo Sham (14 % debajo de Sham; panel C), el tratamiento con WIN 55,212-2 aplicado a los animales lesionados con 3-NP permitió prevenir este déficit en un 23 % con respecto al grupo con 3-NP (6 % por arriba de Sham; panel C). El grupo tratado solo con WIN 55,212-2 aumentó significativamente el número de movimientos horizontales con respecto al grupo Sham (26 % más que el grupo Sham;  $p < 0.05$ ; panel A), y no produjo cambios

significativos con respecto al grupo Sham en ninguno de los otros parámetros motores evaluados (paneles B y C).







**Figura 11. La posible estimulación de CB1 por WIN 55,212-2 disminuyó la alteración conductual en ratas lesionadas con 3-NP.**

Valoración de los patrones de motricidad por la prueba de campo abierto en ratas expuestas a WIN 55,212-2 y/o 3-NP. A) Actividad horizontal. B) Tiempo de permanencia en el centro (confusión espacial) inducido por 3-NP. C) Tiempo en reposo.

\*Diferente de Sham; #diferente a 3-NP. ANOVA de una vía y prueba de Bonferroni;  $p < 0.05$  y  $n = 5$ .

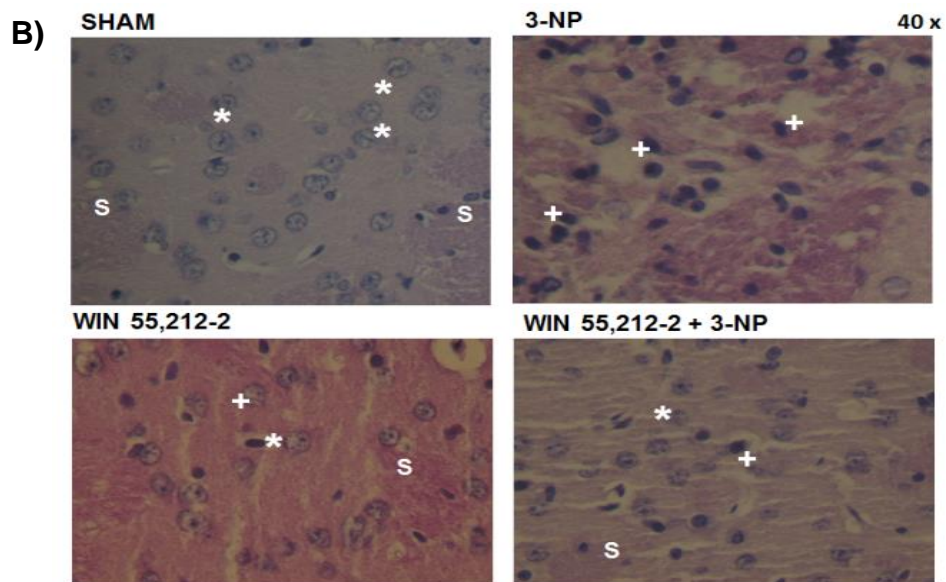
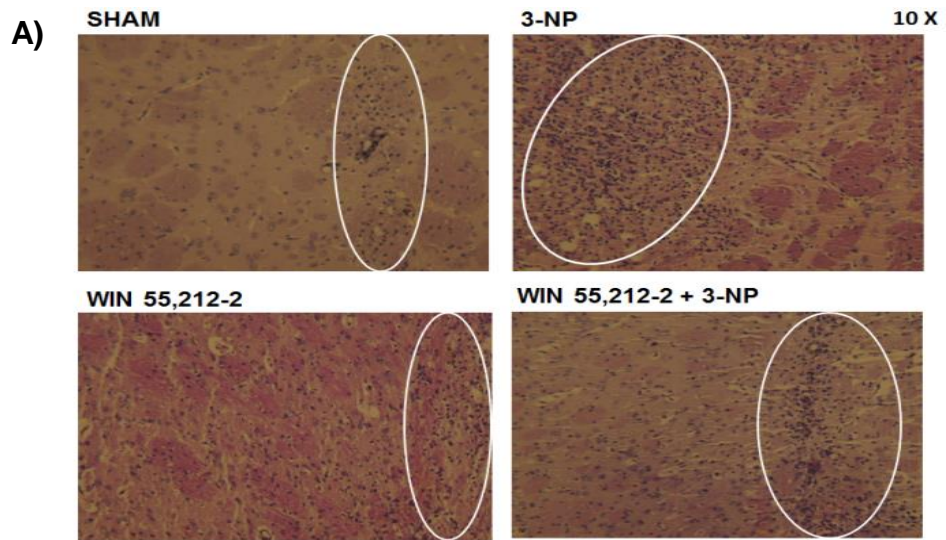
## **8.2 EL WIN 55,212-2 PRESERVÓ LA INTEGRIDAD CELULAR ESTRIATAL DE RATAS EXPUESTAS A 3-NP**

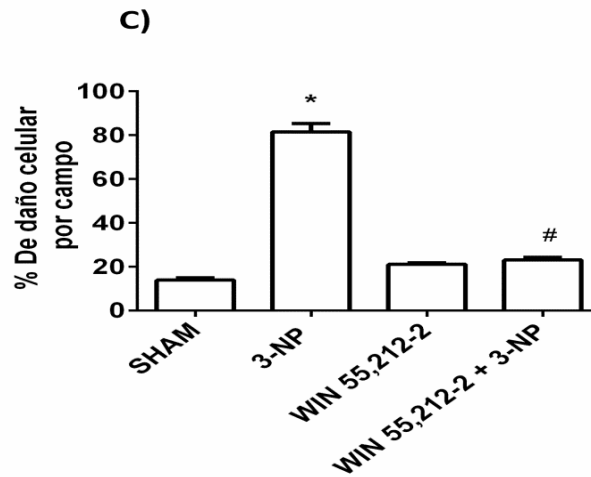
La Figura 12 muestra paneles de fotomicrografías a dos diferentes aumentos [10<sub>x</sub> en el panel izquierdo (A) y 40<sub>x</sub> en el panel derecho (B)] y su análisis cuantitativo (C), describiendo el efecto de WIN 55,212-2 sobre el daño celular estriatal inducido por 3-NP en ratas 7 días después de la lesión. La vista panorámica en (A) muestra un área extensa de daño celular (área necrótica e infiltración celular masiva marcada por un óvalo) producida por el 3-NP, la cual contrasta con las lesiones producidas por los demás tratamientos, que fueron más moderadas. Un nivel intermedio de daño fue encontrado en el tratamiento con WIN 55,212-2 + 3-NP, sugiriendo cierto nivel de protección por este agente. Dichas imágenes ayudan a determinar visualmente el área de lesión y su extensión a partir de la trayectoria de la microinyección.

En el panel (B) se muestran imágenes representativas de diferentes campos de tejido estriatal de animales de todos los tratamientos realizados. A diferencia del grupo Sham, en donde se observa una apariencia normal, el tejido estriatal de ratas lesionadas con 3-NP mostró un notable daño celular evidenciado por picnosis, edema, degradación del neuropilo, y deterioro de estriosomas. En presencia del WIN 55,212-2, el tejido estriatal de animales que recibieron 3-NP se preservó parcialmente, mostrando menores niveles de picnosis, disminución de edema, y neuropilo más preservado que en el tejido de animales que solo recibieron 3-NP. El WIN 55,212-2 produjo picnosis moderada, sin afectar los otros parámetros.

Al contabilizar el porcentaje de daño celular por campo (panel C), el 3-NP indujo un daño celular significativamente mayor en comparación con el grupo Sham (482 %

más que el grupo Sham;  $p < 0.05$ ). Por su parte, el WIN 55,212-2 previno el daño inducido por 3-NP en un 72 % ( $p < 0.05$ ; 65 % más que el grupo Sham). El WIN 55,212-2 solo no produjo cambios importantes en el porcentaje de daño celular (51 % más que el grupo Sham).





