

Efectos a largo plazo de la coadministración subtóxica de ácido 3-nitropropiónico y ácido quinolínico en el estriado de rata

Alim Caelli Fuentes-Bello,* Diana Pérez-Carrera,† Verónica Pérez-de la Cruz,* Abel Santamaría-del Ángel,* Paul Carrillo-Mora[§]

* Laboratorio de Aminoácidos Excitadores, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía «Manuel Velasco Suárez».

† Laboratorio de Neurociencia Cognitiva, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

§ División de Rehabilitación Neurológica, Instituto Nacional de Rehabilitación.

Dirección para correspondencia:
Paul Carrillo-Mora
Instituto Nacional de Rehabilitación,
Calz. México-Xochimilco Núm. 289,
Col. Arenal de Guadalupe, 14389,
Deleg. Tlalpan,
Ciudad de México, D.F.
Tel: (01-55) 5999-1000,
ext. 13229.
Fax: 5603-9138.
E-mail:
neuropolaco@yahoo.com.mx

Este artículo puede ser consultado en
versión completa en:
<http://www.medigraphic.com/rid>

Palabras clave: Ácido quinolínico, ácido 3-nitropropiónico, excitotoxicidad, subtóxico, cuerpo estriado.

Key words: Quinolinic acid, 3-nitropropionic acid, excitotoxicity, subtoxic, striatum.

Resumen

Introducción: La excitotoxicidad y las alteraciones del metabolismo energético son dos eventos implicados en el daño neuronal observado en patologías neurodegenerativas. El ácido 3-nitropropiónico y el ácido quinolínico son dos toxinas ampliamente utilizadas para reproducir mecanismos de disfunción del metabolismo energético y excitotoxicidad, respectivamente; sin embargo, se desconoce si la coadministración subtóxica de ácido quinolínico y ácido 3-nitropropiónico puede tener efectos aditivos a largo plazo. **Objetivo:** Conocer los efectos estriatales *ex vivo* de la administración subtóxica de ácido 3-nitropropiónico y ácido quinolínico a largo plazo sobre los niveles de peroxidación lipídica, la funcionalidad mitocondrial, los niveles estriatales totales de ácido gamma-aminobutírico y la morfología celular del cuerpo estriado en ratas. **Metodología:** Se utilizaron ratas Wistar macho (260-300 g) y se formaron cuatro grupos (7-8 c/u; 3-4 para pruebas bioquímicas y 4 para análisis morfológico): 1) control: 1 µL de solución salina intraestriatal (i.e.) bilateral y 0.5 mL de solución salina intraperitoneal (i.p.); 2) ácido 3-nitropropiónico subtóxico (9 mg/kg) i.p.; 3) ácido quinolínico subtóxico (120 nM/µL) 1 µL i.e. bilateral, y 4) ácido 3-nitropropiónico + ácido quinolínico subtóxicos. Treinta días después se evaluó la peroxidación lipídica y la funcionalidad mitocondrial (ambas en sinaptosomas de estriado), la morfología celular en cortes de estriado y los niveles estriatales totales de ácido gamma-aminobutírico. **Resultados:** En el grupo de coadministración de ambas sustancias se observó un incremento significativo de los niveles de peroxidación lipídica y en el número de células estriatales dañadas, así como una disminución significativa de la funcionalidad mitocondrial respecto del grupo control y los grupos con aplicación de dosis subtóxicas. En los niveles estriatales totales de ácido gamma-aminobutírico se observó una disminución en el grupo coadministrado respecto del control pero esta reducción no fue significativa. **Conclusión:** En este modelo se confirmó que la administración subtóxica de ácido 3-nitropropiónico y ácido quinolínico puede producir un efecto de facilitación tóxica a largo plazo. Este estudio sugiere que la coexistencia de alteraciones sutiles del metabolismo energético y excitotoxicidad puede desencadenar mecanismos tóxicos a mayor escala.

Abstract

Introduction: Excitotoxicity and impaired energy metabolism are two events involved in the neuronal damage observed in neurodegenerative diseases. 3-nitropropionic acid and quinolinic acid are two toxins widely used to reproduce mechanisms of energy metabolism dysfunction and excitotoxicity, respectively; however, it is unknown whether the co-administration of quinolinic acid and 3NP at subtoxic dose may have additive effects on long-term. **Objective:** To determine the long-term effects of 3-nitropropionic acid and quinolinic acid subtoxic administration on lipid peroxidation levels, mitochondrial functionality, total striatal gamma-aminobutyric acid levels and cell morphology of the striatum neurons in rats. **Methods:** Male Wistar rats (260-300 g) were used and four groups were formed ($n = 7-8$; 3-4 rats for biochemical test and 4 rats for morphological analysis): 1) Control: 1 µL intraestriatal

(ie) saline and 0.5 mL intraperitoneally (ip) saline solution administration; 2) subtoxic 3-NP (9 mg/kg) ip; 3) Subtoxic quinolinic acid (120 nM/ μ L) ie; and 4) subtoxic 3NP + subtoxic quinolinic acid. After thirty days after the peroxidation levels and mitochondrial functionality (both in striatal synaptosomes), striatal cell morphology, and total striatal gamma aminobutyric acid levels were evaluated. **Results:** In the subtoxic co-administration group there was a significant increase in peroxidation levels and in the number of striatal damaged cells, and also a significant decrease of mitochondrial functionality with respect to subtoxic and control groups. Moreover, the total striatal gamma aminobutyric acid content showed a decrease in the subtoxic co-administration group relative to the control but this reduction was not significant. **Conclusion:** This model confirms that subtoxic co-administration of 3-nitropropionic acid and quinolinic acid may produce a toxic facilitation effect in the long-term. This study suggests that the coexistence of subtle alterations of energy metabolism and excitotoxicity can trigger toxic mechanisms at a larger scale.

