



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**CAMBIO EN LA EXPRESIÓN DE LA ENZIMA KINURENINA
AMINOTRANSFERASA II POR LA ADMINISTRACIÓN DE PROBENECID EN UN
MODELO DE LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON**

T E S I S

QUE COMO UNO DE LOS REQUISITOS
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS QUIMICOBIOLOGICAS
PRESENTA:

BIOL. CONCEPCIÓN RAQUEL SALVATIERRA SÁNCHEZ

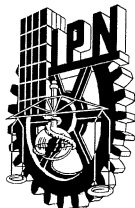
Directores de tesis:

Dr. Jorge Pacheco Rosado

Dra. Francisca Pérez Severiano



Diciembre de 2011



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14-BIS

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México D. F., siendo las 17:00 horas del día 5 del mes de diciembre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas para examinar la tesis titulada:

Cambio en la expresión de la enzima kinurenina aminotransferasa II por la administración de probenecid en un modelo de la enfermedad de Huntington

Presentada por el alumno:

Salvatierra

Apellido paterno

Sánchez

Apellido materno

Concepción Raquel

Nombre(s)

Con registro:

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| B | 0 | 9 | 1 | 0 | 3 | 4 |
|---|---|---|---|---|---|---|

aspirante de:

Maestría en Ciencias Quimicobiológicas

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA DEFENSA DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dr. Jorge Pacheco Rosado

Dra. Francisca Pérez Severiano

Dra. Lucía Quevedo Corona

Dr. Abraham Miranda Páez

Dra. Claudia Alva Sánchez

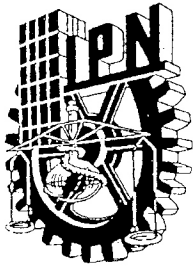
Dr. Sergio Roberto Zamudio Hernández

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Manuel Jesús Piñón López



Escuela Nacional de Ciencias Biológicas
Sección de Estudios de Posgrado



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D.F., el día 25 del mes octubre del año 2011, el (la) que suscribe alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencias Quimicobiológicas con número de registro B091034, adscrito a la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Jorge Pacheco Rosado y la Dra. Francisca Pérez Severiano, y ceden los derechos del trabajo intitulado “Cambio en la expresión de la enzima kinurenina aminotransferasa II por la administración de probenecid en un modelo de la enfermedad de Huntington”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección fseverian@yahoo.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Dr. Jorge Pacheco Rosado
Director de tesis

Dra. Francisca Pérez Severiano
Directora de tesis

Biol. Concepción Raquel Salvatierra Sánchez

Contenido

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| ABREVIATURAS | I |
| LISTA DE FIGURAS | II |
| RESUMEN | III |
| ABSTRACT | IV |
| 1 INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2 ANTECEDENTES | 2 |
| 2.1 ENFERMEDAD DE HUNTINGTON..... | 2 |
| 2.2 HIPÓTESIS PARA LA EH..... | 5 |
| 2.2.1 VÍA DE LAS KINURENINAS..... | 5 |
| 2.2.2 ENZIMAS DE LA VK..... | 6 |
| 2.2.3 METABOLITOS PRICIPALES DE LA VK..... | 8 |
| 2.3 PARTICIPACIÓN DE LA VK EN LA EH Y OTRAS ENFERMEDADES NEUROLOGICAS: BUSQUEDA DE TERAPIAS EN LA EH..... | 10 |
| 2.3.1 AUMENTO DE LOS NIVELES DE KYNA COMO ESTRATEGIA TERAPEUTICA EN LA EH: USO DE PROBENECID..... | 11 |
| 2.4 PROBENECID..... | 13 |
| 3 JUSTIFICACIÓN | 15 |
| 4 HIPÓTESIS | 16 |
| 5 OBJETIVOS | 17 |
| 6 MATERIALES Y MÉTODOS | 18 |
| 6.1 MATERIAL BIOLÓGICO..... | 18 |
| 6.2 LESIÓN DEL ESTRIADO CON QUIN..... | 19 |
| 6.3 VALORACIÓN DE LA COORDINACIÓN MOTORA..... | 19 |
| 6.4 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DEL KYNA Y LA KYN POR HPLC..... | 20 |
| 6.5 DISECCIÓN DEL TEJIDO ESTRIATAL..... | 21 |
| 6.6 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS..... | 21 |
| 6.7 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL..... | 22 |
| 6.8 DETERMINACIÓN DE KAT II POR ELECTROFORESIS EN FASE SÓLIDA..... | 24 |
| 7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 25 |
| 8 RESULTADOS | 26 |
| 8.1 EVALUACIÓN DE LA COORDINACIÓN SENSOMOTORA..... | 26 |
| 8.2 EXPRESIÓN DEL RNAM DE KAT II DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE PROBENECID..... | 26 |
| 8.3 EXPRESIÓN DEL RNAM DE KAT II EN RATAS ADMINISTRADAS CON KINURENINA, PROBENECID Y LA COMBINACIÓN DE AMBOS EN RATAS LESIONADAS CON QUIN..... | 27 |
| 8.4 DETECCIÓN DEL NIVEL PROTEICO DE KAT II POR WESTERN BLOT..... | 28 |
| 8.5 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO KINURÉNICO EN EL LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO..... | 30 |
| 8.6 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE KINURENINA EN LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO..... | 30 |
| 9 DISCUSIÓN | 32 |
| 10 CONCLUSIÓN | 37 |
| 11 PERSPECTIVAS | 38 |

| | | |
|----|-------------------|----|
| 12 | BIBLIOGRAFÍA..... | 39 |
|----|-------------------|----|

ABREVIATURAS

| | |
|------------------|-------------------------------------------------------------------|
| 3-HK | 3-hidroxikinurenina |
| BHE | Barrera hematoencefálica |
| CAG | Citocina-adenina-guanina |
| CT | Control |
| DEPC | Dietilpirocarbonato |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| DNAc | Ácido desoxirribonucleico complementario |
| EH | Enfermedad de Huntington |
| GABA | Ácido γ -aminobutírico |
| HPLC | Cromatografía de líquidos de alta resolución |
| htt | Huntingtina |
| IE | Intraestriatalmente |
| KAT | Kinurenina aminotransferasa |
| KYN | L-kinurenina |
| KYNA | Ácido kinurénico |
| LCR | Líquido cefalorraquídeo |
| NAD ⁺ | Nicotín-adenin-dinucleótido |
| NMDA | N-metil-D-aspartato |
| NMDAr | Receptores a NMDA |
| OAT | Transporte de aniones orgánicos |
| PBS | Solución amortiguadora de fosfatos (por sus siglas en inglés) |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| PROB | Probenecid |
| PVDF | Membrana de nitrocelulosa |
| QUIN | Ácido quinolínico |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| RNAm | Ácido ribonucleico mensajero |
| SDS-PAGE | Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico |
| SNC | Sistema nervioso central |
| SSI | Solución salina isotónica |
| VK | Vía de la kinurenina |
| x g | Unidades de gravedad veces |

LISTA DE FIGURAS

| | Página |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Figura 1. Fotografía de un corte coronal del cerebro de un individuo normal (derecha) y de un paciente con la EH (izquierda), que muestra, disminución en la masa cerebral, atrofia del caudado-putamen y dilatación de los ventrículos laterales. | 10 |
| Figura 2. Fotografía que muestra las alteraciones en las neuronas espinosas medianas (izquierda) y las inclusiones intranucleares (derecha), presentes en la EH. | 11 |
| Figura 3. Reacciones y enzimas de la vía de la kinurenina en células de mamíferos, como una vía alterna para la síntesis de NAD ⁺ . | 14 |
| Figura 4. Reacción de transaminación catalizada por la enzima kinurenina aminotransferasa. | 16 |
| Figura 5. Diseño general de trabajo. | 26 |
| Figura 6. Diseño experimental de trabajo para PCR en tiempo real | 32 |
| Figura 7. Evaluación de la actividad motora antes y después de la administración de PROB, KYN y la combinación de ambos. | 34 |
| Figura 8. Expresión de KAT II después de la administración de probenecid. | 35 |
| Figura 9. Expresión relativa de KAT II normalizado con respecto a 18S, en grupos de animales administrados con los tratamientos. | 36 |
| Figura 10. Análisis de la expresión de KAT II y β -actina por electroforesis. | 38 |
| Figura 11. Concentración del metabolito ácido kinurénico en LCR determinado por HPLC. | 39 |
| Figura 12. Concentración del metabolito kinurenina cuantificado en LCR por HPLC. | 40 |

RESUMEN

La enfermedad de Huntington (EH) es hereditaria, de tipo autosómica dominante, causada por una expansión de más de 34 repetidos del triplete CAG en la proteína huntingtina (htt). La EH es neurodegenerativa, afectando principalmente al cuerpo estriado. Se desconoce el mecanismo por el cual la presencia de la proteína htt mutada induce la EH, pero se propone que puede provocar alteraciones en los niveles de los metabolitos de la vía de la kinurenina (VK), que a su vez lleve a una sobreactivación de los receptores a glutamato tipo NMDA (NMDAr). La VK es la ruta metabólica más utilizada para la síntesis de nicotín-adenin-dinucleótido (NAD⁺) a partir del triptófano en mamíferos. En la ruta metabólica de la VK se forman dos compuestos neurotóxicos: el ácido quinolínico (QUIN), agonista endógeno de los NMDAr; y la 3-hidroxicinurenina (3-HK), un generador de radicales libres. Además, en la VK se forma un neuroprotector endógeno, el ácido kinurénico (KYNA) que es un antagonista de los NMDAr. El KYNA es producido de manera irreversible a partir de su precursor kinurenina, por la acción de la enzima kinurenina aminotransferasa tipo II (KAT II) en el cerebro de mamíferos, por lo que la actividad de esta enzima puede ser clave para la deficiencia o la acumulación de los niveles de KYNA. Se ha observado que la administración de probenecid (PROB, 100 mg/kg), kinurenina (KYN, 200 mg/kg) o la combinación de ambas sustancias reducen la muerte neuronal del cuerpo estriado provocado por la administración de QUIN (1 µl, 240 nmoles/µl) lesión que es ampliamente usada como un modelo experimental de la EH. El objetivo de este trabajo fue observar cambios en la presencia de KAT II, así como en la expresión de su RNAm en el cuerpo estriado en ratas bajo el tratamiento de PROB, KYN o ambas, administradas 30 minutos previos a la lesión con QUIN. Además, valorar si dichos tratamientos provocan daño sobre el control motor, así como cambio en los niveles de KYNA y KYN en el líquido cefalorraquídeo (LCR) en animales no lesionados. Los resultados muestran que la administración de los tratamientos KYN, PROB o la combinación de ambas sustancias no ocasionan efectos adversos motores. El tratamiento con PROB y la combinación (K + P) incrementa la expresión de la enzima KAT II a las 2 horas de la lesión. Se observó que los grupos administrados con PROB y la combinación provocan una mayor expresión de KAT II 2 horas y 6 días después de la lesión con QUIN. La administración de PROB produce un aumento en los niveles de KYNA y KYN en LCR. Nuestros resultados demuestran que la administración de PROB incrementa la expresión de la enzima KAT II, responsable de la síntesis de KYNA en el modelo de la EH inducido por QUIN.