**Figura 12. El WIN 55,212-2 preservó la integridad celular estriatal de ratas expuestas a 3-NP.** Histología del tejido estriatal de ratas por tinción con H&E. A) Zona de lesión (10x). B) Detalles micrográficos de las lesiones (40x): (+) células sanas; (+) células dañadas picnóticas; (s) estriosomas que caracterizan al cuerpo estriado; C) Representación cuantitativa del daño celular por conteo. \*Diferente de Sham; #Diferente a 3-NP. Anova de una vía y prueba de Bonferroni;  $p < 0.05$ ,  $n = 3$ .

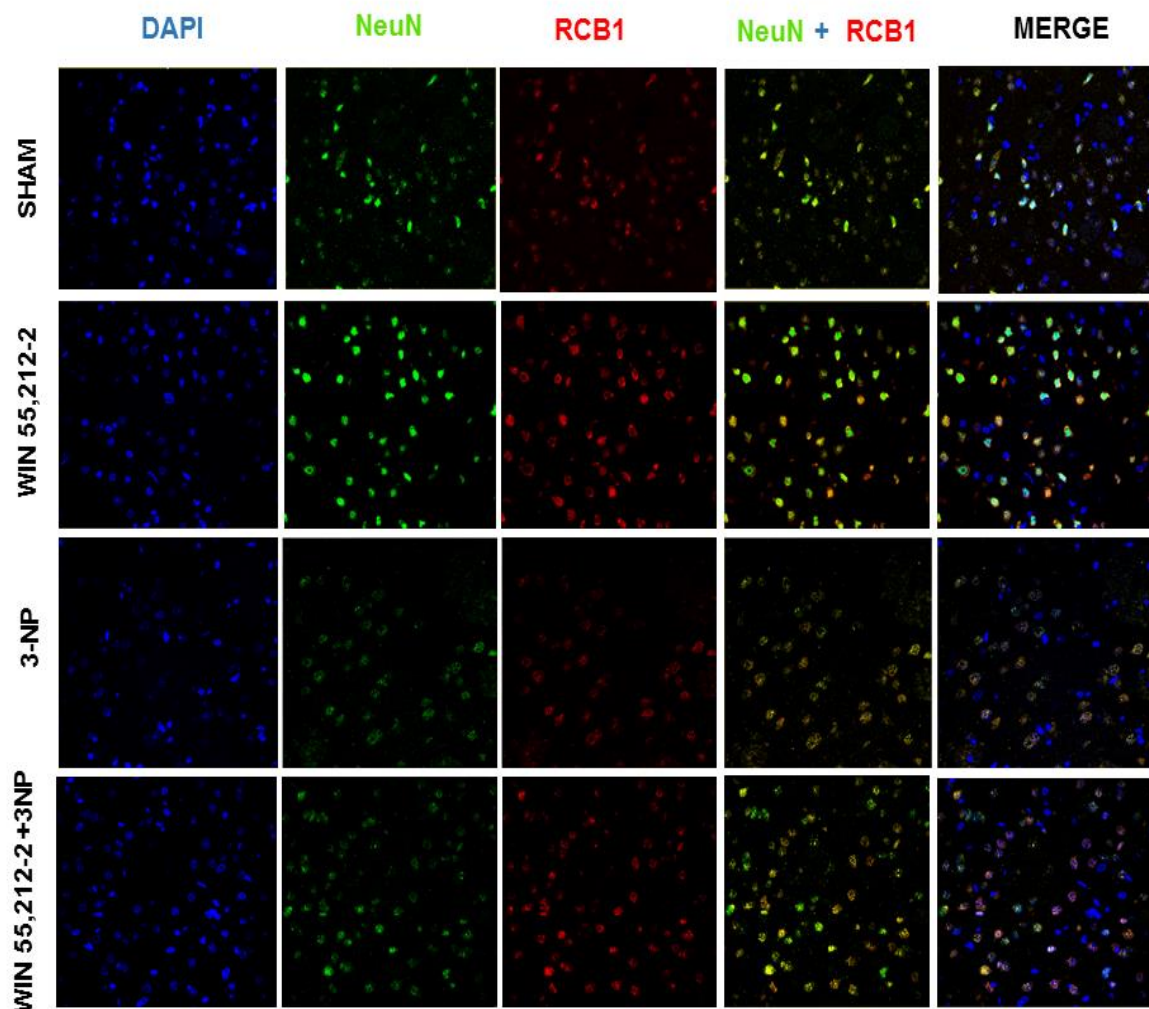
### **8.3 EL WIN 55,212-2 PREVINÓ LA DISMINUCIÓN EN LA DENSIDAD NEURONAL ESTRIATAL INDUCIDA POR 3-NP, Y AUMENTÓ LA EXPRESIÓN RELATIVA DE RCB1 Y NMDAR**

LA Figura 13A Representa la localización estriatal de la proteína nuclear específica de neuronas (NeuN) -denotando la presencia de células neuronales-, y del RCB1, los cuales fueron estimados en cortes coronales por inmunofluorescencia después de 7 días de la lesión. La Figura 13B muestra la relación porcentual de neuronas positivas a NeuN con respecto al RCB1, la cual es significativamente menor en los tejidos de ratas que solo recibieron el 3-NP, mientras que el tratamiento con WIN 55,212-2 en ratas lesionadas con 3-NP mantiene el % de neuronas significativamente por arriba del grupo con 3-NP y semejante al grupo Sham ( $p < 0.05$ ). La Figura 13C muestra la expresión relativa de RCB1 con un incremento significativo en los tejidos de ratas que recibieron al agonista WIN 55,212-2. A diferencia del grupo Sham, en los tejidos lesionados con 3-NP de animales que recibieron el tratamiento con WIN 55,212-2, la expresión relativa de RCB1 aumentó significativamente con respecto a los tejidos lesionados con 3-NP ( $p < 0.05$ ).

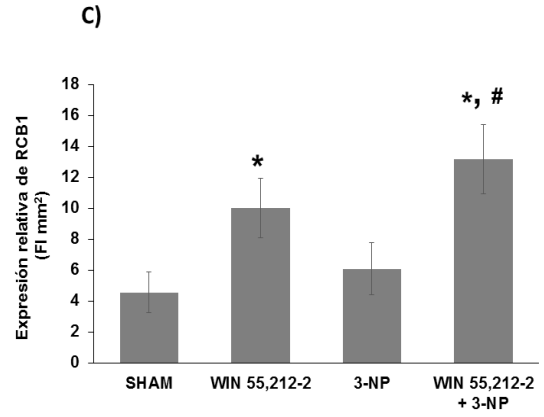
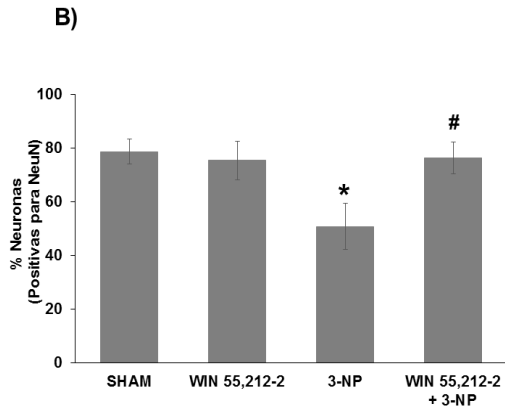
La Figura 13D representa la localización estriatal de la proteína nuclear específica de neuronas (NeuN) y de la subunidad NR1 de NMDAR, ambas estimadas en cortes coronales por inmunofluorescencia después de 7 días de la lesión. La Figura 13E muestra en la gráfica que el porcentaje de neuronas positivas a NeuN con respecto a la subunidad NR1 es significativamente menor en los tejidos de ratas que solo recibieron el 3-NP, mientras que el tratamiento con WIN 55,212-2 en ratas lesionadas con 3-NP mantuvo el porcentaje de neuronas significativamente por arriba del grupo

con 3-NP y semejante al grupo Sham ( $p < 0.05$ ). En Figura 13F se observa un incremento significativo en la expresión relativa de la subunidad NR1 en los tejidos de ratas que recibieron el agonista WIN 55,212-2 con respecto al grupo Sham. En los tejidos de ratas lesionadas con 3-NP que recibieron el WIN 55,212-2, la expresión relativa de NR1 está significativamente por arriba que los tejidos lesionados con 3-NP ( $p < 0.05$ ).