Introducción

La excitotoxicidad y la disfunción del metabolismo energético son dos procesos de daño neuronal que están muy relacionados con la fisiopatología de diversas enfermedades neurológicas tanto agudas como crónicas.¹ La excitotoxicidad es un proceso patológico neuronal que ocurre como consecuencia de la sobreactivación de receptores de aminoácidos excitadores como el glutamato y sus análogos.² En particular, los receptores glutamatérgicos ionotrópicos de tipo N-metil-D-aspartato (NMDA), juegan un papel central en este mecanismo de toxicidad, debido a su alta permeabilidad a los iones de Ca^{2+} . La sobreactivación de los receptores NMDA provoca un incremento de las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} , lo cual desencadena una serie de mecanismos tóxicos relacionados con la activación de enzimas proteolíticas calcio-dependientes que ocasionan disfunción mitocondrial, alteración del metabolismo energético, formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y de nitrógeno (ERN), y finalmente la muerte neuronal por necrosis o apoptosis.^{1,2}

Por otro lado, el tejido nervioso resulta especialmente vulnerable a las alteraciones del metabolismo energético debido a varios factores: el metabolismo neuronal elevado, su constante demanda de sustratos, su alta dependencia del metabolismo oxidativo y su baja disponibilidad de reservas energéticas.^{3,4} Por tal razón, cualquier alteración en el metabolismo energético representa un riesgo potencial para el daño y muerte neuronal.⁴ Cambios en la accesibilidad de los sustratos energéticos (deprivación de oxígeno o glucosa) o alteraciones en la función mitocondrial neuronal conducen a una reducción de la producción de adenosín trifosfato (ATP, por sus siglas en inglés) así como a un incremento en la producción de ERO. La

deficiencia de ATP produce disfunción de las bombas iónicas membranales dependientes de ATP, con lo que se altera el potencial de membrana en reposo y finalmente conduce a la despolarización de la membrana. La despolarización de la membrana favorece la activación de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) induciendo entrada de Ca^{2+} (excitotoxicidad secundaria) perpetuando así el daño y conduciendo a la muerte neuronal. Resulta evidente que ambos procesos (excitotoxicidad y déficit energético) comparten mecanismos de toxicidad y vías efectoras comunes, por lo tanto, también es muy común que ambos procesos coexistan y se retroalimenten participando en el daño neuronal que se observa en distintas enfermedades neurológicas.¹

El ácido quinolínico (ácido 2,3-piridin bicarboxílico) es una molécula endógena producida por el catabolismo del triptófano a través de la vía de la kinurenina.⁵ Esta vía catabólica endógena tiene como producto final la síntesis de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+), y se ha reportado que está presente principalmente en el hígado y en el tejido nervioso de humanos, primates no humanos, roedores y otros mamíferos.⁶ La importancia de la vía de kinurenina radica en que se estima que en el sistema nervioso central de los mamíferos más del 90% de triptófano es metabolizado a través de esta vía, además de que produce algunos metabolitos intermediarios que han demostrado tener propiedades neuroactivas (ácido kinurénico y ácido quinolínico).⁷ El ácido quinolínico (QUIN) es una molécula que ha demostrado poseer distintos mecanismos de toxicidad; por un lado, actúa como un agonista directo de los receptores NMDA, principalmente de tipo NR2A y NR2B, generando daño neuronal por excitotoxicidad, pero además, se ha demostrado que puede formar complejos con el Fe^{2+} induciendo la formación directa de radicales libres como el radical hidroxilo,

y es capaz de inhibir la recaptura de glutamato por parte de las células gliales, aumentando las concentraciones de glutamato y exacerbando el proceso de excitotoxicidad.⁷⁻⁹ La naturaleza endógena y tóxica del QUIN ha llevado a involucrarlo en la fisiopatología de muchos desórdenes neurológicos tanto agudos como crónicos: epilepsia, enfermedades cerebrovasculares, demencia por virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y diversas enfermedades neurodegenerativas.¹⁰ Experimentalmente la administración intraestriatal de QUIN en roedores constituye uno de los modelos tóxicos que más se utiliza para reproducir las alteraciones conductuales y bioquímicas que se observan en la enfermedad de Huntington, además de que es una herramienta ampliamente utilizada para generar y estudiar procesos de excitotoxicidad.⁸

El ácido 3-nitropropiónico (3NP) es una toxina de origen micótico que actúa mediante la inhibición irreversible de la enzima succinato deshidrogenasa que forma parte de complejo II de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Esta enzima es responsable de la oxidación de succinato a fumarato y su inhibición conduce a la reducción de la síntesis de ATP, incremento en la producción de EROs y muerte neuronal.¹¹ La observación clínica de que la ingesta accidental de 3NP produce degeneración preferencial del putamen, núcleo caudado, corteza cerebral e hipocampo, lo cual se relaciona con la presencia de movimientos anormales y deterioro cognitivo en humanos, condujo a estudiar sus mecanismos de toxicidad y más tarde a su utilización (por administración sistémica o intracerebral) como modelo tóxico de enfermedad de Huntington en roedores.¹¹