ABSTRACT

Huntington disease (HD), a hereditary dominant autosomic sickness, is caused by an overexpression of CAG repeats in the gene encoding the protein huntingtine (Htt). HD is characterized by neurodegeneration in the striatum. Nowadays, it is not known how Htt induces HD, however kynurenine pathway (KP) and NMDA, a glutamate receptor type, have been implicated. KP is the main metabolic route to produce nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) from tryptophan on mammals. KP produces two neurotoxic compounds: 3-hydroxykynurenine (3-HK), a free radicals generator; and quinolinic acid (QUIN), a NMDA agonist. Also, the KP produces kynurenic acid (KYNA), a compound that blocks the glycine site of rNMDA. KYNA synthesis is catalyzed by kynurenine aminotransferase type II (KAT II) enzyme; therefore KAT II levels could be responsible of KYNA brain levels. It has been shown that systemic administration of Probenecid (PROB, 100 mg/kg), kynurenine (KYN, 200 mg/kg) or both to HD experimental models decreases neurological damage after striatal-lesion by QUIN (1µl, 240 nmoles/µl), an experimental model of HD. The aim of this study was to evaluate the expression of striatal KAT II and its mRNA on rats administered with PROB, KYN, or both 30 minutes before striatal-lesion with QUIN. Also, motor coordination, KYNA and KYN cerebrospinal fluid (CSF) levels were tested in rats without striatal-lesion. Results show that the administration of KYN, PROB or their combination does not cause motor adverse effects. The treatment-induced KAT II mRNA expression was higher 2 hr after QUIN-induced damage. Rats treated with PROB and the combination of PROB and KYN showed an increased expression of the enzyme at both periods studied (2 hours and 6 days post QUIN administration). Additionally, PROB administration induces a raise in KYNA- and KYN-LCF levels. Our results show that PROB treatment raises KAT II expression, the enzyme responsible for KYNA synthesis in QUIN-induced HD experimental model.

1 INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Huntington (EH) es un desorden neurodegenerativo, hereditario, causado por una expansión de más de 34 repetidos del triplete de nucleótidos CAG (citocina-adenina-guanina) en el DNA, que codifica para una cadena de poliglutaminas en la proteína huntingtina (htt). Los pacientes con EH presentan movimientos involuntarios de las extremidades, muecas y movimientos de cabeza, además de síntomas psiquiátricos como depresión y demencia. En cerebros *postmortem* de pacientes que cursaron con la EH, se observó la muerte de alrededor del 85% de neuronas espinosas medianas localizadas en el caudado putamen, lo que conlleva a la disminución de los niveles de GABA, sustancia P y encefalinas en dicha región. Actualmente se desconoce el mecanismo que provoca tal daño en la EH, sin embargo existe la hipótesis kinurinérgica, la cual sustenta con evidencias tanto clínicas como en modelos experimentales que la ruta metabólica del triptófano se encuentra alterada, dado que en pacientes con EH, las concentraciones de los metabolitos de dicha ruta se encuentran alterados en orina, plasma y líquido cefalorraquídeo. La vía de las kinureninas (VK) es la ruta metabólica que utilizan casi todos los mamíferos para la síntesis de nicotín-adenin-dinucleótido (NAD⁺) a partir del triptófano. En la VK se forman tres moléculas neuroactivas a partir de la kinurenina (L-KYN): la 3-hidroxicinurenina (3-HK), que tiene la capacidad de generar radicales libres, los cuales provocan muerte neuronal; el ácido quinolínico (QUIN), que es agonista de los receptores glutamatérgicos tipo NMDA; y el ácido kinurénico (KYNA), que es producido de manera irreversible por la acción de la enzima KAT II y es antagonista del receptor tipo NMDA. También está reportado que en cerebros *postmortem* de pacientes con EH los niveles de KYNA están disminuidos. Recientemente fue demostrado que la administración de L-KYN junto con probenecid (fármaco que inhibe el transporte de KYNA desde el cerebro) disminuye el daño neurológico, el daño oxidativo y preserva del tejido estriatal. Sin embargo, se desconoce si dicho tratamiento modifica la síntesis de KYNA.

2 ANTECEDENTES

2.1 ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

La enfermedad de Huntington (EH) es una enfermedad hereditaria de tipo autosómica dominante, causada por una expansión anormal del triplete de nucleótidos CAG (citocina-adenina-guanina). El rango normal de repetidos de CAG es de 11 a 34 en individuos sanos, mientras que un número mayor a 35 indica una alta probabilidad de desarrollar EH. Con el paso de las generaciones el número de repetidos CAG es mayor, se observa una correlación inversa entre el número de repetidos de la cadena y la edad en la que se manifiesta la EH, fenómeno conocido como anticipación génica (Beal, 1986; Krobitch y Kazantsev, 2011). El gen responsable de la enfermedad se localiza en el brazo corto del cromosoma 4 (4p16.3), fue caracterizado en 1993 y denominado IT15 (Giordana, 1995; Lowe y cols., 1997). Tiene una amplia expresión, no sólo en el sistema nervioso (neuronas y glía), sino también en gran variedad de tejidos (Strong y cols., 1993). El gen de la EH codifica para una proteína denominada huntingtina (htt), vital en la embriogénesis, pero de la que no se conoce una función específica (Robitaille y cols., 1997; Sieradzan y Mann, 2001).

La EH es un proceso neurodegenerativo y progresivo que se caracteriza por degeneración severa de los ganglios basales (Sanberg y Coyle, 1984), y en consecuencia se manifiesta con movimientos coreiformes constantes e incontrolables (DiFiglia, 1990), déficit cognitivo y trastornos emocionales de progresión muy lenta, durante un periodo de 15 a 20 años. La enfermedad se presenta en dos formas: la juvenil y la adulta, de acuerdo a la edad en la que se inicia. La forma juvenil generalmente presenta disturbios mentales y rigidez más que movimientos coreicos, y la forma adulta se presenta entre la tercera y cuarta década de vida y se caracteriza por la presencia de corea la cual se caracteriza por movimientos involuntarios que predominan en las extremidades, se presentan en forma continua tanto en reposo como en acción dichos movimientos pueden ser focales como masticación repetitiva, movimiento oscilatorio de la mandíbula o

gesticulación facial. Fisiológicamente la EH está relacionada con un predominio de la actividad dopaminérgica, a nivel de los ganglios de la base. Se presentan cambios psiquiátricos como irritabilidad, ansiedad, depresión y deterioro intelectual.

Desde el punto de vista neuropatológico, la EH se caracteriza básicamente por dos hechos:

- a) Pérdida de neuronas y gliosis que afecta fundamentalmente al estriado (muerte selectiva de neuronas espinosas medianas que produce atrofia del caudado-putamen) y, en menor medida a la corteza cerebral (pérdida de células piramidales de proyección) (figura 1).
- b) Agregación de htt mutada en forma de cuerpos de inclusión intranucleares y de neuritas distróficas en las neuronas de las áreas afectadas (figura 2).

Los daños histopatológicos observados en la EH, son variables y dependen del grado de severidad y de evolución de la enfermedad. Los cambios más prominentes, los encontrados en el estriado que incluye al putamen, sirven de base para la clasificación de la enfermedad en cinco estadios anatomopatológicos, de 0 (no evidencia de lesión histológica) a 4 (máxima severidad, con núcleo caudado atrófico y cóncavo y atrofia de putamen y estriado cápsula interna) (Figura 1) (Vonsattel y cols., 1985). Las lesiones histológicas, sin embargo, no se limitan al estriado. Existe una leve atrofia cerebral global, con disminución del peso medio del cerebro de unos 150 a 200 g con respecto a la media de controles sanos (Vonsattel y DiFiglia, 1998). El gradiente de lesión de mayor a menor severidad es el siguiente: estriado>corteza frontal>cerebelo>tallo cerebral. Existe un gradiente regional en el núcleo caudado de atrofia cola>cuerpo>cabeza, y una gran selectividad celular caracterizada por mayor atrofia de neuronas espinosas medianas con mayor severidad en células ricas en encefalinas que proyectan al globo pálido externo, que de las que producen sustancia P y proyectan al globo pálido interno y con preservación de interneuronas grandes no espinosas.

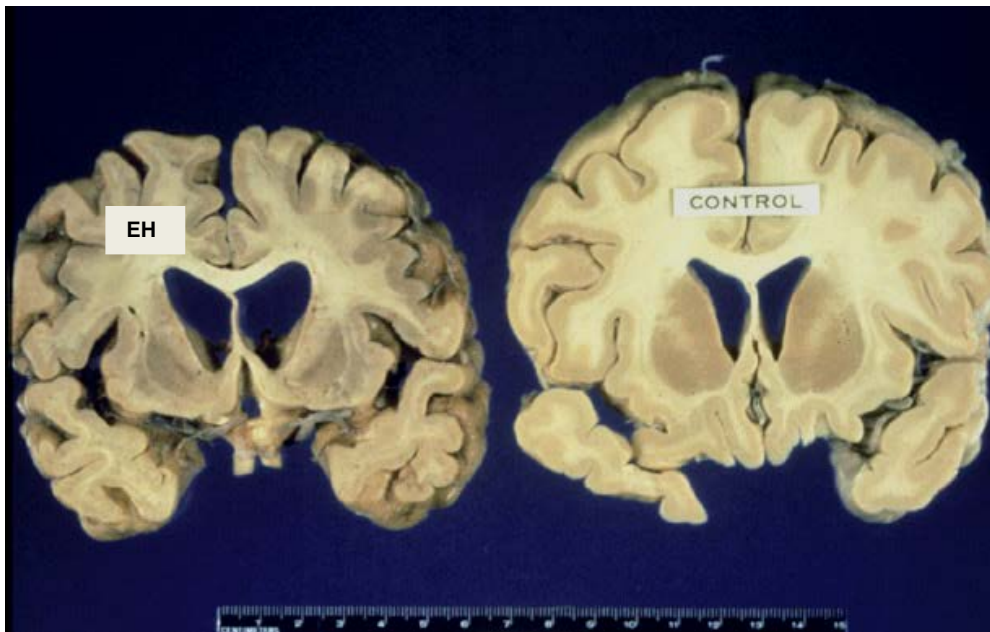


Figura 1. Fotografía de un corte coronal del cerebro de un individuo normal (derecha) y de un paciente con la EH (izquierda), que muestra, disminución en la masa cerebral, atrofia del caudado-putamen y dilatación de los ventrículos laterales (Vonsattel y cols., 1985).