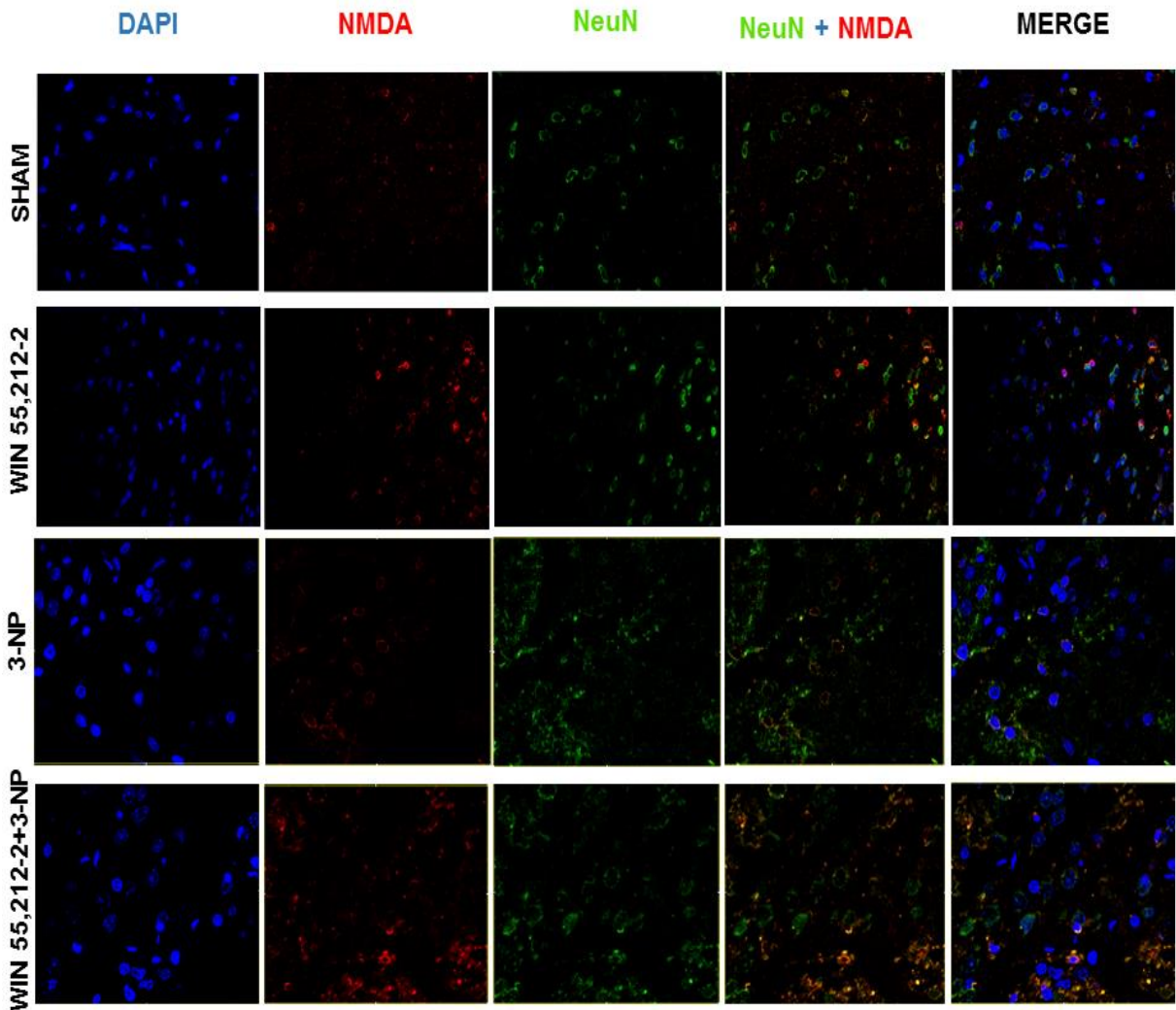
A)

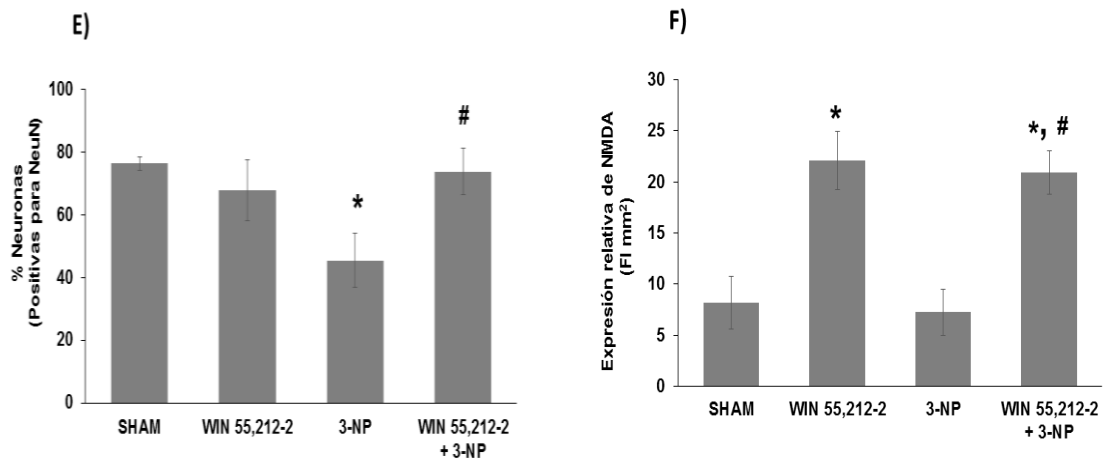






**D)**





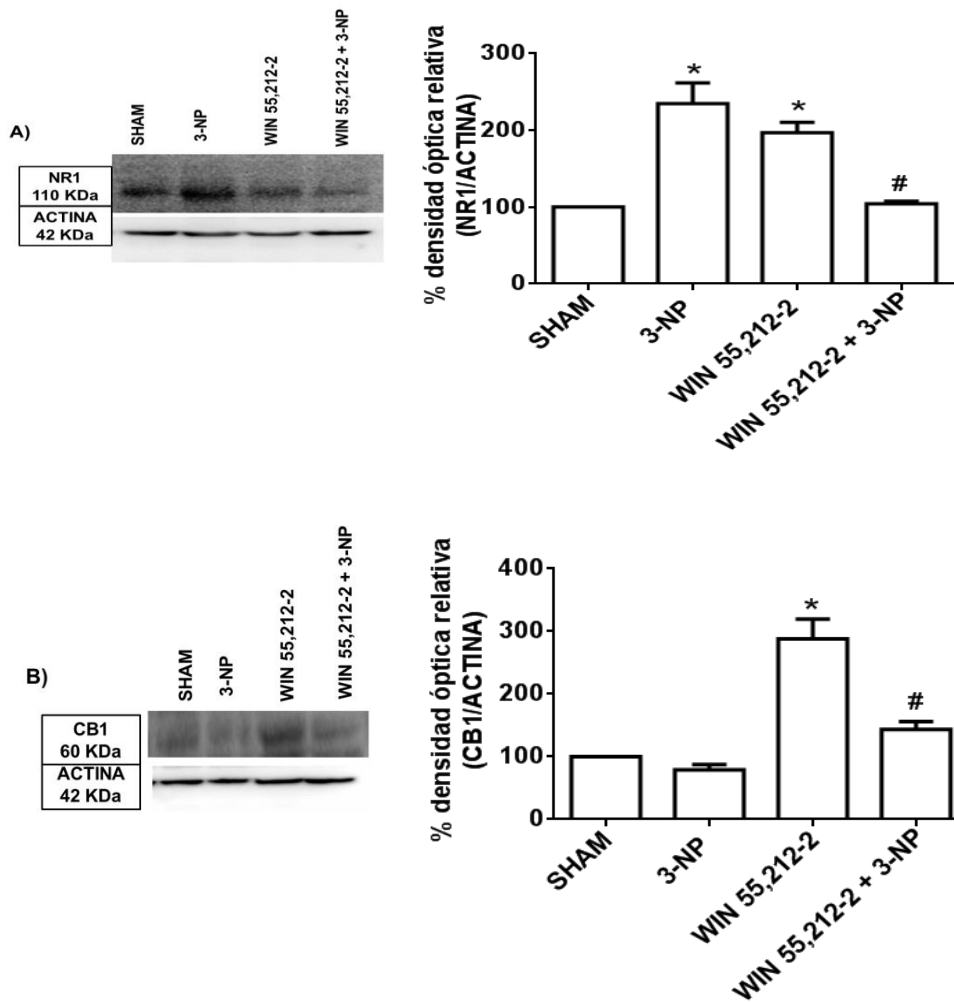
**Figura 13. El WIN 55,212-2 previno la disminución en la densidad neuronal estriatal inducida por 3-NP, y aumentó la expresión relativa de RCB1 y NMDAR.**