En el estudio previo llevado a cabo por Jacquard y colaboradores (2006), tanto *in vivo* como *in vitro*, se demostró que el déficit energético moderado y establecido de forma crónica puede exacerbar la degeneración estriatal aguda generada por dosis bajas de QUIN; además de demostrar que en este efecto de potenciación están principalmente involucradas la activación masiva de las calpaínas, la escisión de proteínas postsinápticas y la alteración de la homeostasis intracelular de calcio.¹²

La excitotoxicidad y el déficit energético son dos procesos patológicos que se ha demostrado ampliamente que coexisten en diversas enfermedades neurológicas. Estudios previos sugieren que alteraciones en uno de estos procesos puede incrementar el efecto tóxico del otro, aunque ambos procesos por separado no lleguen a producir toxicidad significativa.¹² En los estudios *in vivo* llevados a cabo por Elinos-Calderón y asociados (2010) y Pérez De la Cruz y su grupo (2010), se demostró que

infusiones intraestriatales menores a 240 nmol/ μ L de QUIN y dosis sistémicas menores a 10 mg/kg de 3NP no provocan efectos tóxicos significativos sobre marcadores de estrés oxidante y función mitocondrial.^{13,14} Sin embargo, hasta el momento no se han estudiado los efectos de la coadministración subtóxica (sobre marcadores como: los niveles estriatales de ácido gamma-aminobutírico [GABA, por sus siglas en inglés] o la morfología neuronal estriatal) de sustancias con mecanismos de acción diferentes a nivel estriatal (3-NP y QUIN), y menos aún se ha estudiado si estos efectos persisten en el largo plazo (30 días). El estudio de los efectos sinérgicos de estas dos toxinas cobra relevancia debido a que estas dos condiciones (excitotoxicidad y déficit energético) de forma moderada pueden ocurrir comúnmente, incluso en estados fisiológicos como el envejecimiento, pudiendo así contribuir al origen de distintas enfermedades neurodegenerativas.

Material y métodos

Animales

Se emplearon ratas Wistar macho con un peso de entre 280-300 g, provistas por el bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Los animales fueron alojados cinco por cada caja empleando cajas de acrílico y recibieron una dieta comercial estándar (*Laboratory rodent diet 5001, PMI Feeds Inc, Richmond, IN USA*) y agua *ad libitum*. Todos los animales fueron mantenidos bajo condiciones constantes de temperatura (25 ± 3 °C), humedad ($50 \pm 10\%$) y luz (ciclos de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad) en el bioterio antes referido. Todos los procedimientos con los animales fueron llevados a cabo de acuerdo con la Guía para el Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio (2011).¹⁵ Durante los experimentos se hicieron todos los esfuerzos para minimizar el sufrimiento de los animales y utilizar el menor número posible de los mismos.

Grupos y cirugía estereotáxica

Para los procedimientos con los diferentes grupos experimentales, los animales fueron seleccionados aleatoriamente y se formaron cuatro grupos (7-8 individuos por grupo; 3-4 ratas para pruebas bioquímicas y 4 para el análisis morfológico): 1) control: recibió 1 μ L de solución salina al 0.9% intraestriatal (i.e.) y 0.3 mL de solución salina al 0.9% intraperitoneal (i.p.); 2) QUIN: recibió QUIN 240 nm/ μ L en total (120 nm/ μ L en cada estriado); 3) 3-NP: recibió una dosis de 3-NP (9 mg/kg) i.p.; 4) QUIN + 3NP: recibió QUIN 240 nm/

μL i.e. + 3-NP (9 mg/kg) i.p. Para la administración intraestriatal los animales fueron previamente anestesiados con pentobarbital sódico (50 mg/kg i.p.) y 20 minutos después se infundió el QUIN o solución salina (empleando una jeringa Hamilton de 10 μL) en las siguientes coordenadas estereotáxicas en relación con el Bregma: AP: + 0.5 mm, lateral: \pm 2.6 mm y ventral a la duramadre: -4.5 mm.¹⁶ Todas las mediciones bioquímicas y morfológicas siguientes se realizaron 30 días después de la administración de las toxinas.

Pruebas bioquímicas

Treinta días después de la administración de las toxinas, los animales fueron sacrificados mediante decapitación extrayendo rápidamente el cerebro y preservándolo en hielo por pocos segundos hasta que ambos estriados fueron disecados y procesados para la obtención de las fracciones sinaptosomales P2 usando el método previamente estandarizado descrito por Pérez De la Cruz y su grupo.¹⁷ Las fracciones sinaptosomales fueron preservadas a -70 °C hasta que el resto de las determinaciones fueron realizadas.