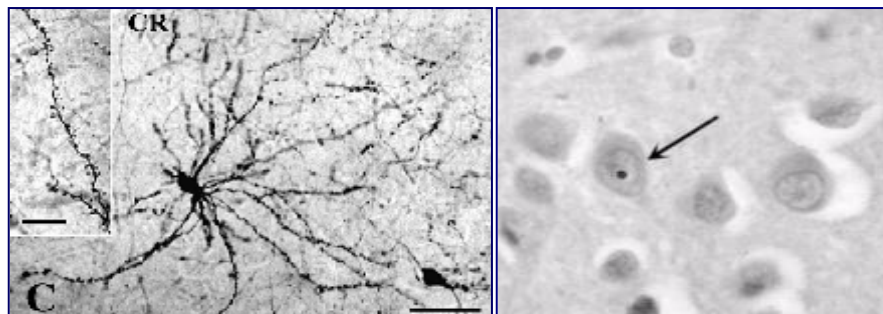


Figura 2. Fotografías que muestran las alteraciones en las neuronas espinosas medianas (izquierda) y las inclusiones intranucleares (derecha), presentes en la EH (Cicchetti y cols.; 2000; Ho y cols. 2001).

2.2 HIPÓTESIS PARA LA EH

Estudios realizados por varios grupos de investigación sobre el mecanismo de daño en la EH proponen varias hipótesis, las cuales no son excluyentes entre sí y pudieran ser complementarias. Se encuentran las siguientes hipótesis:

- 1) Excitotoxicidad en los ganglios basales
- 2) Variaciones en el control transcripcional
- 3) Muerte neuronal por apoptosis o necrosis
- 4) Alteraciones en el metabolismo energético y daño oxidante
- 5) Kinurinérgica, la cual sugiere la existencia de una alteración en el metabolismo del triptófano, por la vía de la kinurenina (VK).

La hipótesis kinurinérgica, se basa en el análisis de los niveles de los metabolitos que se forman a través de esta vía, los cuales se encuentran alterados de manera importante en orina, plasma y líquido cefalorraquídeo de pacientes con la EH. (Schwarcz y cols., 1991; Moroni, 1999).

2.2.1 VÍA DE LAS KINURENINAS

El ácido kinurénico (KYNA) fue reconocido como un metabolito activo del triptófano en orina de perro. En 1947 se reconoció a la vía de las kinureninas (VK) como la ruta principal de conversión del cofactor nicotín-adenin-dinucleótido (NAD^+) a partir del triptófano y la forma fosfatada (NADP). El triptófano es metabolizado en un 99% a través de la VK en casi todos los mamíferos mientras que por una vía alterna se lleva a cabo la transformación del triptófano a serotonina y este último a melatonina, hormona que responde a cambios en la luminosidad ambiental. La VK se lleva a cabo en el hígado donde participa la enzima triptófano-2,3-dioxigenasa (TDO). Sin embargo en el cerebro, la enzima que transforma el triptófano es la indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO). La VK da lugar a tres metabolitos principales, el generador de radicales libres la 3-hidrokinurenina (3-HK); un agonista de los receptores tipo NMDA a glutamato, el ácido quinolínico (QUIN), que causa excitotoxicidad en las neuronas; y al ácido kinurénico (KYNA), antagonista de los NMDAr, con alta afinidad por el sitio de glicina; dichos metabolitos son llamados kinureninas y se ha

comprobado que participan en diferentes procesos neurodegenerativos y patológicos (Stone, 1993; Schwarcz, 2003; Han y cols., 2010).

La cascada metabólica de la VK es importante ya que los tres intermediarios neuroactivos que se forman, derivan directa o indirectamente de L-kinurenina (KYN); el ácido kinurénico (KYNA) se forma en la rama de “defensa” de la VK, mientras que los otros dos metabolitos, 3-HK y QUIN, son sintetizados a partir de KYN en la ruta que genera NAD^+ (figura 3).

2.2.2 ENZIMAS DE LA VK

Entre las enzimas principales de la VK están la indolamina 2,3-dioxigenasa que metaboliza al triptófano a N-formilkinurenina, la cual es degradada posteriormente a KYN por acción de la formidasa. KYN es sustrato para 3 enzimas distintas: la kinureninasa (produce el ácido antranílico), la kinurenina 3-hidroxilasa (produce a la 3-HK) y la kinurenina aminotransferasa (KAT) la cual cataliza la transaminación irreversible de la KYN a KYNA. La 3-HK es metabolizada por la mismas KATs para producir ácido xanturénico o por kinureninasa para formar al ácido 3-hidroxiantranílico. La enzima ácido 3-hidroxiantranílico oxigenasa convierte al ácido 3-hidroxiantranílico a semialdehído-2-amino-3-carboximucónico, el cual por rearrreglos no enzimáticos da lugar al QUIN o sirve como un sustrato de la picolínico carboxilasa, para producir ácido picolínico (Okuno y cols., 1991). En cerebros postmortem de EH, se midió la actividad de la enzima 3-hidroxiantranilato oxigenasa y los niveles se encontraban aumentados (Schwarcz y cols., 1988). Además, experimentos realizados en el modelo de la EH inducido por QUIN sugieren la participación de esta toxina como un activador del gen de la htt (Carlock y cols., 1995; Tatter y cols., 1995;) (figura 3).

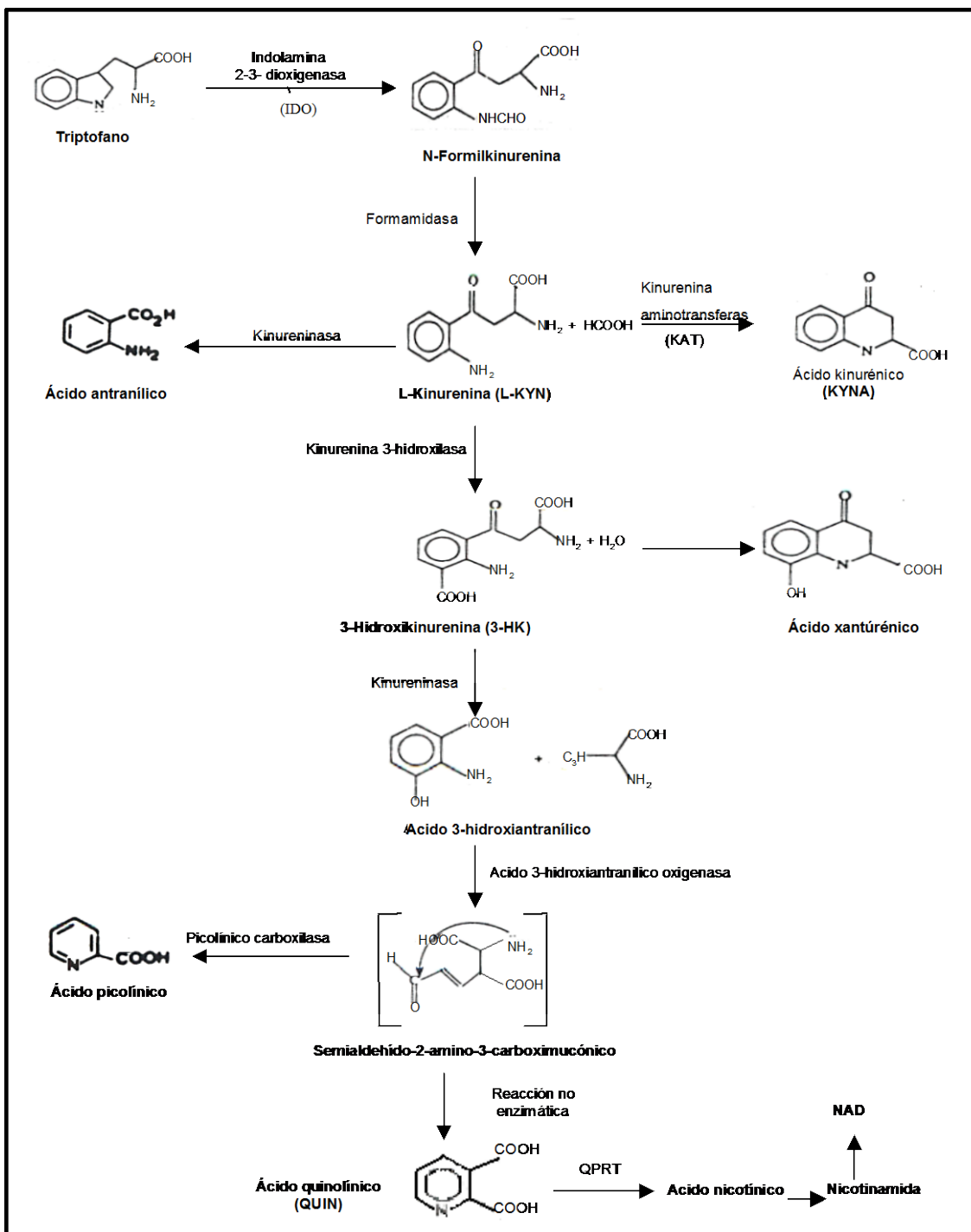


Figura 3. Reacciones y enzimas de la vía de la kinurenina en células de mamíferos, como una vía alterna para la síntesis de NAD⁺. Tomada de Wolf, 1974.

2.2.3 METABOLITOS PRICIPALES DE LA VK

2.2.3.1 KYNA

KYNA es un antagonista de amplio espectro de los receptores de los aminoácidos excitadores, se encuentra en concentraciones nanomolares en el cerebro de mamíferos. En altas concentraciones KYNA puede inhibir la neurotransmisión glutamatérgica actuando sobre el sitio de unión a glicina del rNMDA y también bloquea de manera no selectiva a los receptores colinérgicos $\alpha 7$ -nicotínicos (nACh), por lo tanto puede participar tanto en la neurotransmisión glutamatérgica como colinérgica. El KYNA puede modular y contrarrestar la sobreexcitación de esos receptores ocasionada por aminoácidos excitadores, evitando así el daño neuronal (Neméth y cols., 2007). Swartz, en 1990, utilizó la técnica de microdiálisis para medir la concentración basal de KYNA en cuerpo estriado de rata, demostrando que éste se encuentra de manera endógena en cerebro. Además se observó que en ratas administradas con su precursor inmediato KYN, incrementó 108 veces los niveles de KYNA en LCF. Sin embargo la administración de L-triptófano fue menos efectiva para incrementar los niveles de KYNA en LCF. El mismo grupo de trabajo administró por microdiálisis un inhibidor de la síntesis de la enzima KAT, el ácido aminooxiacético (AOAA) obteniendo una disminución de KYNA (Swartz y cols., 1990).

KYNA se produce enzimáticamente a través de una transaminación irreversible a partir de KYN. En el cerebro de humano, rata y ratón existen cuatro tipos de enzimas KAT (KAT I, KAT II, KAT III Y KAT IV), las cuales catalizan la transaminación para KYN y forman KYNA. Dicha transaminación involucra dos pasos, el primero es regulado por la enzima KAT, su producto intermediario es muy inestable y en el segundo paso se somete a una ciclización intramolecular rápida para formar KYNA (figura 4) (Han y cols., 2010).