A) Imágenes de inmunofluorescencia donde se observa la colocación de NeuN y RCB1 en neuronas. B) Porcentaje de neuronas positivas a NeuN/RCB1. C) Expresión relativa de RCB1. D) Imágenes de inmunofluorescencia donde se observa la colocación de NeuN y la subunidad NR1 de NMDA. E) Porcentaje de neuronas positivas a NeuN/NR1. F) Expresión relativa de NMDAr. (\*) Diferente a Sham, y (#) diferente a 3-NP. Anova de una vía y prueba de Bonferroni;  $p < 0.05$ ,  $n = 5$ .



#### **8.4 EL WIN 55,212-2 DISMINUYÓ LOS NIVELES DE NR1 Y AUMENTÓ LOS NIVELES DE CB1 EN EL MODELO TÓXICO CON 3-NP EN RATAS**

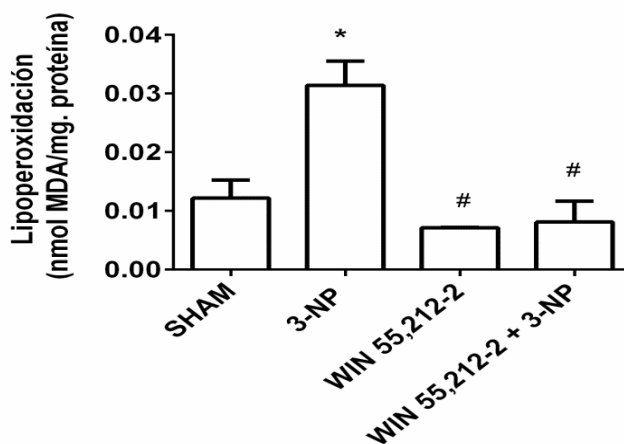
La Figura 14A muestra el inmunoblot de NR1 24 horas después de concluir el tratamiento. Se observa que hubo un incremento significativo de NR1 en el grupo de animales que recibieron 3-NP (135 % por arriba del grupo Sham;  $p < 0.05$ ). Cuando se aplicó el pretratamiento con WIN 55,212-2 a animales lesionados con 3-NP, disminuyeron los niveles de NR1 significativamente (56 % menos con respecto al grupo con 3-NP;  $p < 0.05$ ). El grupo que solo recibió el cannabinoide incrementó los niveles de NR1 significativamente (97 % más que el grupo Sham;  $p < 0.05$ ). La Figura 14B Muestra el inmunoblot para RCB1. Los niveles de RCB1 incrementaron significativamente en el grupo que solo recibió WIN 55,212-2 (188 % más que el grupo Sham;  $p < 0.05$ ). También se observa un aumento significativo en los niveles de RCB1 en los animales que fueron lesionados con 3-NP y que recibieron el pretratamiento con WIN 55,212-2 (44 % por arriba de Sham y 82 % por arriba del grupo con 3-NP). El grupo que solo fue tratado con el 3-NP no presentó cambios significativos con respecto al grupo Sham (21 % por debajo de Sham).



**Figura 14. El WIN 55,212-2 disminuyó los niveles de NR1 y aumentó los niveles de CB1 en el modelo tóxico con 3-NP en ratas. Cantidad relativa de NR1 y CB1. A) Inmunoblot para NR1/Actina. B) Inmunoblot para CB1/Actina. \*Diferente al grupo Sham; #diferente al grupo lesionado con 3-NP. Anova de una vía y prueba de comparación múltiple de Bonferroni;  $p < 0.05$ ,  $n = 4$ .**

### 8.5 EL WIN 55,212-2 PREVIENÓ LA LIPOPEROXIDACIÓN INDUCIDA POR EL 3-NP EN EL ESTRIADO DE RATA

El efecto del WIN 55,212-2 en la formación de TBARS en tejido estriatal de ratas 24 horas después de ser lesionadas con 3-NP se muestra en la Figura 15. El 3-NP incrementó los niveles de lipoperoxidación en 158 % por arriba del grupo Sham ( $p < 0.05$ ). En contraste, el WIN 55,212-2 previno este efecto en 77 % por debajo del grupo lesionado con 3-NP ( $p < 0.05$ ; 33 % por debajo del grupo Sham). Por su parte, el WIN 55,212-2 solo no tuvo efecto significativo en la peroxidación de lípidos con respecto al grupo Sham.



**Figura 15. El WIN 55,212-2 previno la lipoperoxidación inducida por el 3-NP en el estriado de rata.** A) Valoración de estrés oxidante mediante la técnica de lípidos peroxidados por ácido tiobarbitúrico (TBA) en ratas que fueron lesionadas con 3-NP y/o tratadas con WIN 55,212-2. Anova de una vía y prueba de Bonferroni; \* $p < 0.05$ , diferente de Sham; # $p < 0.05$ , diferente de 3-NP;  $n = 5$ .

## 9. DISCUSIÓN

Históricamente se sabe que el 3-NP es una toxina que se encuentra en algunas plantas (como *Astragalus sp.*) y hongos (como *Aspergillus*). Esta toxina es capaz de generar daño al SNC, lo cual está ampliamente documentado tanto en ganado doméstico como en humanos. El envenenamiento en humanos fue observado en las regiones del Norte de China, por la ingesta de azúcar de caña mohosa que contenía la toxina (Ming, 1995). De 1972 a 1989, al menos 884 casos por envenenamiento de caña fueron reportados y el 10 % de estos casos fue letal. Los niños fueron los más susceptibles a la toxina, y presentaron distonia (trastorno del SNC que afecta al sistema muscular, genera contracciones musculares que causan torceduras y movimientos repetitivos involuntarios, algunas veces son dolorosos y afectan a los músculos de los brazos, piernas, el cuello e incluso el cuerpo entero) que persistió más en jóvenes y en adultos después de la intoxicación por el 3-NP. La toxina también afectó a la industria agrícola en partes occidentales de los Estados Unidos, Canadá y regiones del Norte de México, donde el ganado que se intoxicó presentó signos de mala coordinación en las extremidades, espuma en la boca y nariz, y dificultad para respirar; a una dosis letal para el animal, se producía la muerte en pocas horas después de la ingesta de la toxina. La toxina 3-NP se encontró en *Astragalus*, que prospera en pastos después de períodos prolongados de sequía. En Nuevo México provocó el 3 % de mortalidad y el 20 % de morbilidad en el ganado bovino y ovino. Esto constituye un grave riesgo de salud y requiere atención a todos niveles (Francis et al., 2013).

La toxina preferencialmente llega al estriado, que resulta en un daño mitocondrial y muerte celular. Los efectos tóxicos son evidenciados por reducción parcial en la producción de ATP. El primer signo patológico producido por 3-NP en el cerebro de roedores es la muerte neuronal en el estriado ligada a daño mitocondrial causado al inhibir directamente al complejo II mitocondrial. La inhibición del complejo II sugiere la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, lo cual lleva a la reubicación del citocromo c y a la producción y/o activación de varios factores apoptogénicos, tales como la caspasa-9, Smac/Diablo y calpainas. El 3-NP también genera la producción del  $O_2^-$  y  $\cdot OH$  a través de mecanismos aún no bien definidos, resultando en daño oxidativo a células del estriado, lo cual contribuye su toxicidad general. Por lo tanto, el 3-NP es una toxina que genera interés por estudiar sus mecanismos tóxicos al constituirse como un modelo de daño al SNC. Asimismo, se ha empleado para producir un modelo que semeja la EH al dañar progresivamente a las neuronas del estriado. Esta toxina fue estudiada desde 1977 por Alston y otros científicos (Alston et al., 1977 #34; Brouillet et al., 2005).