La peroxidación de lípidos fue estimada en fracciones sinaptosomales empleando el ensayo espectrofotométrico de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) como se ha reportado con anterioridad.¹⁴ Las concentraciones finales de las sustancias reactivas al TBA (TBARS) fueron calculadas por interpolación en una curva estándar (calibración) de malondialdehído (MDA) y corregidas según el contenido de proteína determinado para cada muestra por el método de Lowry.¹⁸ Los resultados fueron expresados como nanomoles de TBARS por miligramo de proteína. La funcionalidad mitocondrial fue evaluada en fracciones sinaptosomales por el método espectrofotométrico de reducción de azul tiazolil bromuro de tetrazolio (MTT) a formazán, según se ha descrito con anterioridad.¹⁷ Los resultados fueron expresados como el porcentaje de reducción de MTT respecto a los valores control. Las concentraciones de ácido gamma-aminobutírico (GABA) en el estriado total fueron cuantificadas con cromatografía líquida de alta resolución usando una derivatización de precolumna o-phtalaldehído/t-butitilol (OPA), y su concentración se estimó realizando una curva de concentración empleando un estándar de GABA como se ha descrito previamente.¹⁹

Morfología estriatal

Treinta días después de la administración de las toxinas los animales fueron sacrificados mediante

una sobredosis de pentobarbital i.p. y el cerebro fue perfundido por vía cardiaca con solución salina al 0.9% pH 7.4 (200 mL aproximadamente) y paraformaldehído al 4% en buffer de fosfatos (PBS). Posteriormente, se extrajo el cerebro y se realizó postfijación por 48-72 horas en una solución de paraformaldehído al 4% en PBS. Más tarde se realizó el procedimiento de inclusión en bloques de parafina para después obtener cortes coronales de 5 m de espesor. Todos los cortes coronales fueron obtenidos del estriado dorsal aproximadamente a una distancia de entre 0.5-1 mm anterior a Bregma (es decir, a 0.5 mm del sitio de la lesión estereotáxica) y fueron teñidos con la técnica convencional de hematoxilina-eosina para observar alteraciones morfológicas en las células estriatales.

Para el análisis morfológico se utilizaron tres cortes de cada estriado, de cada rata, de cada grupo ($n = 4$). Se contabilizó el número total de neuronas morfológicamente normales y el número total de neuronas degeneradas por campo (40X). Se eligieron como neuronas sanas aquéllas cuyo núcleo, nucléolo y citoplasma permanecieron íntegros y bien definidos; se tomaron como células dañadas aquéllas cuyo núcleo y nucléolo no eran visualmente distinguibles o presentaban picnosis, cariólisis o cariorrexis, además de presentar un citoplasma destruido o vacuolizado.

Análisis estadístico

Todos los resultados fueron expresados como valores promedio \pm una desviación estándar (DE). Las diferencias estadísticas entre los grupos fueron analizados por ANOVA de una vía, seguido de la prueba de Tukey para comparaciones múltiples (GraphPad Prism 5.0). Los niveles de significancia considerados fueron de $p \leq 0.05$ para todas las pruebas.

Resultados

Peroxidación lipídica

En los sinaptosomas estriatales del grupo control ($n = 4$) se demostró una PL basal promedio de 220 nmol MDA/mg proteína; la administración intraestriatal de ácido quinolínico (QUIN) y la administración sistémica de ácido 3-nitropropionico (3-NP) no produjo incremento significativo en los niveles de PL; sin embargo, la coadministración de QUIN y 3-NP incrementó significativamente los niveles de

PL respecto del control y respecto de los grupos con administración subtóxica (ANOVA de una vía seguida de Tukey, $p < 0.05$) (Figura 1).

Funcionalidad mitocondrial

La capacidad reductora del MTT a formazán estimada a través de la densidad óptica (leída a una longitud de onda de 550 nm) y observada en los sinaptosomas estriatales del grupo control, se tomó como referencia (densidad óptica promedio (DO) = 127.1 [\pm DE = 86], considerando esta capacidad de reducción como el 100% de FM para fines comparativos. En el grupo de coadministración se observó una disminución significativa de la FM respecto del control (DO = 80.4 \pm DE = 7.9, equivalente a 63%) (ANOVA $p < 0.05$). En el grupo 3NP subtóxico se observó un incremento en el porcentaje de FM (DO = 243.4 \pm DE = 88, equivalente a 191%); sin embargo, ésta no llegó a ser estadísticamente significativa. El grupo de QUIN subtóxico no mostró cambios respecto del control (DO = 125.4 \pm DE = 65, equivalente a 95%) (Figura 2).

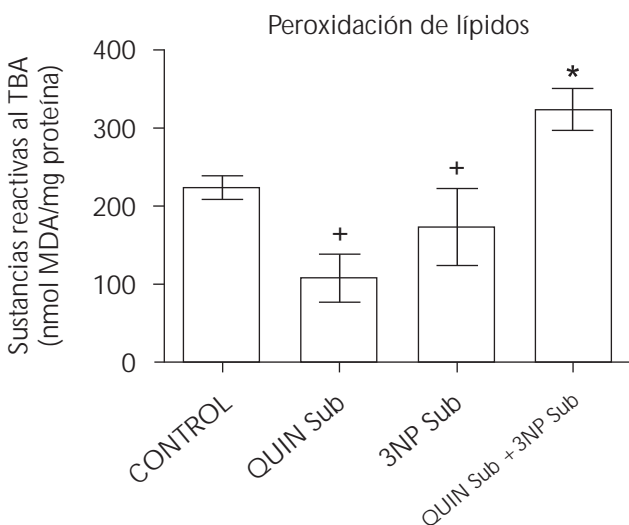


Figura 1. La gráfica muestra los resultados de la PL estimada a través de la cuantificación de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en sinaptosomas estriatales totales de todos los grupos. Las barras representan los valores promedio \pm EEM de grupos de $n = 4$ ratas por grupo; $p < 0.05$, ANOVA de una vía seguida de prueba de Tukey; * $p < 0.05$ diferencia respecto al grupo control; + $p < 0.05$ diferencia respecto al grupo de QUIN + 3NP subtóxicos.