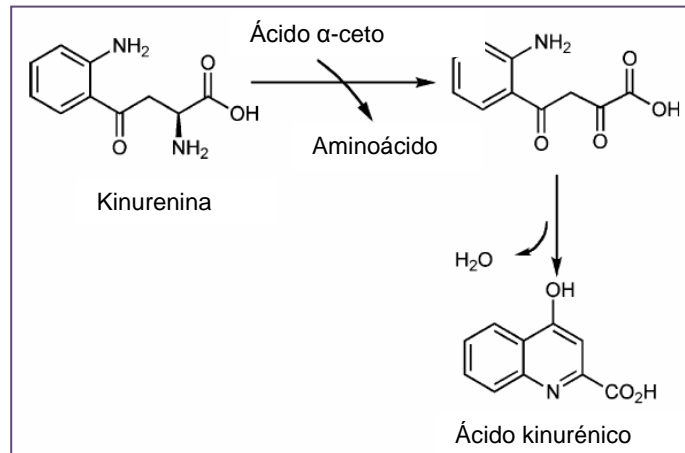


Figura 4. Reacción de transaminación catalizada por la enzima kinurena aminotransferasa. Tomada de Han y cols. 2010.

En corteza cerebral, cuerpo estriado, hipocampo, tálamo, cerebelo y en hígado de rata, se examinó la actividad de la KAT II en diferentes tiempos y se observó que entre los 3 y 24 meses de edad hay un incremento en su actividad. El aumento más notable se presentó en corteza, estriado e hipocampo. La producción de KYNA se incrementó significativamente en rebanadas de corteza cerebral en ratas de 12 meses de edad (pero no a los 24 meses) y en rebanadas de hipocampo de animales de 12 y 24 meses de edad. Aunque fue notable una tendencia al aumento de niveles de KYNA no se observaron cambios significativos con la edad en rebanadas de estriado, tálamo, cerebelo e hígado (Sapko y cols., 2006).

2.2.3.2 QUIN

El QUIN es un aminoácido heterocíclico el cual tiene una acción excitadora sobre el sistema nervioso central de mamíferos, los niveles contenidos en tejido cerebral son bajos (50–1000 nM) y posee una baja afinidad por el NMDAr ($ED_{50} > 100 \mu\text{M}$). Dicho metabolito posee una capacidad muy alta para producir excitotoxicidad, que es causada por una combinación de factores, incluyendo la ausencia de mecanismos efectivos que remuevan el exceso de QUIN extracelular (Wolfensberger y cols., 1983). La hipótesis de excitotoxicidad está apoyada en las consecuencias

observadas de inyectar QUIN directamente en el cerebro de mamíferos ya que puede activar de manera selectiva a los receptores de glutamato sensibles a N-metil-D-aspartato (NMDA) causando daño neuronal y características neuroquímicas y neuropatológicas similares a la EH como por ejemplo disminución marcada del neurotransmisor inhibitor GABA y de otras sustancias neuroactivas (Stone y Perkins, 1981; Schwarcz y cols., 1983; Stone y cols., 1987). Por lo que QUIN es una neurotoxina que se continúa administrando para generar un modelo agudo de la EH en roedores (Aguilera y cols., 2007).

2.2.3.3 3-HK

La 3-HK es un precursor biológico del QUIN que también tiene propiedades neurodestructivas, puede iniciar una cascada de eventos intracelulares que daña a las células nerviosas debido a la generación de radicales libres (Eastman y Guilarte, 1989; Okuda y cols., 1998). El KYNA es un antagonista del receptor de aminoácidos excitatorios, con una alta afinidad por el sitio de glicina del rNMDA (Perkins y Stone 1982; Kessler y cols., 1989).

2.3 PARTICIPACIÓN DE LA VK EN LA EH Y OTRAS ENFERMEDADES NEUROLOGICAS: BUSQUEDA DE TERAPIAS EN LA EH

Está demostrado que en pacientes con la EH, las alteraciones de los metabolitos de la VK participan de manera importante. En el líquido cefalorraquídeo (LCR) de individuos con la EH se encontró que la concentración del KYNA está disminuida, así como la actividad de la enzima KAT II, lo que se acompaña de un daño selectivo al estriado. El grupo de Schwarcz demostró, que tanto en el tejido cerebral de pacientes con la EH en etapas tempranas, como en tejido estriatal de ratones transgénicos que contienen el DNAc mutado para la htt, la 3-HK está aumentada en comparación con los niveles de KYNA (Guidetti y cols., 2006). Estos descubrimientos sugieren que la relación 3-HK y KYNA puede ser un determinante crítico temprano en la EH, lo que permitió a varios grupos de investigación diseñar fármacos que se dirijan a enzimas blanco de la VK, que sean capaces de reducir la

relación 3-HK/KYNA en el cerebro como una terapia prometedora en etapas iniciales de la enfermedad (Reddy y cols., 1999; Guidetti y cols., 2000).

Los niveles del KYNA se encuentran alterados en múltiples enfermedades tanto neurodegenerativas como neurológicas. En pacientes con EH los niveles de KYNA están disminuidos; sin embargo en la esquizofrenia, Alzheimer e infecciones virales se presenta un aumento. El KYNA puede tener efectos terapéuticos importantes no obstante que su uso como un agente neuroprotector está limitado a causa de su poca capacidad para atravesar la BHE (Schwarcz, 2004; Vamos y cols., 2009).

2.3.1 AUMENTO DE LOS NIVELES DE KYNA COMO ESTRATEGIA TERAPEUTICA EN LA EH: USO DE PROBENECID

Entre las estrategias para aumentar los niveles de KYNA está la administración de probenecid (PROB) (Miller y cols., 1992; Russi y cols., 1992), ya que este fármaco inhibe el flujo de KYNA desde el cerebro vía un acarreador sensible a PROB (Moroni y cols., 1988). Está descrito que este mecanismo de transporte para el KYNA es extremadamente eficiente y funcionalmente importante para la depuración del KYNA desde el espacio extracelular del cerebro. En adición, la administración sistémica de la KYN causa un gran y persistente incremento en los niveles cerebrales de KYNA tanto en ratas (Swartz y cols., 1990) como en monos (Jauch y cols., 1993). Además, es promisorio el uso de los inhibidores de la enzima; kinurenina 3-hidroxilasa, que participan en la conversión de la KYN hacia QUIN, y de la enzima nicotinoilalanina (NAL) (Moroni y cols., 1991; Miranda y cols., 1997), PNU156561A, UPF-648 y Ro 61-8048 (Connick y cols., 1992; Russi y cols., 1992; Chiarugi y cols., 1996, Speciale y cols., 1996; Cozzi y cols., 1999). Según estudios neuroanatómicos, la producción de KYNA en astrocitos está en cercanía a las sinapsis glutamatérgicas, por lo que con la estrategia de incrementar los niveles de KYNA, se aseguraría que altos niveles de éste pueden alcanzar la vecindad inmediata o estar en contacto con el espacio sináptico y desde ahí el KYNA estaría en una posición excelente para bloquear la función de los receptores a NMDA (Roberts y cols., 1995).

En función del bloqueo del NMDAr por el KYNA, existe una serie de compuestos con actividad antagonista, algunos de los cuales llegan fácilmente al cerebro, pero tienen un efecto de corta duración en el sistema nervioso central (SNC). Estos compuestos son derivados de los ácidos orgánicos, con un transporte activo fuera del SNC y de la circulación. El sistema acarreador responsable de este fenómeno es el transportador de ácidos orgánicos localizado en el epitelio de ambos plexos coroideos, riñón y posiblemente en el epitelio de la barrera hematoencefálica (Adkinson y cols., 1994; Deguchi y cols., 1995). Este acarreador transporta, de forma no selectiva xenobióticos con estructura de ácidos orgánicos con pH cercano al fisiológico, desde el LCR al sistema sanguíneo y hasta la orina. Por lo que se propuso probar fármacos con propiedades inhibitoras de este sistema de depuración, como lo es el PROB.

Al observarse una clara relación entre los niveles anormales de KYNA en enfermedades neurodegenerativas y sicóticas, las enzimas que participan en la formación del neuroprotector endógeno, las enzimas KATs, se han vuelto candidatas de estudio (Han y cols., 2010).

2.3.1.1 TRANSPORTADOR DE ANIONES ORGÁNICOS

El sistema de transporte de la barrera hematoencefálica (BHE) y de la barrera del líquido cefaloraquídeo (BCSFB) poseen una función importante, creando un sistema selectivo de permeabilidad hacia el sistema nervioso central (SNC). Este sistema participa en forma trascendental para la determinación de la concentración de fármacos en el SNC. Se ha demostrado que los componentes ácidos son removidos del SNC por el sistema de transporte de aniones orgánicos (OAT) localizado en el epitelio de los plexos coroideos y el endotelio capilar del cerebro (BBB), además de reconocerse diferentes familias de proteínas transportadoras, como por ejemplo la familia de proteínas asociada a la resistencia a multifármacos (MRPs) y el transportador de ácido monocarboxílico. En modelos *in vitro* se observó que la expresión de las proteínas transportadoras en las células endoteliales capilares depende de las diferentes condiciones agregadas al cultivo, por lo que se cree que

el ambiente que rodea a las células endoteliales *in vivo* puede jugar un papel importante en la expresión de las proteínas transportadoras. La BHE posee una función fisiológica dual en términos de homeostasis cerebral, la BHE expulsa los fármacos de la circulación y agentes tóxicos del SNC y por otro lado abastece de nutrientes esenciales, hormonas, fármacos y elimina metabolitos del cerebro (Sun y cols., 2001; Sugiyama y cols., 2003).

2.4 PROBENECID

El PROB, (ácido-p-dipropil-sulfamilbenzóico), es un inhibidor competitivo de los acarreadores de los ácidos orgánicos, el cual fue desarrollado en la década de los 50 para prolongar el efecto de algunos antibióticos por inhibición de la depuración renal, obteniéndose un aumento en el tiempo de duración del efecto de estos fármacos (Hesselink y cols., 1999). Enfocados en este mecanismo el PROB ha sido empleado en la modificación de la farmacocinética de algunos fármacos de corta duración como la 3'-azido-3'-desoxitimidina o AZT (Dystra y cols., 1993; Wang y Sawchuck, 1995), ácido valproico (Golden y cols., 1993; Naora y cols., 1996) y para antibióticos β -lactámicos y quinolonas (Suzuki y cols., 1996). Algunos antagonistas de NMDAr en el SNC, como lo es el KYNA, muestran una acción prolongada por co-administración de PROB (Taylor y Vartanian, 1992; Santamaría y cols., 1996; Danysz y Parson, 1998). El grupo de Moroni en 1988, observó que la administración de KYNA favorece un aumento significativo del KYNA en ratas. Posteriormente, el mismo grupo demostró que la co-administración de KYN con PROB en ratas, produce un aumento en la concentración del KYNA cuatro veces mayor respecto al control (Moroni y cols., 1988). Por otro lado, Santamaría y cols. (1996), basándose en reportes de Miller y cols. (1992), administraron como pretratamiento, la combinación de PROB más KYN a ratas lesionadas con QUIN, y encontraron que dicha combinación muestra un efecto protector, evidenciado como mejoras conductuales y aumento de las concentraciones del GABA. Estos trabajos sugieren que el PROB inhibe el transporte de los ácidos orgánicos derivados de la VK, bloqueando el transportador del KYNA del fluido extracelular al sistema sanguíneo,

resultando en un incremento en los niveles del KYNA en el cerebro (Vecsei y cols., 1991; Santamaría y cols., 1996).