Por lo anterior, en este trabajo se indujo daño con 3-NP a nivel intraestriatal bilateral en ratas, y se valoró la motricidad a los 6 días después del tratamiento, generando un patrón de hiperactividad en los animales que concuerda con lo reportado en otros trabajos previos de Borlongan y Lastres Becker, en los cuales, con este mismo modelo, se reportó hiperactividad a las 2 semanas después de la administración de 3-NP ya sea por vía intracerebral o sistémica. A este respecto, se sabe que en el modelo sistémico, los animales requieren varias dosis de 3-NP (10 mg/kg) para producir daño al SNC a las dos semanas, pero si el modelo es intraestriatal, la dosis

que se requiere es menor (de 370 a 500 nmol por  $\mu$ l), como fue recomendado por Borlongan y Lastres-Becker, de cuyos modelos se deduce que esta forma de administración es suficiente para dañar a las mitocondrias y es capaz de generar daño en las neuronas del cuerpo estriado de manera progresiva, afectando a otras regiones como el hipocampo, la corteza, y el tálamo (Hamilton y Gould, 1987; Borlongan et al., 1995; Lastres et al., 2003).

Siguiendo los criterios anteriormente expuestos, optamos por el modelo de lesión intraestriatal. Subsecuentemente, en este trabajo se encontró daño tisular en el estriado dorsal: en el área de lesión se observaron células picnóticas. A este respecto, como perspectiva a futuro para hacer más sólida esta observación, se sugiere marcar por inmunohistoquímica la posible gliosis reactiva y la inflamación derivadas de astrocitos y células de la microglia como respuesta a la toxina 3-NP, así como marcar proteínas específicas de células endoteliales y linfocitos para determinar si hubo infiltración por la lesión de la toxina, de acuerdo a trabajos previos (Túnez et al., 2010).

Adicionalmente, dado que se sabe que el 3-NP inhibe directamente al complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial, se ha reportado que esta toxina puede activar mecanismos de daño celular como el estrés oxidante, la excitotoxicidad, e incluso desencadenar mecanismos apoptóticos como la activación de caspasa-9 y calpains (Francis et al., 2013, Kluckova et al., 2015). De acuerdo a nuestros resultados y a los de otros grupos, sugerimos que el estrés oxidante y la excitotoxicidad son mecanismos desencadenados al momento de inhibir al complejo II mitocondrial, debido a que después de la exposición a la toxina por 24 horas se demostró

evidencia de daño oxidativo a lípidos, los cuales son oxidados por ERO. También se observó un incremento en los niveles de la subunidad NR1 del receptor NMDA, lo que representa un claro riesgo de daño excitotóxico que se deriva del daño mitocondrial, lo cual ocurre a través de la disminución en la producción de ATP, la pérdida en el potencial de reposo de la membrana, y la posible salida de calcio intracelular de sus reservorios, incrementándose este ión en el citoplasma y activando así procesos de daño excitotóxico como la liberación de neurotransmisores, y la despolarización persistente de la membrana. Estos procesos favorecen un proceso en el cual se mantienen activos a los receptores excitatorios, como los receptores glutamatérgicos ionotrópicos tipo NMDA y no-NMDA (para KA y AMPA), así como receptores de dopamina D1 (Bossy et al., 2008; Kreitzer y Malenka, 2008).

El receptor NMDA es un canal transmembranal tetramérico compuesto de subunidades constitutivas NR1, y con la alternancia de subunidades NR2 y/o NR3, donde hay 4 subtipos de NR2 (NR2A-D) y dos subtipos de NR3 (NR3A y NR3B). NR1 es la subunidad funcional junto con la subunidad NR2 en las neuronas (Hallet et al, 2006; Henson et al., 2010). El de NMDA es un receptor particularmente vulnerable a la excitotoxicidad, un proceso que está involucrado en el daño neuronal que desencadena el 3-NP hasta la degeneración celular, como se pudo evidenciar por la pérdida neuronal del estriado al disminuir el porcentaje de neuronas positivas a NeuN en la imagen de inmunofluorescencia a los 7 días después del tratamiento. Entonces, la disfunción motora se explica por la pérdida de células neuronales del estriado, tales como las NEM, que son las principales células involucradas en modular los

movimientos. Esta pérdida de células puede deberse al estrés oxidante, excitotoxicidad y disfunción mitocondrial. La relevancia de la disfunción mitocondrial radica en que este organelo es considerado como el motor energético para la sobrevivencia celular. Por lo tanto, el 3-NP se ha considerado un excelente modelo para el estudio de la EH en animales, debido a que la enfermedad cursa con esta característica patológica. En algunos estudios se ha generado la polémica sobre si la huntingtina mutante también inhibe a la enzima SDH, pero aún no se ha esclarecido (Bossy et al, 2008; Kreitzer y Malenka 2008).

La EH comienza por un trastorno motor, presentando movimientos anormales que se manifiestan como contracciones irregulares musculares que afectan al cuerpo entero y generan discinesia coreica. Esta enfermedad trasciende al afectar las funciones de otras regiones, degenerando por completo otras neuronas del cerebro. Por lo tanto, estos pacientes se deprimen, pierden la memoria, presentan ansiedad, apatía, y discinesia coreica al inicio, mientras que con el progreso de la enfermedad se presenta hipocinesia (lentitud en sus movimientos), e incluso se puede presentar catalepsia (pérdida motora). Se considera una enfermedad rara, y la mayoría de los casos la sufren adultos aproximadamente en la edad de los 40 y adultos mayores. Los pacientes viven aproximadamente 17 años más, y hasta la fecha no existe un tratamiento contra la neurodegeneración. Como tratamientos paliativos se han empleado antipsicóticos, inhibidores de serotonina y dopamina como valproato de sodio, carbamacepina, haloperidol y amantadina (este último también inhibidor de NMDA) con el fin de controlar la ansiedad, apatía, depresión, insomnio y rigidez



muscular. Por lo tanto, se ha considerado seguir el estudio sobre los mecanismos patológicos de la enfermedad para buscar esquemas farmacológicos de neuroprotección y neroregeneración para ayudar a contrarrestar sus síntomas (Domaradzki, 2015).

El sistema endocannabinoide ha destacado como un posible blanco terapéutico para esta y otras enfermedades debido a que se ha encontrado que los fitocannabinoides alivian el dolor, eliminan las náuseas y vómito por el tratamiento de quimioterapias en pacientes con cáncer, mejoran a los pacientes con epilepsia, y recientemente se reporta un valor adicional para la EH porque en algunos de los mecanismos del SEC está involucrada la modulación motora (Sagredo et al., 2012).