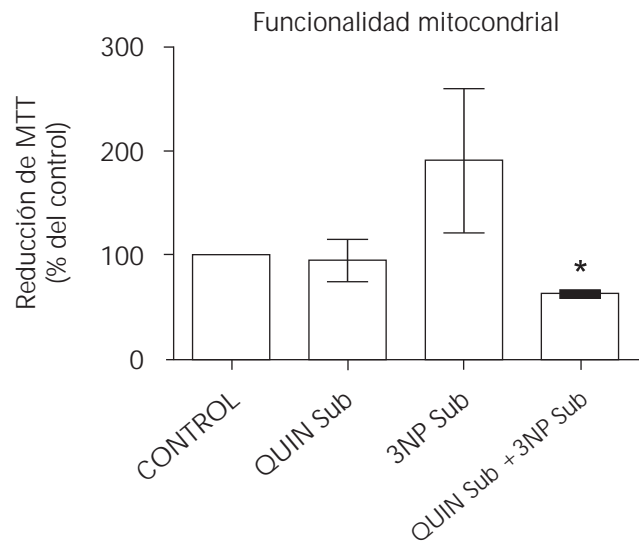


Figura 2. La gráfica muestra los resultados de función mitocondrial estimada a través de la cuantificación de la capacidad de reducción del MTT en sinaptosomas estriatales, expresadas como porcentaje respecto del control (100%) en todos los grupos. Las barras representan valores promedio \pm DE de grupos de $n = 3$ ratas por grupo; $p < 0.05$, ANOVA de una vía seguida de prueba de Tukey; * $p < 0.05$ diferencia respecto al grupo control.

Morfología estriatal

La figura 3 muestra los datos de la cuantificación de neuronas estriatales dañadas por campo en cortes coronales de todos los grupos ($n = 4$). En el grupo de coadministración subtóxica se observó un incremento significativo en el número de neuronas dañadas respecto del control y respecto de los grupos subtóxicos por separado (ANOVA $p < 0.05$). Aunque se observó un incremento en el número de neuronas dañadas en los grupos subtóxicos, estos incrementos no llegaron a ser significativos respecto del control (Figuras 3 y 4).

Niveles estriatales totales de GABA

En la figura 5 se presentan los niveles estriatales totales de GABA en todos los grupos; en el grupo de coadministración subtóxica se observa una reducción de los niveles de GABA; sin embargo, esta reducción no llegó a ser estadísticamente significativa.

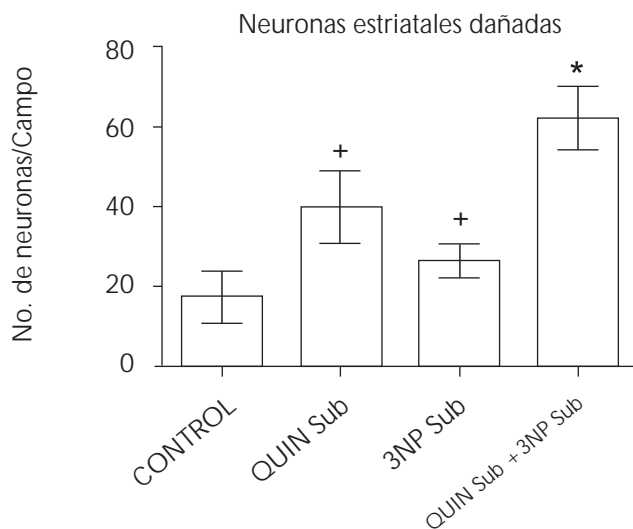


Figura 3. La gráfica representa la cuantificación de neuronas estriatales morfológicamente dañadas por campo (40X) cuantificadas, utilizando cortes coronales teñidos con H y E en todos los grupos. Las barras representan los valores promedio + EEM de grupos de n = 4 ratas por grupo; $p < 0.05$, ANOVA de una vía seguido de prueba de Tukey; * $p < 0.05$ diferencia respecto al grupo control; + $p < 0.05$ diferencia respecto al grupo de QUIN + 3NP subtóxicos.

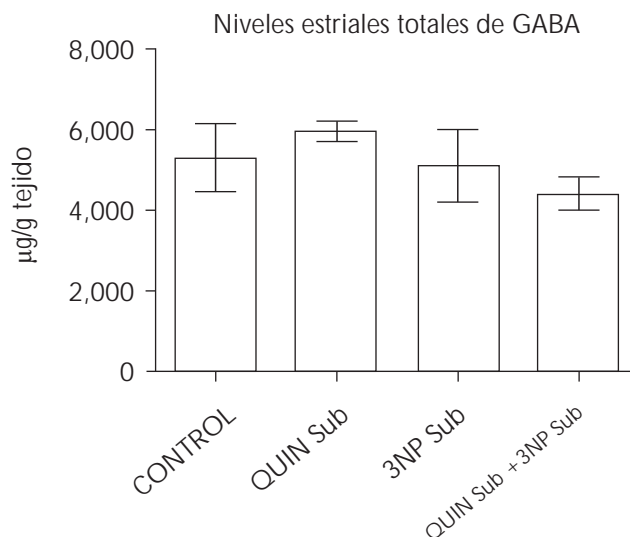


Figura 5. La gráfica muestra la cuantificación de los niveles estriales totales de GABA determinados a través de HPCL y expresados en mg/g de tejido en todos los grupos. Las barras representan los valores promedio ± EEM de grupos de n = 4 ratas por grupo; $p < 0.05$, ANOVA de una vía seguido de prueba de Tukey.