Existe una gran cantidad de evidencias acumuladas desde 1981, acerca de los efectos convulsionantes y excitotóxicos del QUIN, excitotóxicos de la 3-HK y anticonvulsionantes y neuroprotectores de KYNA. Por lo que se sugiere que tanto el QUIN como la 3-HK juegan un papel patológico importante en la muerte neuronal. Se ha demostrado la participación de los compuestos PROB y KYNA en la EH (Beal y cols., 1990; Guidetti y cols., 2000), la demencia que se presenta en el síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (Sardar y cols., 1995; Heyes y cols., 1998), la esquizofrenia (Schwarcz y cols., 2001), la encefalopatía hepática (Moroni y cols., 1986), entre otros desórdenes cerebrales en humanos.

De acuerdo a estudios recientes la administración de los tratamientos PROB, KYN y la combinación de ambos (P + K) en ratas con el modelo de la EH, se obtuvo una reducción del daño neurológico evaluado mediante la presencia de conducta rotatoria y una reducción en la generación de daño oxidante y preservación del tejido estriatal (Martínez-Lazcano, 2009). Sin embargo no se determinaron los niveles de los metabolitos principales de la VK, tampoco se demostró el efecto sobre la expresión del RNAm de la enzima KAT II.

3 JUSTIFICACIÓN

Existe el antecedente de la neuroprotección inducida por la administración sistémica del probenecid, kinurenina o la combinación de ambos en el modelo experimental de la EH, el cual consistió en una disminución del daño neurológico evaluado y oxidativo. Sin embargo a la fecha no se ha realizado la determinación de los principales metabolitos de la vía de la kinurenina, ni con la detección tanto génica como proteica de la KAT II. Por lo que el presente trabajo tuvo como objetivo principal demostrar la modulación de la KAT II en la neuroprotección inducida por la administración intraperitoneal de kinurenina, probenecid o la combinación de ambos. La modulación de la KAT II como terapia nos lleva a proponer un aumento de los metabolitos KYN y KYNA para favorecer la neuroprotección en el modelo experimental de la EH.

4 HIPÓTESIS

Se desconoce el efecto que causa la administración sistémica de los tratamientos kinurenina y probenecid sobre la expresión de la proteína KAT II y del RNAm de la KAT II, en la neuroprotección observada en un modelo experimental de la enfermedad de Huntington. Por lo que se propone que la administración de L-KYN, PROB o la combinación de ambos modularán a la KAT II para aumentar los niveles de KYNA en rata.

5 OBJETIVOS

Evaluar posibles efectos neurofarmacológicos en rata, posterior a la administración de kinurenina, probenecid y la combinación de ambos.

Analizar la expresión del RNAm de la enzima KAT II, en ratas administradas con PROB, KYN y la combinación de ambos (P + K) en un modelo de la EH.

Detectar el nivel de la proteína KAT II, posterior a la administración de kinurenina, probenecid y la combinación de ambos en el modelo experimental de la enfermedad de Huntington.

Determinar los niveles de los metabolitos KYNA y KYN en LCR, en ratas administradas con PROB, KYN y la combinación de ambos, en el modelo de la EH.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar (250 a 280 g de peso), las cuales se mantuvieron dentro del bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez", en un cuarto con un ciclo de luz-oscuridad de 12:12 hrs, a una temperatura y humedad relativa reguladas, y con libre acceso a comida (Rodent Laboratory Chow) y agua. Los animales se mantuvieron en cajas de acrílico (un máximo de 5 ratas/caja), que contenían una cama de aserrín previamente esterilizado (Crigamex[®]).

Este trabajo cumple con los lineamientos establecidos en la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999.

Los animales se dividieron en 5 grupos experimentales (n= 2 a 6) tal como se indica en la figura 5. Los grupos 1 y 2 recibieron solución salina isotónica (SSI vía i.p.) antes de la lesión del núcleo estriado. El grupo 3 recibió KYN a una dosis de 200 mg/kg i.p. El grupo 4 recibió probenecid a una dosis de 100 mg/kg, i.p. El grupo 5 recibió la combinación de ambos tratamientos, por lo que se les administró KYN (200 mg/kg) y PROB (100 mg/kg), ambos por vía i.p. 30 min después de los tratamientos indicados se lesionó el cuerpo estriado de las ratas de los grupos 2-5, por la administración de QUIN (1 µl, 240 nmol/µl). El grupo 1 recibió en vez de QUIN, SSI (1 µl). Dos horas o seis días después de la lesión, el animal fue sacrificado para la obtención del cuerpo estriado.

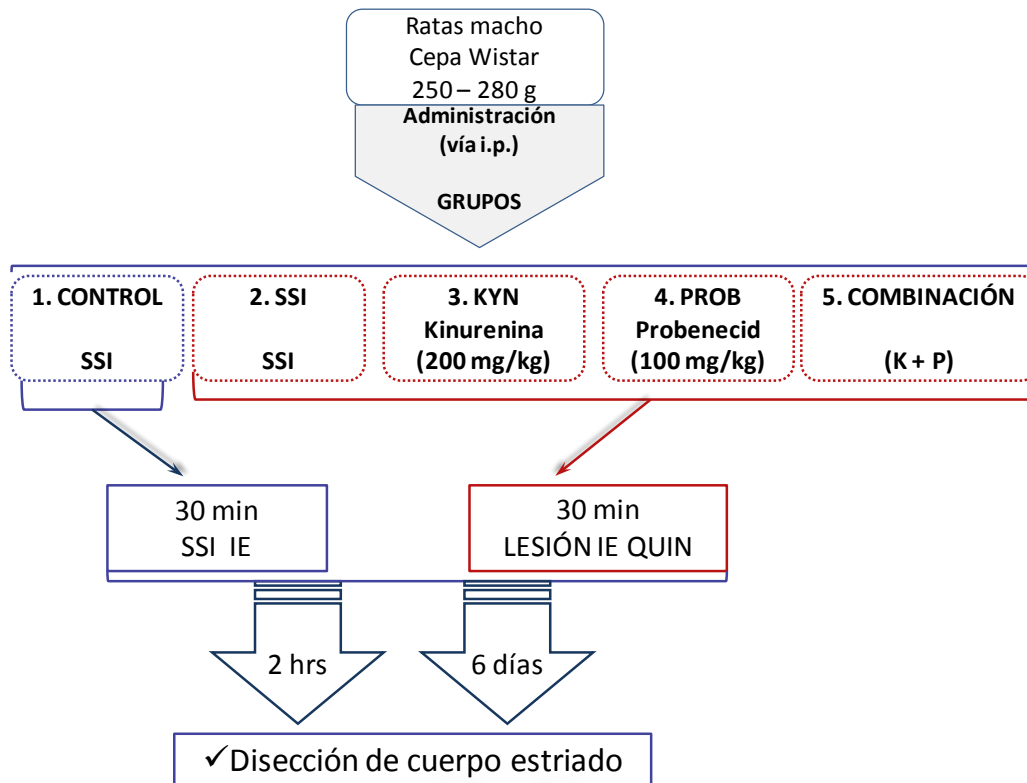


Figura 5. Diseño general de trabajo.

6.2 LESIÓN DEL ESTRIADO CON QUIN

Treinta minutos después de la administración de los tratamientos, las ratas se anestesiaron de manera general con ANESTESAL[®] (pentobarbital sódico 40 mg/Kg, i.p.) y se colocaron en un aparato estereotáxico para realizar la lesión intraestriatal (I.E.) administrando 1µl QUIN (240 nmol/µl) directamente en el cuerpo estriado derecho, las coordenadas utilizadas fueron 0.5 mm anterior a Bregma, 2.7 mm lateral a Bregma y 4.5 mm ventral a la duramadre; establecidas en trabajos anteriores (Pérez-Severiano y cols., 1998). La administración se realizó a través de una microjeringa Hamilton de 10 µl adaptada a una bomba de perfusión a un flujo de 0.5 µl/min.

6.3 VALORACIÓN DE LA COORDINACIÓN MOTORA

Se evaluaron los posibles efectos adversos que pudieran presentar los animales al ser sometidos a los diferentes tratamientos. Esta prueba se realizó en los grupos

experimentales 2 al 5, el grupo 1 se omitió debido a que no se realizó lesión IE. Para determinar la coordinación motora se cuantificó el tiempo de permanencia en el rotarod (Ugo Basile, Comerio VA, Italia) durante un máximo de diez minutos a una velocidad inicial de 4 rpm, con incrementos constantes de 1 rpm cada 15 seg, alcanzando una velocidad máxima de 40 rpm. Los animales se entrenaron dos días previos al día de la administración de los tratamientos, colocándolos sobre los cilindros durante 5 min. El tercer día se evaluó la actividad motora basal de todos los grupos 3 hrs previas a la administración de los tratamientos. Enseguida se administraron los tratamientos y 3 hrs después se aplicó nuevamente la prueba de rotarod. Se obtuvo el promedio del tiempo de permanencia de cada rata, con lo que se calculó la media y el error estándar para cada grupo.

6.4 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DEL KYNA Y LA KYN POR HPLC

Se midieron los niveles de los metabolitos KYNA y KYN en LCR en las ratas que fueron sometidas a la prueba de rotarod. El LCR se extrajo de la cisterna magna mediante punción, para lo cual la rata se anestesió con ANESTESAL[®] (pentobarbital sódico 40 mg/kg, i.p.) y posteriormente se colocó en el aparato estereotáxico para localizar la cisterna magna por tacto. Se utilizó una cánula P50 acoplada a una aguja de 22 G de grosor y una jeringa. Las muestras que contuvieran sangre se centrifugaron inmediatamente a 4 °C y 12,000 rpm durante 2 minutos, se desecharon aquellas que no contenían apariencia transparente. Las muestras se conservaron a -70 °C para su posterior análisis.

A las muestras de LCR se les agregó 20 µl de metanol frío para precipitar cualquier residuo de proteína y se centrifugaron a 4 °C y 14,000 rpm durante 4 min. Se filtraron con un microfiltro de 0.22 µm (Millex-GV, Millipore, MA, EUA) y se depositaron en viales individuales para su análisis. La evaluación se realizó por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) (Agilent 1100, Agilent Technologies, CA, EUA) equipado con bomba cuaternaria, automuestreador y detectores de fluorescencia y UV con arreglo de diodos utilizando el software

Chemstation versión 5.0. Se inyectaron 50 µl de la muestra en el equipo manejando una fase móvil de amortiguador de acetato de zinc 10 mM (89%), acetonitrilo (7%) y metanol (4%) a una velocidad de flujo de 1.1 ml/min. La fase estacionaria consistió en una columna de fase reversa de 4.6 x 150 mm y tamaño de partícula 3.0 µm (Spherisorb ODS2, Waters, MA, EUA). La detección se realizó por fluorescencia a una longitud de onda de 246 nm de excitación y 400 nm de emisión. Para lograr una mejor detección del metabolito, cada muestra se inyectó junto con 50 µl de un estándar de KYNA a una concentración conocida en LCR artificial.