Tras la administración del agonista a RCB, el WIN 55,212-2, en el modelo de 3-NP en ratas, encontramos que este agente moduló la actividad motora y previno el daño celular en el estriado (como se puede ver en la protección en la zona de lesión al disminuir el número de células dañadas con respecto al tejido lesionado por 3-NP a los 7 días). Se encontró además que los niveles de RCB1 se ven incrementados a los 7 días después de concluir el tratamiento. Al medir los niveles de la subunidad NR1 de NMDAr, los cuales se esperaba que disminuyeran por la activación de los CB1 como una estrategia para controlar la excitotoxicidad, a los 7 días se observó que no hubo cambios en los niveles de NR1 en los animales tratados con 3-NP, mientras que en las ratas tratadas con WIN 55,212-2 hubo un incremento en los niveles de NR1, igual con las ratas que solo fueron administradas únicamente con

WIN 55,212-2. Sin embargo, a las 24 horas, los niveles de NR1 si disminuyen en los animales lesionados con 3-NP que recibieron además el cannabinoide sintético, a diferencia de las ratas lesionadas con 3-NP. Tratando de demostrar la hipótesis previa de Sanchez-Blazquez , de que la activación de RCB1 internaliza la subunidad NR1 para que sea degradada, concordamos en que la disminución de NMDAr por el cannabinoide a las 24 horas después del tratamiento podría contribuir a la disminución en la excitotoxicidad. De sumo interés es el hecho de que en previos reportes, este mecanismo es evidenciado a pocos minutos y hasta las 3 horas después de la estimulación por el agonista a cannabinoide. Esto concuerda con un aumento en RCB1 al corto plazo después del tratamiento con el WIN 55,212-2.en respuesta al 3-NP (Sánchez et al., 2013; Sánchez et al., 2014)

Los animales que solo recibieron el WIN 55,212-2 presentaron niveles altos de NR1 a las 24 horas y 7 días después del tratamiento, lo que constituye un resultado inesperado. Curiosamente también se observó hiperactividad. Los efectos observados a los 7 días entonces solo pueden ser vistos como efectos de compensación. Es importante considerar aquí los efectos estimulantes de la activación del SEC, siendo que posiblemente a las dosis y los tiempos empleados para WIN 55,212-2 se puedan desencadenar otras vías de señalización en otras regiones del cerebro. Por ejemplo, el SEC puede modular al sistema dopaminérgico, que a su vez puede interactuar sobre los ganglios basales, mesencéfalo, núcleo accumbens, y amígdala (formando el sistema mesolímbico), y que se ha involucrado en el origen de las enfermedades psicológicas y psiquiátricas que pueden ser vistas en pacientes con adicciones, involucrando además procesos cognitivos y

conductuales. La hiperactividad inducida por psicoestimulantes en modelos animales es también conocida como sensibilidad conductual, lo cual fundamenta el proceso de hiperactividad en la adicción mediante dos procesos que la generan: inducción y expresión. *Inducción*: cuando la exposición de fármacos psicoestimulantes es repetida por varios días. *Expresión*: Una respuesta conductual o psicomotora es producida cuando no se consume el fármaco por un tiempo. Esto sugiere que los cannabinoides pueden ser psicoestimulantes, dependiendo de las vías que puedan activar y de acuerdo a las condiciones del tejido (Alcaro et al., 2007; Enayatifard et al., 2013).

De gran interés es el hecho de que estos agentes también activan mecanismos de sobrevivencia en compensación a otros procesos de señalización, para la síntesis de receptores como RCB, NMDAR, GABAR, DAR, etc., activando la liberación de neurotransmisores, e incluso promoviendo eventos de plasticidad. Se sugiere que los RCB1 participan en la señalización para la síntesis de BDNF. El BDNF es una proteína que activa al receptor de sobrevivencia tirosina cinasa B (TrkB), el cual enciende la señalización para activar la proteína cinasa B (AKT). A su vez, AKT favorece la sobrevivencia celular y la plasticidad (Blazquez et al., 2015). En contexto, estas propiedades pueden ayudar a explicar lo que observamos en este trabajo, en el cual el posible efecto protector del WIN 55,212-2 sobre la toxicidad del 3-NP se vio favorecida por la reducción de NMDAR a las 24 horas post-tratamiento. Aplicado solo a los animales, este cannabinoide incrementó los niveles de NR1 a las 24 horas, manifestándose la etapa de “inducción”, mientras que a los 6 días de exposición al cannabinoide solo, la respuesta de hiperactividad puede estar evidenciando la etapa

de “expresión”. Por lo anterior, es importante continuar el estudio de este modelo para caracterizar otros mecanismos inherentes a la activación del SEC, aunque debe tomarse en cuenta que si bien el WIN 55,212-2 generó *per se* cambios celulares y motores, estos no parecen favorecer el daño celular ni tisular, siendo respuestas a otros mecanismos en los que participan los cannabinoides en general (Enayatfard et al., 2013).

A este respecto, si bien cabe mencionar que algunos cannabinoides pueden inducir una respuesta psicótica por abuso en su consumo, también es importante considerar que pueden participar de manera terapéutica para generar protección en modelos tóxicos como el 3-NP en este estudio. Entre sus mecanismos, el WIN 55,212-2 participó en la defensa antioxidante al prevenir el daño oxidativo a lípidos, sugiriendo que este agente puede ejercer diversos mecanismos de protección (probablemente como antioxidante además) y que su uso realmente constituye una valiosa estrategia terapéutica a nivel experimental para preservar la integridad estructural y funcional del tejido cerebral. Este agonista se emplea a nivel experimental *in vivo* como *in vitro*, pero su propuesta de empleo a nivel clínico requiere de más estudios toxicológicos y de fase 3. Una gran variedad de agonistas cannabinoides al RCB1 que se emplean para el estudio de mecanismos del SEC, tales como el CP 55-940, o el AM404, han sido probados, generando mejoría en la función del sistema GABAérgico, aunque los efectos benéficos de estos cannabinoides también pueden estar relacionados a la activación de otros receptores que forman al sistema endocannabinoide, incluyendo los receptores RCB2 y vanilloides (Lastres et al., 2002). Por el momento, existe suficiente evidencia para postular que los RCB1 desempeñan un papel crucial para la

prevención del daño en el modelo tóxico producido por 3-NP en este estudio. Dado que la pérdida de receptores RCB1 ocurre en los ganglios basales al menos durante el estado acinético del modelo, se promueve el desarrollo de estrategias terapéuticas basadas en cannabinoides para estimular la activación y regulación transcripcional de estos receptores con fines terapéuticos. A este respecto, en la industria farmacológica ya se encuentra disponible el Sativex, un fármaco que como principio activo tiene al  $\Delta^9$ -THC y al cannabidiol. Este agente ha tenido muy buenos efectos en pacientes con cáncer, epilepsia y más recientemente en pacientes con Huntington (Sagredo et al, 2012).

## **10.CONCLUSION**

El agente cannabinoide WIN 55,212-2, posiblemente a través de la activación de RCB1, previno las alteraciones producidas por el 3-NP en ratas en un modelo experimental de la EH, mejorando a los siete días post-lesión la actividad motora (hiperactividad) y los cambios morfológicos (daño celular estriatal) como parte de la respuesta de daño neuronal, mientras que a tiempos tempranos este agente disminuyó el contenido proteico de NR1, contrarrestando la excitotoxicidad mediada por NMDAR e inducida por 3-NP. El WIN 55,212-2 también previno el estrés oxidante evidenciado por el daño oxidativo a lípidos, sugiriendo que el uso de este agente realmente constituye una valiosa herramienta terapéutica a nivel experimental para preservar la integridad estructural y funcional del tejido cerebral.

## 11.PERSPECTIVAS

1. Estudiar el papel preciso que juega la activación del sistema endocannabinoide (a través de estudios de regulación de RCB1 y RCB2 por ARNm) en la prevención de mecanismos de excitotoxicidad inducida en el modelo de 3-NP *in vivo* por el uso de antagonistas selectivos a sus receptores.
2. Evaluar mecanismos de daño mitocondrial y celular que se generan por la inhibición del complejo II mitocondrial, y el mecanismo de protección que ejerce el SEC en estos escenarios *in vitro*.
3. Estimar la respuesta de sobrevivencia celular por TrkB y la actividad de otros receptores como GABA y DA.