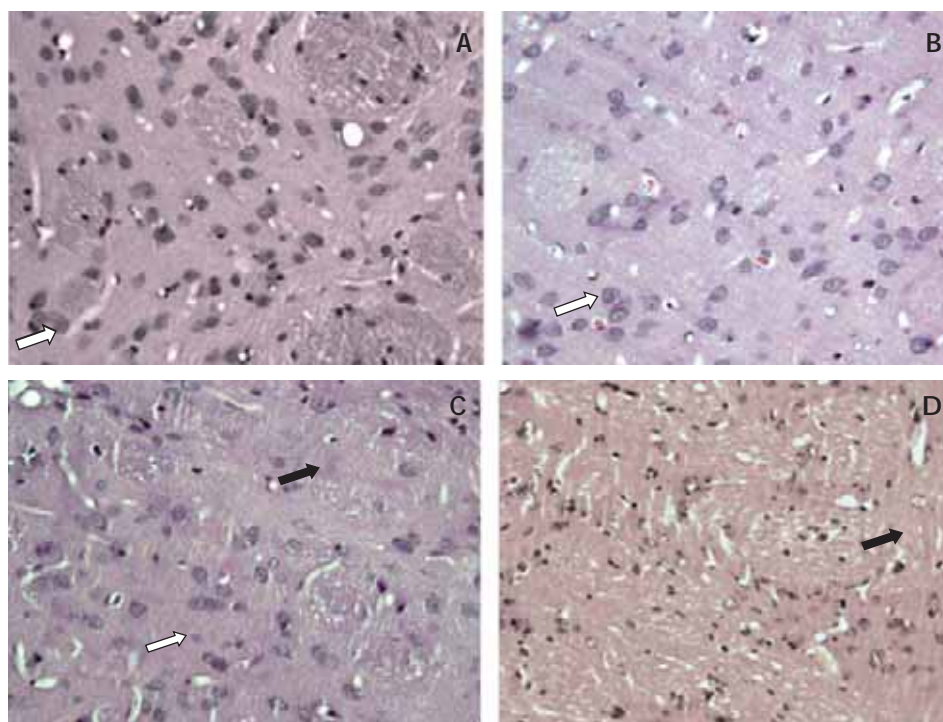


Figura 4. Microfotografías de campo claro representativas de cortes coronales estriatales (40X) teñidos con H y E de todos los grupos. **A:** control, **B:** 3NP subtóxico, **C:** QUIN subtóxico, **D:** 3NP y QUIN subtóxicos. Las flechas blancas señalan neuronas morfológicamente normales y las flechas negras señalan neuronas dañadas.

Imagen en color en:
www.medigraphic.com/rid

Discusión

El ácido quinolínico (QUIN) y el ácido 3-nitropropiónico (3-NP) son dos toxinas ampliamente utilizadas para generar modelos fenotípicos de enfermedades neurodegenerativas del sistema extrapiramidal como la enfermedad de Huntington,⁸ pero además son muy utilizadas para reproducir y estudiar procesos de excitotoxicidad y déficit energético en condiciones *in vitro*.^{11,20} En estudios previos se ha demostrado que la coadministración subtóxica de toxinas que generan alteraciones del metabolismo energético celular como el malonato (un inhibidor mitocondrial irreversible), incrementa las lesiones cerebrales producidas por moléculas excitatorias como el glutamato, el NMDA y el ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico (AMPA), sugiriendo que alteraciones marginales del metabolismo energético celular, pueden incrementar significativamente la vulnerabilidad al daño excitotóxico.²¹ Por otra parte, en el estudio previo llevado a cabo por Jacquard y colaboradores (2006), se demostró que existe toxicidad estriatal sinérgica aguda de la administración de dosis subtóxicas de 3-NP y QUIN; sin embargo, en ese estudio no se exploraron los efectos estriatales de esta administración a largo plazo.¹²

En el presente trabajo se estudiaron los efectos de la coadministración subtóxica de 3NP y QUIN a largo plazo. Los resultados del presente estudio muestran que la coadministración subtóxica de QUIN y 3NP incrementa significativamente los niveles de PL respecto del grupo control. Dichos resultados apoyan un efecto de facilitación tóxica, además de que ponen de relieve que la producción de ERO tiene un papel importante en este mecanismo de toxicidad, lo cual está de acuerdo con estudios previos realizados con dichas toxinas.^{13,14,22} Es importante destacar que nuestros resultados sugieren que este efecto facilitador tóxico sobre la PL sigue presente de forma significativa, aun 30 días después de la coadministración de las toxinas, lo cual puede deberse a varios factores: 1) existe una persistencia en la producción de EROs, es decir, que las toxinas producen una alteración de los mecanismos redox a largo plazo; 2) también puede deberse a que los marcadores de PL son muy sensibles a la producción de EROs, debido a que las reacciones de PL tienen un comportamiento de propagación por la formación de radicales peroxilipídicos que pueden continuar oxidando otros lípidos en ausencia de ROS.²³