El cálculo de la concentración de KYNA y KYN se realizó interpolando los valores de cada muestra en la fórmula de regresión lineal de su respectiva curva de calibración. Al valor de la concentración final se le restó el valor de la concentración del estándar añadido para obtener así la concentración real de cada muestra.

6.5 DISECCIÓN DEL TEJIDO ESTRIATAL

Se llevó a cabo la eutanasia de los animales experimentales dos horas y seis días después de realizar la lesión estereotáxica con QUIN o la inyección de SSI. Se decapitó al animal, se extrajo el encéfalo y se disecó el cuerpo estriado en un lapso no mayor a 5 min. El tejido se depositó en un tubo *ependorf* y se almacenó a -70 °C para ser procesado al día siguiente.

6.6 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La determinación de proteínas se llevó a cabo de acuerdo con la técnica descrita por Lowry (1951). Se preparó una curva patrón con el estándar de albúmina bovina. Se determinó la absorbancia de la curva patrón y de las muestras problema a 550 nm en un espectrofotómetro UV/VIS (PERKIN ELMER). La concentración de proteínas en las muestras fue obtenida por interpolación con los valores de la curva patrón.

6.7 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL

Se llevó a cabo la cuantificación de la expresión génica de RNAm de la KAT II por el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) en tiempo real. Todos los materiales de vidrio que se utilizaron se encontraban estériles. Los materiales de plástico que se usaron estaban nuevos, guantes de nitrilo libres de polvo. El material de disección se encontraba libre de RNAsas tratadas con agua con dietilpirocarbonato (DEPC 1 ml/l). Se utilizó un termociclador 7500 Real Time PCR System de Applied Biosystems.

Con la finalidad de determinar el tiempo óptimo para la cuantificación de la expresión de RNAm de la KAT II en los grupos experimentales utilizados, previamente se determinó dicha expresión en animales administrados únicamente con PROB (100 mg/kg, vía i.p.) sin lesión alguna. Dichos animales fueron sacrificados por decapitación en tiempos diferentes (0, 0.5, 2, 6 y 12 hrs) y el tejido estriatal fue obtenido. Con los resultados obtenidos en esta sección experimental, se decidió determinar la expresión de RNAm de la KAT II en los 6 grupos experimentales, los cuales después de haber sido administrados con probenecid, kinurenina o ambos, fueron lesionados intraestriatalmente con QUIN y sacrificados 2 hrs después para la obtención del tejido estriatal.

Se extrajo el RNA total de cada muestra siguiendo las instrucciones del fabricante. El tejido se homogeneizó en 1 ml de Trizol y se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente, agregando enseguida 200 µl de cloroformo, se agitaron vigorosamente y posteriormente se centrifugaron. Se obtuvo el RNA total en la fase acuosa, el cual se transfirió a un tubo nuevo y se le agregó 500 µl de isopropanol por cada ml de Trizol para precipitar el RNA y se centrifugaron durante 10 min a 12,000 xg a 4 °C. La pastilla sedimentada se lavo con etanol al 75% y se centrifugó durante 5 min a 7,500 x g a 4 °C. El sobrenadante se desecho y el pellet se secó a temperatura ambiente durante 10-15 min. Posteriormente, el RNA total se resuspendió en 50 µl de H₂O-DEPC y se cuantificó por UV a 260 nm.

Como control endógeno se empleó 18S el cual es un RNAm de referencia que se expresa en corteza cerebral de rata (Kubista y cols., 2006). Dicho control endógeno es ampliamente utilizado para validar la estabilidad de la expresión del gen control, en las condiciones de un experimento a realizar y de esta manera llevar a cabo la normalización de los datos.

Se sintetizó DNA complementario (DNAc) a partir de 5 µg de RNA total empleando hexámeros al azar (2.5 µM) y transcriptasa reversa M-MLV (200 U). La reacción se incubó durante 1 h a 37 °C. En tubos *ependorf* nuevos se depositó 500 µl de H₂O-DEPC, se adicionó la mezcla de reacción 7.5 µl (tabla 2) y se agregó la cantidad de muestra establecida para cada tubo, todo se mantuvo en hielo y finalmente se introdujeron al termociclador punto final durante 1 h a 37 °C para obtener el DNAc.

El análisis de la expresión del RNAm de la KAT II se realizó empleando ensayos prediseñados para sonda TaqMan®-FAM (Rn00567882_m1) y como control interno el RNA ribosomal 18S (TaqMan®VIC) (Applied Biosystems). El análisis de los datos se realizó utilizando el método comparativo Δ CT (Livak y Schmittgen, 2001).

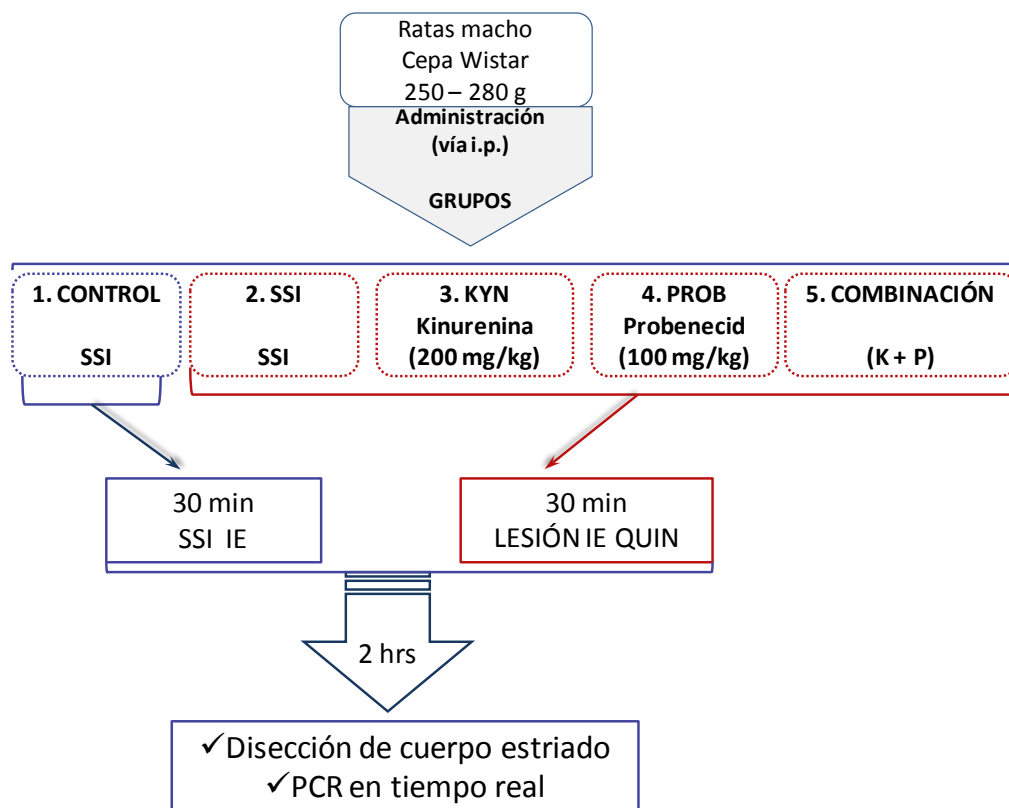


Figura 6. Diseño experimental de trabajo para PCR en tiempo real.

6.8 DETERMINACIÓN DE KAT II POR ELECTROFORESIS EN FASE SÓLIDA

Las muestras se trataron previamente añadiendo una mezcla de inhibidores de proteasas para su homogeneización. Se tomó el volumen correspondiente a 50 µl de muestra y se agregaron 50 µl de buffer de lisis, los cuales se depositaron en tubos *ependorff*. Las proteínas se desnaturalizaron en un baño en ebullición durante 3 min, posteriormente se depositaron en hielo y se centrifugaron a -4 °C durante 10 min a 14,000 rpm, el sobrenadante se almacenó a -70°C para su análisis posterior. Las proteínas se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) que contenían dodecil sulfato de sodio (SDS, Sigma Co, 10%). Cada muestra se colocó en un pozo de gel SDS-PAGE. La electroforesis se corrió a 50 volts durante 10 min y posteriormente a 150 volts durante 50 min. Terminado este tiempo se llevó a cabo la electrotransferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa (PVDF Millipore Immobilion-P) a 120 Amp durante 1 h con el sistema de electrotransferencia semiseco (C.B.S SCientific CO, Mod. # EBU-4000). Las membranas se colocaron en

un recipiente para realizar el bloqueo de proteínas inespecíficas y evitar la unión de los anticuerpos a la membrana por adsorción, se agregaron 25 ml de una mezcla de leche Svelty al 5% disuelta en PBS tween 0.05% y se incubaron durante 1 h en el agitador. La inmunodetección de las proteínas en la membrana de nitrocelulosa se realizó incubando las membranas con el anticuerpo primario contra KAT II (M-300: sc-67376; Santa Cruz Biotechnology, Inc.), a una dilución de 1:300, durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente se retiró la solución y se llevaron a cabo varios lavados con PBS tween y posteriormente se agregó el anticuerpo secundario HRP-Goat Antirabbit IgG (H+L 81-6120) a una dilución de 1:5000 incubando las membranas durante 1h en el agitador, después se realizaron varios lavados con PBS tween para llevar a cabo el revelado. Para la detección de proteínas se agregó el reactivo NENTM (Life Science Products) sobre cada membrana, las cuales se colocaron sobre una película de Kodak (X-OMAT) con un casete de autoradiografía (Fisher Scientific). Por último se llevo a cabo el revelado de las placas para su posterior análisis por densitometría con el programa labworks 4.0.

7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las diferencias entre los promedios de los grupos tratados y sus controles se determinaron por la prueba de ANOVA, seguido por una prueba *post-hoc* de Tukey. Un valor de $p < 0.05$ se consideró significativa, con excepción del grupo con rotarod donde se utilizó ANOVA para medidas repetidas.

8 RESULTADOS

8.1 EVALUACIÓN DE LA COORDINACIÓN SENSOMOTORA

Para evaluar los posibles efectos adversos de KYN (200 mg/kg), PROB (100 mg/kg) y la combinación de ambos se llevó a cabo la evaluación de la coordinación motriz por medio de la prueba de rotarod. La evaluación consistió en dos fases: la primera fase se realizó 3 hrs antes y la segunda fase 3 hrs después de la administración de cada tratamiento. Los resultados muestran que la administración sistémica de los tratamientos PROB, KYN y la combinación de ambos no ocasionaron neurotoxicidad ya que no se observó diferencia estadísticamente significativa en los tiempos de permanencia en rota rod entre los grupos (figura 7).