## 12. REFERENCIAS

- Acin, R., & Enriquez, J. A. (2014). The function of the respiratory supercomplexes: the plasticity model. *Biochim Biophys Acta*, 1837(4), 444-450. doi: 10.1016/j.bbabi.2013.12.009
- Aguilera, G., & Santamaría, A. (2016). The Potential Therapeutic Role of the Cannabinoid System in Neurological Disorders of the Basal Ganglia: An Overview. *Cannabinoids in Health and Disease*, 39-58.
- Alarcon, A., Luna, A., Ventura, J. L., Lazzarini, R., Galvan, S., Gonzalez, V. Y., . . . Konigsberg, M. (2014). Primary cultured astrocytes from old rats are capable to activate the Nrf2 response against MPP+ toxicity after tBHQ pretreatment. *Neurobiol Aging*, 35(8), 1901-1912. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.01.143
- Alcaro, A., Huber, R., & Panksepp, J. (2007). Behavioral functions of the mesolimbic dopaminergic system: an affective neuroethological perspective. *Brain Res Rev*, 56(2), 283-321. doi: 10.1016/j.brainresrev.2007.07.014
- Alston, T. A., Mela, L., & Bright, H. J. (1977). 3-Nitropropionate, the toxic substance of *Indigofera*, is a suicide inactivator of succinate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(9), 3767-3771.
- Barrera, G., Gentile, F., Pizzimenti, S., Canuto, R. A., Daga, M., Arcaro, A., . . . Muzio, G. (2016). Mitochondrial Dysfunction in Cancer and Neurodegenerative Diseases: Spotlight on Fatty Acid Oxidation and Lipoperoxidation Products. *Antioxidants (Basel)*, 5(1). doi: 10.3390/antiox5010007
- Bisogno, T., Oddi, S., Piccoli, A., Fazio, D., & Maccarrone, M. (2016). Type-2 cannabinoid receptors in neurodegeneration. *Pharmacol Res*, 111, 721-730. doi: 10.1016/j.phrs.2016.07.021
- Blazquez, C., Chiarlone, A., Bellocchio, L., Resel, E., Pruunsild, P., Garcia, D., . . . Guzman, M. (2015). The CB(1) cannabinoid receptor signals striatal neuroprotection via a PI3K/Akt/mTORC1/BDNF pathway. *Cell Death Differ*, 22(10), 1618-1629. doi: 10.1038/cdd.2015.11
- Borlongan, C. V., Koutouzis, T. K., Freeman, T. B., Cahill, D. W., & Sanberg, P. R. (1995). Behavioral pathology induced by repeated systemic injections of 3-nitropropionic acid mimics the motoric symptoms of Huntington's disease. *Brain Res*, 697(1-2), 254-257.
- Borlongan, C. V., Koutouzis, T. K., Randall, T. S., Freeman, T. B., Cahill, D. W., & Sanberg, P. R. (1995). Systemic 3-nitropropionic acid: behavioral deficits and striatal damage in adult rats. *Brain Res Bull*, 36(6), 549-556.



- Borlongan, C. V., Nishino, H., & Sanberg, P. R. (1997). Systemic, but not intraparenchymal, administration of 3-nitropropionic acid mimics the neuropathology of Huntington's disease: a speculative explanation. *Neurosci Res*, 28(3), 185-189.
- Borlongan, C. V., Randall, T. S., Cahill, D. W., & Sanberg, P. R. (1995). Asymmetrical motor behavior in rats with unilateral striatal excitotoxic lesions as revealed by the elevated body swing test. *Brain Res*, 676(1), 231-234.
- Bossy, E., Petrilli, A., & Knott, A. B. (2008). Mutant huntingtin and mitochondrial dysfunction. *Trends Neurosci*, 31(12), 609-616. doi: 10.1016/j.tins.2008.09.004
- Brouillet, E., Jacquard, C., Bizat, N., & Blum, D. (2005). 3-Nitropropionic acid: a mitochondrial toxin to uncover physiopathological mechanisms underlying striatal degeneration in Huntington's disease. *J Neurochem*, 95(6), 1521-1540. doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03515.x
- Cepeda, C., Andre, V. M., Yamazaki, I., Wu, N., Kleiman, M., & Levine, M. S. (2008). Differential electrophysiological properties of dopamine D1 and D2 receptor-containing striatal medium-sized spiny neurons. *Eur J Neurosci*, 27(3), 671-682. doi: 10.1111/j.1460-9568.2008.06038.x
- Coles, C. J., Edmondson, D. E., & Singer, T. P. (1979). Inactivation of succinate dehydrogenase by 3-nitropropionate. *J Biol Chem*, 254(12), 5161-5167.
- Colín, A. L., Aguilera, G., & Santamaria, A. (2016). Cannabinoids: Glutamatergic Transmission and Kynurenines. *Adv Neurobiol*, 12, 173-198. doi: 10.1007/978-3-319-28383-8\_10
- Colín, A. L., Becerril, H., Flores-Reyes, B. R., Torres, I., Pinzon, E., Santamaría, D., . . . Maldonado, P. D. (2015). Acute restraint stress reduces hippocampal oxidative damage and behavior in rats: Effect of S-allyl cysteine. *Life Sci*, 135, 165-172. doi: 10.1016/j.lfs.2015.06.009
- Colín, A. L., Luna, A., Konigsberg, M., Ali, S. F., Pedraza, J., & Santamaria, A. (2014). Early modulation of the transcription factor Nrf2 in rodent striatal slices by quinolinic acid, a toxic metabolite of the kynurenine pathway. *Neuroscience*, 260, 130-139. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.12.025
- Colín, A. L., Ortiz, A., Villeda, J., Barrera, D., Molina, E., Pedraza, J., & Maldonado, P. D. (2011). Aged garlic extract attenuates cerebral damage and cyclooxygenase-2 induction after ischemia and reperfusion in rats. *Plant Foods Hum Nutr*, 66(4), 348-354. doi: 10.1007/s11130-011-0251-3

- Chiodi, V., Uchigashima, M., Beggiato, S., Ferrante, A., Armida, M., Martire, A., . . . Popoli, P. (2012). Unbalance of CB1 receptors expressed in GABAergic and glutamatergic neurons in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Neurobiol Dis*, *45*(3), 983-991. doi: 10.1016/j.nbd.2011.12.017
- Domaradzki, J. (2015). The Impact of Huntington Disease on Family Carers: a Literature Overview. *Psychiatr Pol*, *49*(5), 931-944. doi: 10.12740/pp/34496
- Dong, X. X., Wang, Y., & Qin, Z. H. (2009). Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol Sin*, *30*(4), 379-387. doi: 10.1038/aps.2009.24
- Enayatfard, L., Rostami, F., Nasoohi, S., Oryan, S., Ahmadiani, A., & Dargahi, L. (2013). Dual role of PPAR-gamma in induction and expression of behavioral sensitization to cannabinoid receptor agonist WIN55,212-2. *Neuromolecular Med*, *15*(3), 523-535. doi: 10.1007/s12017-013-8238-x
- Fan, M. M., & Raymond, L. A. (2007). N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor function and excitotoxicity in Huntington's disease. *Prog Neurobiol*, *81*(5-6), 272-293. doi: 10.1016/j.pneurobio.2006.11.003
- Fernandez, J., Moreno, M., Rodriguez, C., Palomo, C., Gomez, M., Valdeolivas, S., . . . Ramos, J. A. (2011). Prospects for cannabinoid therapies in basal ganglia disorders. *Br J Pharmacol*, *163*(7), 1365-1378. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01365.x
- Francis, K., Smitherman, C., Nishino, S. F., Spain, J. C., & Gadda, G. (2013). The biochemistry of the metabolic poison propionate 3-nitronate and its conjugate acid, 3-nitropropionate. *IUBMB Life*, *65*(9), 759-768. doi: 10.1002/iub.1195
- Gómez, L. E., Cuevas, D. B., & Königsberg, M. (2008). ERO y Señalización. *Radicales Libres y Estrés Oxidante. Aplicaciones médicas.*, 487-500.
- Hallett, P. J., Spoelgen, R., Hyman, B. T., Standaert, D. G., & Dunah, A. W. (2006). Dopamine D1 activation potentiates striatal NMDA receptors by tyrosine phosphorylation-dependent subunit trafficking. *J Neurosci*, *26*(17), 4690-4700. doi: 10.1523/jneurosci.0792-06.2006
- Hamilton, B. F., & Gould, D. H. (1987). Nature and distribution of brain lesions in rats intoxicated with 3-nitropropionic acid: a type of hypoxic (energy deficient) brain damage. *Acta Neuropathol*, *72*(3), 286-297.
- Henson, M. A., Roberts, A. C., Perez-Otano, I., & Philpot, B. D. (2010). Influence of the NR3A subunit on NMDA receptor functions. *Prog Neurobiol*, *91*(1), 23-37. doi: 10.1016/j.pneurobio.2010.01.004