Por otro lado, en el análisis de la reducción del MTT, que es considerado como un indicador del grado de funcionalidad mitocondrial que se relaciona con la viabilidad celular,¹⁴ mostró una disminución estadística

significativa de la función mitocondrial a largo plazo con la coadministración subtóxica respecto del control. Dichos resultados sugieren que la potenciación del daño provocado por ambas toxinas (evidenciado por el incremento en la PL), es de suficiente magnitud para afectar de forma significativa la funcionalidad mitocondrial a largo plazo; sin embargo, debido a que las determinaciones de FM se realizaron después de 30 días de la administración de las toxinas, este efecto resulta menos específico que los observados de forma aguda.^{14,22} Es interesante señalar que también se observó que en el grupo de administración subtóxica de 3-NP, la FM presentó una tendencia a incrementar a los 30 días, lo cual puede deberse a cierto efecto de acondicionamiento, es decir, que las alteraciones leves del metabolismo energético que induce el 3NP subtóxico pueden favorecer, como un mecanismo compensatorio, que se incremente la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales, lo cual se traduce en un incremento de la funcionalidad mitocondrial; dicho efecto de acondicionamiento o incremento de la resistencia a otros estímulos tóxicos ha sido descrito previamente con el 3NP, la isquemia, la hipoglucemia y el óxido nítrico.²⁴

Al cuantificar el número de células dañadas, observamos que el grupo de coadministración subtóxica de QUIN + 3NP muestra un incremento significativo del número de células dañadas en comparación con el control y con los grupos de administración subtóxica aislada. Dicho efecto parece sugerir efectivamente un proceso de facilitación tóxica con la administración de ambas toxinas, aunque nuevamente debemos recordar que las evaluaciones morfológicas se realizaron 30 días después de la administración de las toxinas. En los grupos subtóxicos existió un incremento en el número de neuronas dañadas, pero estas tendencias no fueron estadísticamente diferentes al control. Las alteraciones morfológicas observadas estuvieron representadas principalmente por picnosis, cariorexis y alteraciones en la tinción del citoplasma neuronal, lo cual coincide con lo reportado previamente.²⁰ Existe cierta divergencia entre la magnitud de las alteraciones observadas en la funcionalidad mitocondrial y el gran aumento de las neuronas morfológicamente dañadas en los grupos de coadministración, pero esto puede deberse a que las determinaciones de la función mitocondrial se realizaron en sinaptosomas de estriado total, de manera que las fracciones sinaptosomales viables obtenidas pueden provenir de neuronas que no hayan sido afectadas por las toxinas, ya que se ha demostrado previamente que dichas toxinas muestran una toxicidad neuronal selectiva.²⁵

Finalmente, la medición de los niveles totales de GABA estriatal demostró valores más o menos similares en todos los grupos, el grupo coadministrado con QUIN y 3NP subtóxico presentó una tendencia a reducir los niveles de GABA; sin embargo, no hay diferencia significativa comparada con el grupo control. En el estudio llevado a cabo por Silva Adaya y colaboradores, se observó que la toxicidad estriatal aguda de QUIN se acompaña de una reducción inicial de los niveles de GABA, seguida de un incremento posterior del mismo como un mecanismo de compensación, lo cual puede explicar por qué los niveles de GABA a largo plazo no muestran cambios en el presente estudio.²²

Los presentes resultados cobran especial relevancia debido a que la combinación de circunstancias patológicas como las generadas por estas toxinas, déficit energético y excitotoxicidad de intensidad leve, pueden presentarse comúnmente, incluso en condiciones fisiológicas como el envejecimiento.²⁶ Mas aún, cuando una de las toxinas aquí empleadas tiene un origen endógeno QUIN y previamente se ha documentado que puede encontrarse elevada en diversos estados patológicos.^{27,28} Por lo tanto, este fenómeno de facilitación tóxica a largo plazo puede potencialmente contribuir al origen del daño neuronal observado en distintas enfermedades neurológicas del sistema extrapiramidal.

Conclusión

El presente trabajo confirma que la administración de dos toxinas, una que altera el metabolismo energético celular y otra que produce sobreactivación de receptores NMDA, en dosis descritas previamente como subtóxicas, muestran un comportamiento de facilitación tóxica a largo plazo (30 días) evidenciado por el incremento en los niveles de PL, la disminución de la FM en sinaptosomas estriatales y las alteraciones morfológicas a este nivel. Sin embargo, dichas alteraciones a largo plazo parecen no afectar significativamente los niveles estriatales de GABA. Dicho proceso de facilitación tóxica a largo plazo puede tener implicaciones en los mecanismos fisiopatológicos de distintas enfermedades neurológicas.