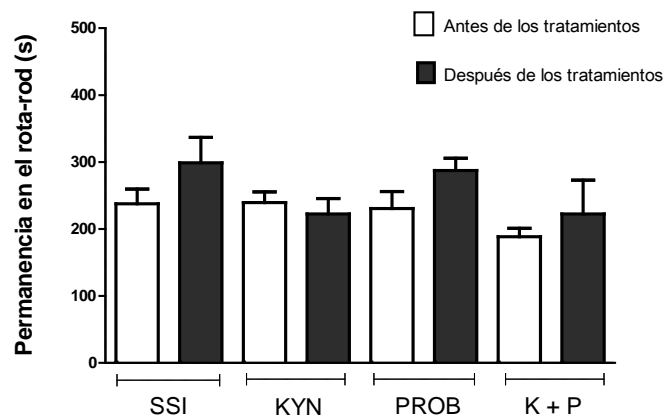


Figura 7. Evaluación de la actividad motora antes y después de la administración de PROB, KYN y la combinación de ambos. Los datos están expresados en segundos. Cada barra representa el valor promedio \pm el error estándar. $n=6$. SSI=solución salina isotónica. KYN=kinurenina. PROB=probenecid. K + P=kinurenina más probenecid. ANOVA de 2 vías para medidas repetidas.

8.2 EXPRESIÓN DEL RNAm DE KAT II DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE PROBENECID

Derivado del interés por conocer el tiempo de máxima expresión del RNAm de KAT II por la administración de PROB, se analizó en el tejido que se extrajo a diferentes tiempos (0, 0.5, 2, 6 y 12 hrs) sin lesión con QUIN. La mayor expresión de RNAm de KAT II se obtuvo en el grupo de ratas sacrificadas a las 2 hrs (figura 8), siendo estadísticamente significativo con respecto a los grupos 0 y 12 hrs.

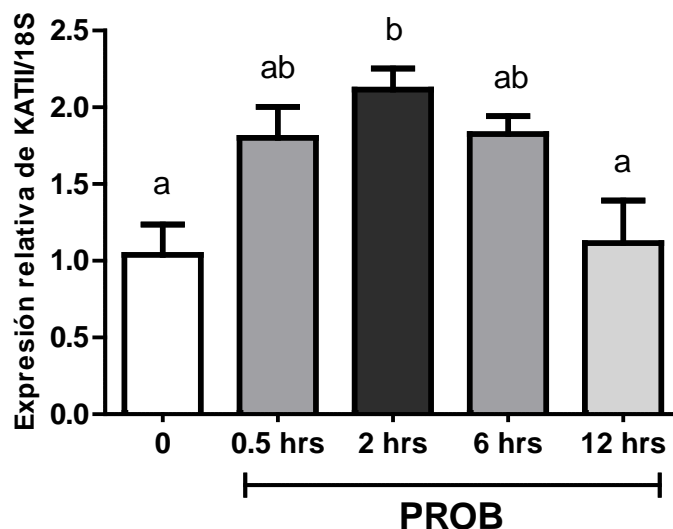


Figura 8. Expresión de KAT II después de la administración de probenecid. Cada barra representa la expresión relativa de mRNA de KAT II normalizado con respecto a 18S, las muestras se obtuvieron a diferentes tiempos (0, 2, 4, 6 y 12 hrs, con una n=6). ANOVA seguido por la prueba de *post hoc* de Tukey. Literales diferentes representan diferencia significativa ($p < 0.05$).

8.3 EXPRESIÓN DEL RNAm DE KAT II EN RATAS ADMINISTRADAS CON KINURENINA, PROBENECID Y LA COMBINACIÓN DE AMBOS EN RATAS LESIONADAS CON QUIN

El análisis de PCR en tiempo real se llevó a cabo para determinar los niveles de expresión de RNAm de KAT II en animales administrados con KYN PROB y la combinación de ambos, previo a la lesión con QUIN. La expresión relativa de RNAm de KAT II se normalizó con respecto a 18S un gen constitutivo de corteza cerebral. El mayor nivel de expresión de KAT II se observó en el grupo PROB (figura 9), dicho resultado es estadísticamente significativo con respecto al resto de los grupos. El grupo CT presentó una diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo intacto. El grupo K + P presentó una diferencia significativa con respecto al grupo 0, SSI y KYN.

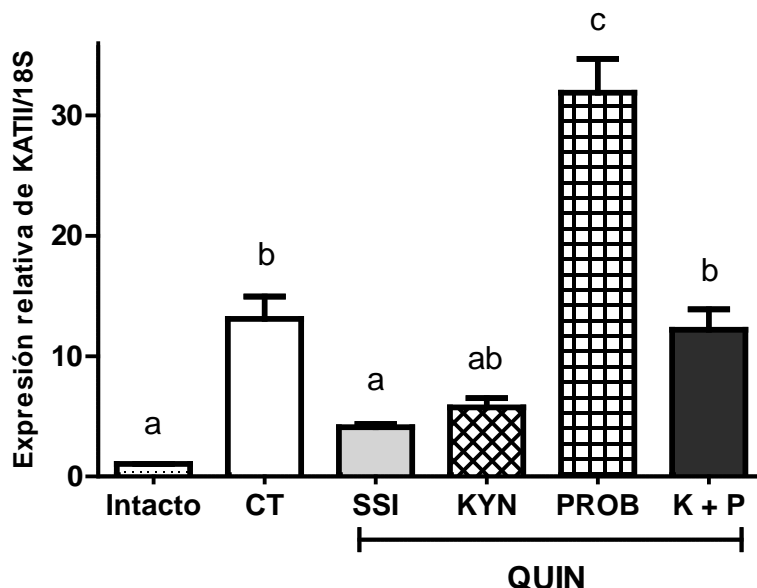


Figura 9. Expresión relativa de KAT II normalizado con respecto a 18S, en grupos de animales administrados con los tratamientos (con una n=6). El tejido se obtuvo 2 hrs después de la lesión. ANOVA seguido por la prueba de *post hoc* de Tukey. CT=control. SSI=solución salina isotónica. KYN=kinurenina. PROB= probenecid. K + P=kinurenina más probenecid. Literales diferentes representan diferencia significativa ($p<0.05$).

8.4 DETECCIÓN DEL NIVEL PROTEICO DE KAT II POR WESTERN BLOT

En trabajos anteriores está reportado que la administración de los tratamientos previa a la lesión de QUIN, protege del daño oxidante y de la neurodegeneración causados por QUIN evaluados 2 hrs y 6 días después de la lesión (Martínez Lazcano y cols., 2009), por lo que se evaluó la expresión de la KAT II por electroforesis en fase sólida en los diferentes grupos tratados a esos mismos tiempos después de la lesión con QUIN (figura 10).

El análisis densitométrico de la KAT II normalizado con respecto a β -actina, muestra que el grupo PROB aumentó la expresión de KAT II dos horas después de la lesión del cuerpo estriado (figura 10A), siendo estadísticamente significativo con respecto a los grupos CT, SSI y KYN. El grupo K + P, aunque muestra un incremento de la expresión de KAT II, no es estadísticamente significativo con respecto al grupo CT. En contraste, el grupo KYN no mostró un incremento de la expresión de la enzima KAT II. Un resultado similar se observó al analizar la expresión de KAT II 6 días después de la lesión con QUIN (figura 10B). La expresión de la enzima KAT II es mayor sólo en el grupo PROB en los dos tiempos evaluados (figuras 10C, 10D).

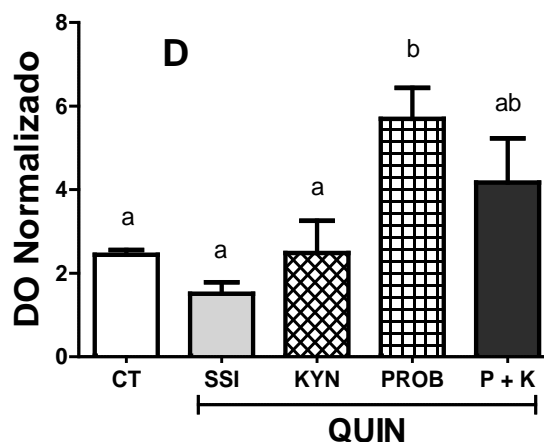
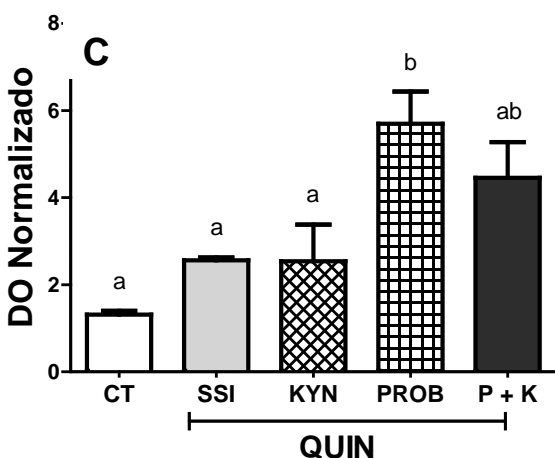
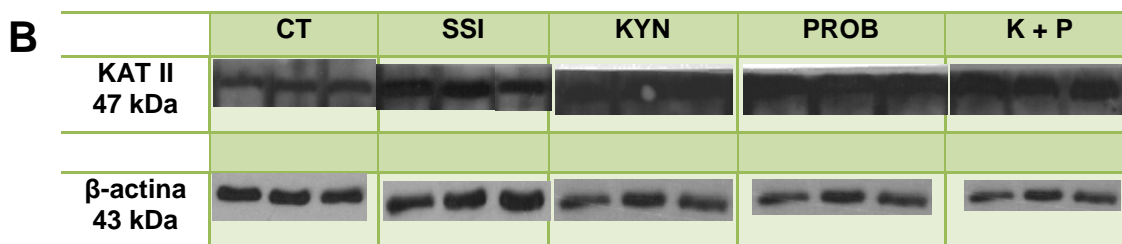
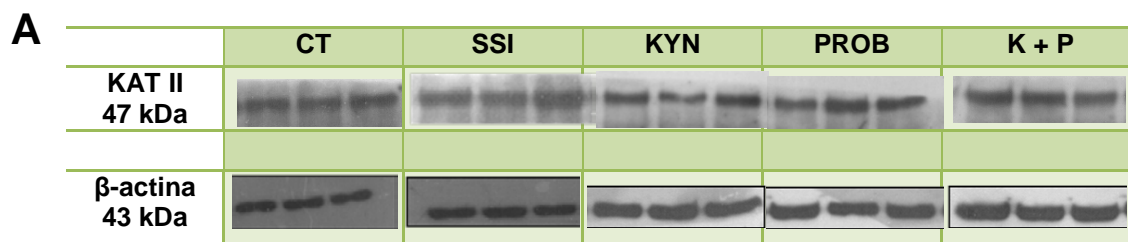


Figura 10. Análisis de la expresión de KAT II y β -actina por electroforesis. A) Expresión de KAT II 2 horas después de la lesión con QUIN de los grupos CT, SSI, KYN, PROB y la combinación (K + P). B) Expresión de KAT II 6 días después de la lesión con QUIN de los grupos CT, SSI, KYN, PROB y la combinación (K + P). C y D las gráficas representan la densitometría óptica (DO) de la expresión relativa de KAT II normalizado con respecto a β -actina, 2 horas (C) y 6 días (D) después de la lesión. Cada barra representa el promedio de 6 experimentos \pm el error estándar. ANOVA seguido por la prueba de *post hoc* de Tukey. En tejido extraído 6 días después de la lesión. Cada barra representa el promedio de 6 experimentos \pm el error estándar de la media. CT=control. SSI=solución salina isotónica. KYN=kinurena. PROB=probenecid. K + P=kinurena más probenecid. Literales diferentes representan diferencia significativa ($p < 0.05$).