- Howlett, A. C., Barth, F., Bonner, T. I., Cabral, G., Casellas, P., Devane, W. A., . . . Pertwee, R. G. (2002). International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev*, *54*(2), 161-202.
- Kluckova, K., Sticha, M., Cerny, J., Mracek, T., Dong, L., Drahota, Z., . . . Rohlena, J. (2015). Ubiquinone-binding site mutagenesis reveals the role of mitochondrial complex II in cell death initiation. *6*, e1749. doi: 10.1038/cddis.2015.110
- Königsberg, M. (2008). Orígenes de las Especies Reactivas de Oxígeno y de Nitrógeno. *Radicales Libres y Estrés Oxidativo. Aplicaciones Médicas*, 49-93.
- Konigsberg, M., Perez, V. I., Rios, C., Liu, Y., Lee, S., Shi, Y., & Van Remmen, H. (2013). Effect of oxygen tension on bioenergetics and proteostasis in young and old myoblast precursor cells. *Redox Biol*, *1*, 475-482. doi: 10.1016/j.redox.2013.09.004
- Kreitzer, A. C., & Malenka, R. C. (2008). Striatal plasticity and basal ganglia circuit function. *Neuron*, *60*(4), 543-554. doi: 10.1016/j.neuron.2008.11.005
- Kudo, T., Loh, D. H., Tahara, Y., Truong, D., Hernandez-Echeagaray, E., & Colwell, C. S. (2014). Circadian dysfunction in response to in vivo treatment with the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *ASN Neuro*, *6*(1), e00133. doi: 10.1042/an20130042
- Lastres, I., de Miguel, R., De Petrocellis, L., Makriyannis, A., Di Marzo, V., & Fernandez, J. (2003). Compounds acting at the endocannabinoid and/or endovanilloid systems reduce hyperkinesia in a rat model of Huntington's disease. *J Neurochem*, *84*(5), 1097-1109.
- Lastres, I., Gomez, M., De Miguel, R., Ramos, J. A., & Fernandez, J. (2002). Loss of cannabinoid CB(1) receptors in the basal ganglia in the late akinetic phase of rats with experimental Huntington's disease. *Neurotox Res*, *4*(7-8), 601-608. doi: 10.1080/10298420290030514
- Lastres, I., Hansen, H. H., Berrendero, F., De Miguel, R., Perez, A., Manzanares, J., . . . Fernandez, J. (2002). Alleviation of motor hyperactivity and neurochemical deficits by endocannabinoid uptake inhibition in a rat model of Huntington's disease. *Synapse*, *44*(1), 23-35. doi: 10.1002/syn.10054
- Mayer, I. M., & Orth, M. (2014). Neurophysiology in Huntington's disease: an update. *Neurodegener Dis Manag*, *4*(2), 155-164. doi: 10.2217/nmt.14.1
- Mendez, M., Herrera, A., Soría-, E. J., Rueda, P. E., & Próspero, O. (2008). Mighty cannabinoids: A potential pharmacological tool in medicine *Neural Mechanisms of Action of Drugs of Abuse and Natural Reinforcers*, *37*/661(2), 137-157.

- Ming, L. (1995). Moldy sugarcane poisoning--a case report with a brief review. *J Toxicol Clin Toxicol*, 33(4), 363-367.
- Miranda, L. (2008). Química de los Radicales Libres. *Radicales Libres y Estrés Oxidativo. Aplicaciones Médicas*, 3-21.
- Morera, T., Miguelez, C., Aristieta, A., Torrecilla, M., Ruíz, J. A., & Uguedo, L. (2016). Cannabinoids and Motor Control of the Basal Ganglia: Therapeutic Potential in Movement Disorders. *Cannabinoids in Health and Disease*, 59-92.
- Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*, 417(1), 1-13. doi: 10.1042/bj20081386
- Nishimura, M., Okimura, Y., Fujita, H., Yano, H., Lee, J., Suzaki, E., . . . Sasaki, J. (2008). Mechanism of 3-nitropropionic acid-induced membrane permeability transition of isolated mitochondria and its suppression by L-carnitine. *Cell Biochem Funct*, 26(8), 881-891. doi: 10.1002/cbf.1521
- Pietropaolo, S., Bellocchio, L., Ruiz, A., Cabanas, M., Du, Z., Guzman, M., . . . Cho, Y. H. (2015). Chronic cannabinoid receptor stimulation selectively prevents motor impairments in a mouse model of Huntington's disease. *Neuropharmacology*, 89, 368-374. doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.07.021
- Pintor, A., Tebano, M. T., Martire, A., Grieco, R., Galluzzo, M., Scattoni, M. L., . . . Popoli, P. (2006). The cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 attenuates the effects induced by quinolinic acid in the rat striatum. *Neuropharmacology*, 51(5), 1004-1012. doi: 10.1016/j.neuropharm.2006.06.013
- Sagredo, O., Pazos, M. R., Valdeolivas, S., & Fernandez-Ruiz, J. (2012). Cannabinoids: novel medicines for the treatment of Huntington's disease. *Recent Pat CNS Drug Discov*, 7(1), 41-48.
- Sanchez, P., Rodriguez, M., & Garzon, J. (2014). The cannabinoid receptor 1 associates with NMDA receptors to produce glutamatergic hypofunction: implications in psychosis and schizophrenia. *Front Pharmacol*, 4, 169. doi: 10.3389/fphar.2013.00169
- Sanchez, P., Rodriguez, M., Vicente-Sanchez, A., & Garzon, J. (2013). Cannabinoid receptors couple to NMDA receptors to reduce the production of NO and the mobilization of zinc induced by glutamate. *Antioxid Redox Signal*, 19(15), 1766-1782. doi: 10.1089/ars.2012.5100

- Santamaria, A., Jimenez, M. E., Camacho, A., Rodriguez, E., Flores, A., & Galvan, S. (2001). In vivo hydroxyl radical formation after quinolinic acid infusion into rat corpus striatum. *Neuroreport*, *12*(12), 2693-2696.
- Saraste, M. (1999). Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. *Science*, *283*(5407), 1488-1493.
- Tatem, K. S., Quinn, J. L., Phadke, A., Yu, Q., Gordish-Dressman, H., & Nagaraju, K. (2014). Behavioral and locomotor measurements using an open field activity monitoring system for skeletal muscle diseases. *J Vis Exp*(91), 51785. doi: 10.3791/51785
- Tunez, I., Tasset, I., Perez, V., & Santamaria, A. (2010). 3-Nitropropionic acid as a tool to study the mechanisms involved in Huntington's disease: past, present and future. *Molecules*, *15*(2), 878-916. doi: 10.3390/molecules15020878
- Vilela, L. R., Medeiros, D. C., Rezende, G. H., de Oliveira, A. C., Moraes, M. F., & Moreira, F. A. (2013). Effects of cannabinoids and endocannabinoid hydrolysis inhibition on pentylenetetrazole-induced seizure and electroencephalographic activity in rats. *Epilepsy Res*, *104*(3), 195-202. doi: 10.1016/j.eplesyres.2012.11.006
- Waldvogel, H. J., & Faull, R. L. (2015). The diversity of GABA(A) receptor subunit distribution in the normal and Huntington's disease human brain. *Adv Pharmacol*, *73*, 223-264. doi: 10.1016/bs.apha.2014.11.010
- Warby, S. C., Visscher, H., Collins, J. A., Doty, C. N., Carter, C., Butland, S. L., . . . Hayden, M. R. (2011). HTT haplotypes contribute to differences in Huntington disease prevalence between Europe and East Asia. *Eur J Hum Genet*, *19*(5), 561-566. doi: 10.1038/ejhg.2010.229
- Wiley, J. L., Marusich, J. A., & Huffman, J. W. (2014). Moving around the molecule: relationship between chemical structure and in vivo activity of synthetic cannabinoids. *Life Sci*, *97*(1), 55-63. doi: 10.1016/j.lfs.2013.09.011