Bibliografía

1. Rego AC, Oliveira CR. Mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species in excitotoxicity and apoptosis: implications for the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Neurochem Res* 2003; 28: 1563-1574.
2. Hardingham GE, Bading H. Synaptic *versus* extrasynaptic NMDA receptor mitochondrial implications for neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurosci* 2010; 11: 682-696.
3. Sheng ZH, Cai Q. Mitochondrial transport in neurons: impact on synaptic homeostasis and neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 2012; 13: 77-93.
4. Magistretti PJ, Pellerin L. Cellular mechanism of brain energy metabolism and their relevance to functional brain imaging. *Philos Trans R Soc Lond B* 1999; 354: 1155-1163.
5. Schwarcz R, Bruno JP, Muchowski PJ, Wu HQ. Kynurenic acid in the mammalian brain: when physiology meets pathology. *Nat Rev Neurosci* 2012; 13: 465-477.
6. Potter MC. Reduction of endogenous kynurenic acid formation enhances extracellular glutamate, hippocampal plasticity, and cognitive behavior. *Neuropsychopharmacology* 2010; 35: 1734-1742.
7. Pérez-De la Cruz V, Carrillo-Mora P, Santamaría A. Quinolinic acid, an endogenous molecule combining excitotoxicity, oxidative stress and other toxic mechanisms. *Int J Tryptophan Res* 2012; 5: 1-8.
8. Pérez-De la Cruz V, Carrillo-Mora P, Santamaría A. Huntington's disease and mitochondrial alterations: emphasis on experimental models. *J Bioenerg Biomembr* 2010; 42: 207-215.
9. Santamaría A, Jiménez ME. Oxidative/nitrosative stress, a common factor in different neurotoxic paradigms: an overview. *Curr Top Neurochem* 2005; 4: 1-6.
10. Heyes MP, Saito K, Crowley JS, Davis LE, Demitrack MA, Der M et al. Quinolinic acid and kynurenine pathway metabolism in inflammatory and non-inflammatory neurological disease. *Brain* 1992; 115: 1249-73.
11. Túnez I, Tasset I, Pérez-De La Cruz V, Santamaría A. 3-nitropropionic acid as a tool to study the mechanisms involved in Huntington's disease: past, present and future. *Molecules* 2010; 15: 878-916.
12. Jacquard C, Trioulier Y, Cosker F, Escartin C, Bizat N, Hantraye P et al. Brain mitochondrial defects amplify intracellular [Ca²⁺] rise and neurodegeneration but not Ca²⁺ entry during NMDA receptor activation. *FASEB J* 2006; 20: 1021-1023.
13. Pérez-De la Cruz V, Elinos-Calderón D, Carrillo-Mora P, Silva-Adaya D, Konigsberg M, Morán J et al. Time-course correlation of early toxic events in three models of striatal damage: modulation by proteases inhibition. *Neurochem Int* 2010; 56: 834-842.
14. Elinos-Calderón D, Robledo-Arratia Y, Pérez-De La Cruz V, Maldonado PD, Galván-Arzate S, Pedraza-Chaverri J et al. Antioxidant strategy to rescue synaptosomes from oxidative damage and energy failure in neurotoxic models in rats: protective role of S-allylcysteine. *J Neural Transm* 2010; 117: 35-44.
15. National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, 8th ed. Washington, DC, USA: National Academic Press; 2011.

16. Paxinos G, Watson G. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. USA: Academic Press; 2008.
17. Pérez-De la Cruz V, Konigsberg M, Pedraza-Chaverri J, Herrera-Mundo N, Díaz-Muñoz M, Morán J et al. Cytoplasmic calcium mediates oxidative damage in an excitotoxic/energetic deficit synergic model in rats. *Eur J Neurochem* 2008; 27:1075-1085.
18. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
19. Tobón-Velasco JC, Silva-Adaya D, Carmona-Aparicio L, García E, Galván-Arzate S, Santamaría A. Early toxic effect of 6-hydroxydopamine on extracellular concentrations of neurotransmitters in the rat striatum: an in vivo microdialysis study. *Neurotoxicology* 2010; 31: 715-723.
20. Colle D, Hartwig JM, Soares FA, Farina M. Probucol modulates oxidative stress and excitotoxicity in Huntington's disease models in vitro. *Brain Res Bull* 2012; 87: 397-405.
21. Cook DR, Gleichman AJ, Cross SA, Doshi S, Ho W, Jordan-Sciutto KL et al. NMDA receptor modulation by the neuropeptide apelin: implications for excitotoxic injury. *J Neurochem* 2011; 118: 1113-1123.
22. Silva-Adaya D, Pérez-De la Cruz V, Herrera-Mundo MN, Mendoza-Macedo K, Villeda-Hernández J, Binienda Z et al. Excitotoxic damage, disrupted energy metabolism, and oxidative stress in the rat brain: antioxidant and neuroprotective effects of L-carnitine. *J Neurochem* 2008; 105: 677-689.
23. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995; 41: 1819-1828.
24. Weih M, Bergk A, Isaev NK, Ruscher K, Megow D, Riepe M et al. Induction of ischemic tolerance in rat cortical neurons by 3-nitropropionic acid: chemical preconditioning. *Neurosci Lett* 1999; 272: 207-210.
25. Orlando LR, Alsdorf SA, Penney JB Jr, Young AB. The role of group I and group II metabotropic glutamate receptors in modulation of striatal NMDA and quinolinic acid toxicity. *Exp Neurol* 2001; 167: 196-204.
26. Navarro A, Boveris A. The mitochondrial energy transduction system and the aging process. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 292: C670-686.
27. Dong XX, Wang Y, Quin ZH. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol Sin* 2009; 30: 379-387.
28. Sas K, Robotka H, Toldi J, Vécsei L. Mitochondria, metabolic disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders. *J Neurol Sci* 2007; 257: 221-239.