8.5 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO KINURÉNICO EN EL LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO

Se midieron los niveles de KYNA en LCR a las ratas empleadas para la prueba en el rotarod, 3 hrs después de que se inyectaron con los tratamientos. La administración i.p. de la combinación aumentó los niveles de KYNA en LCR, dicho resultado es estadísticamente significativo con respecto a los grupos KYN, PROB y CT (figura 11). La administración de kinurenina y probenecid solos no cambió la concentración basal de KYNA obtenida en el grupo CT. El grupo KYN mostró una tendencia a aumentar los niveles de KYNA en LCR con respecto a los grupos CT y PROB, sin embargo dicho resultado no es estadísticamente significativo.

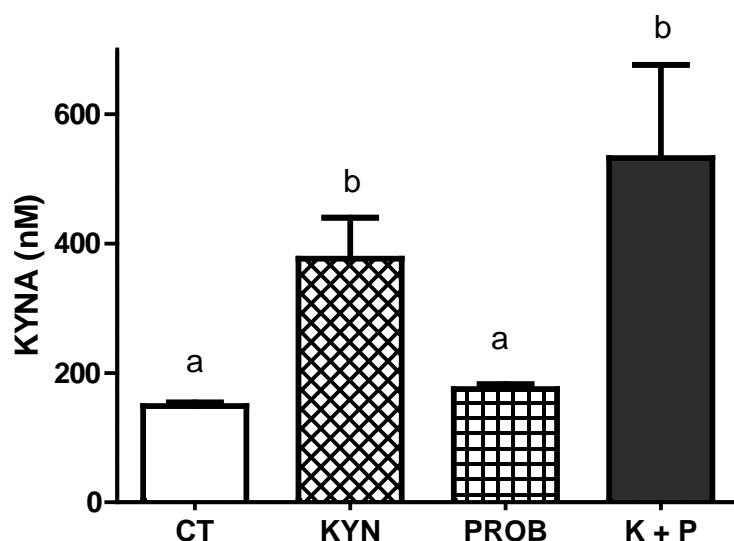


Figura 11. Concentración del metabolito ácido kinurénico en LCR determinado por HPLC. Cada barra representa una $n=2-6$ experimentos \pm el error estándar. ANOVA seguido por la prueba de *post hoc* de Tukey. CT=control. KYN=kinurenina. PROB=probenecid. K + P=kinurenina más probenecid. Literales diferentes representan diferencia significativa ($p<0.05$).

8.6 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE KINURENINA EN LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO

Se midieron los niveles en LCR de la cisterna magna en las ratas empleadas para la prueba en el rotarod, 3 hrs después de que se administraran los tratamientos. La administración i.p. de la combinación de los tratamientos incrementó la

concentración de KYN en LCR de manera significativa (figura 12). El grupo PROB y KYN presentó niveles de KYN en LCR similares al grupo CT.

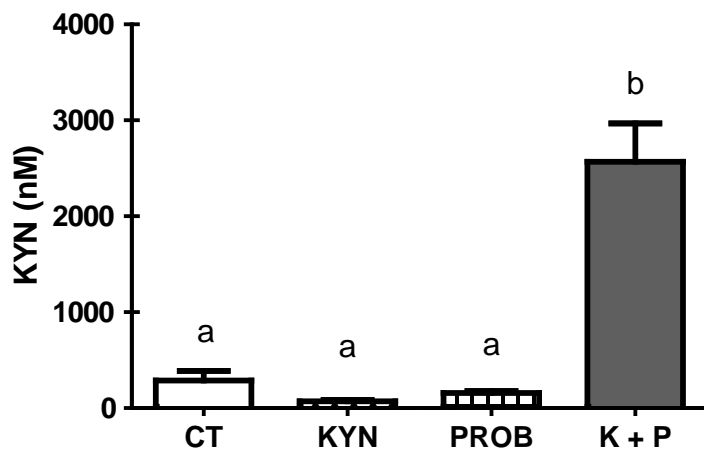


Figura 12. Concentración del metabolito kinurenina cuantificado en LCR por HPLC. Cada barra representa una $n=2-6$ experimentos \pm el error estándar. ANOVA seguido por la prueba de *post hoc* de Tukey. CT=control. KYN=kinurenina. PROB=probenecid. K + P=kinurenina más probenecid. Literales diferentes representan significan diferencia significativa ($p<0.05$).

9 DISCUSIÓN

La EH es una enfermedad neurodegenerativa con una fisiopatología compleja. Existen diferentes hipótesis que intentan explicar el daño ocasionado en la EH, como la de la excitotoxicidad causada por la sobreactivación de los NMDAr y la muerte subsecuente de neuronas espinosas medianas estriatales (Fan y Raymond, 2007), así como la hipótesis kinurinérgica, la cual apoya que una alteración en la VK podría ser la responsable en el daño neuronal (Schwarcz y cols. 2010).

El presente trabajo tuvo como objetivo demostrar los cambios en la expresión tanto génica como proteica de la KAT II, enzima responsable de la conversión de la kinurena hasta la formación del antagonista al NMDAr, el ácido kinurénico, posterior a la administración por vía intraperitoneal de kinurena, probenecid o la combinación de ambos en un modelos experimental de la EH, para lo cual se realizaron diferentes pruebas tanto motoras, como la detección de RNAm y de la expresión de la KAT II, así como la detección por HPLC de los metabolitos KYN y KYNA de la vía de las kinureninas.

Los resultados obtenidos con la prueba de rotarod apoyaron la carencia de efectos adversos de los distintos tratamientos administrados en los diferentes grupos experimentales. Esta prueba fue determinante para poder continuar con el estudio de la modulación de la KAT II inducida por la administración de PROB, KYN o la combinación de éstos.

Fue determinada la expresión del RNAm para KAT II. En primera instancia, se realizó un curso temporal para saber el momento en que se incrementaban los niveles del RNAm por la administración de PROB. El tiempo en el que se obtuvo la máxima expresión de RNAm de KAT II, fue a las 2 hrs después de la administración de PROB, lo que correlaciona con el tiempo de neuroprotección observada ante el daño oxidante, es decir, dos horas después de la administración de PROB (Martínez-Lazcano y cols., 2009). Posterior a este hallazgo confirmatorio a

evidencias previas, se decidió realizar el análisis de la expresión del RNAm de KAT II, 2 hrs después de la lesión con QUIN en los diferentes grupos experimentales.

Las ratas tratadas con PROB mostraron un aumento significativo en los niveles de la expresión de RNAm de KAT II, confirmando la interacción que puede tener el PROB sobre la KAT II, lo que muestra el beneficio de administrar esta sustancia más allá de su función como bloqueador del transportador de ácidos orgánicos. De manera interesante, la administración de la combinación (K + P) no sólo no incrementa la expresión de RNAm sino que anula el incremento provocado por el PROB. Esto nos hace especular que el efecto de PROB sobre la expresión de la enzima KAT II, debe de ser mediado por la acumulación de un metabolito, ya que al administrar el sustrato de la enzima evita el incremento de su expresión. El grupo de Schwarcz y cols. (1992) demostró por inmunoreactividad que la KAT II se encuentra en abundancia en los astrocitos. Además el mismo grupo observó que 7 días después, de una lesión IE con QUIN, la actividad de KAT II está aumentada y también los niveles de KYNA. Los resultados obtenidos en este trabajo conjuntamente con los antecedentes mencionados, llevan a proponer que PROB actúa como inhibidor del transporte de ácidos orgánicos directamente en los astrocitos, al menos en los grupos de 6 días (Schwarcz y cols., 1992). Otros estudios previos a nuestro trabajo, demuestran la presencia de las diferentes KATs en los astrocitos de humano: KAT I y KAT II. Sin embargo la enzima KAT II se encuentra 30 veces en mayor proporción que KAT I, aunado a esto el mismo grupo demostró que en los astrocitos no se localiza la enzima kinurenina hidroxilasa (KYN-OHase), la cual da lugar la vía neurotóxica, lo que significa que no se produce 3-HK y que la formación de QUIN se reduce de manera importante, la cual es degradada inmediatamente en los astrocitos. Esta demostración explica porque en los astrocitos se forman en mayor cantidad los metabolitos KYN y KYNA y porque al presentarse una astrogliosis a consecuencia de la administración de QUIN, no hay un daño mayor, debido a que se promueve la formación de KYNA (Guillemin y cols., 2001).

La administración de KYN junto con PROB tiene efecto neuroprotector contra las lesiones inducidas con QUIN en estriado de rata (Kalonía y cols., 2011a,b), estrategia terapéutica que se utiliza en modelo de la EH. Sin embargo, aunque está demostrado por varios grupos que el tratamiento de KYN más PROB tiene efecto sobre los niveles del KYNA, a la fecha no se conoce el posible efecto sobre la enzima encargada de su síntesis, la KAT II.

Al respecto, los resultados obtenidos en este trabajo por electroforesis muestran que 2 horas posteriores a la lesión del cuerpo estriado con QUIN provoca un ligero incremento de la expresión de la enzima KAT II, que si bien no es significativo, si puede evidenciar una respuesta compensadora del SNC, que para evitar un exceso de estimulación de los receptores NMDA por el QUIN se incremente la síntesis de KYNA, el metabolito antagonista a los NMDAr. De manera interesante, se observa un aumento en la expresión de la enzima KAT II en los grupos tratados con PROB. Si bien el objetivo de administrar PROB fue disminuir la eliminación de KYNA del SNC, estos datos apuntan a un efecto aditivo, ya que el PROB es capaz de aumentar los niveles enzimáticos. El diseño de este experimento impide concluir sobre el mecanismo por el cual se da esta interacción, pero es probable que el PROB provoque la acumulación de algún metabolito que sea el causante de incrementar la expresión de la enzima. Sin embargo, existe la probabilidad de que el efecto del PROB sea por un mecanismo directo sobre las células neuronales.

Al analizar el nivel de expresión de KAT II 6 días después de la lesión del cuerpo estriado con QUIN, observamos que no se presenta el incremento observado a las 2 horas posterior a la lesión en los grupos que no recibieron PROB. Esta diferencia puede deberse a que la lesión ya causó la muerte neuronal, por lo que se tiene una menor expresión de la enzima. Por otra parte, el grupo que fue tratado con PROB, nuevamente tiene una mayor expresión de la enzima KAT II. Esto puede deberse, además de la posible interacción mencionado anteriormente, a que se tiene una protección contra el daño neuronal y por lo tanto, al no haber pérdida neuronal, es mayor la expresión enzimática.

El resultado de nuestro análisis por electroforesis en fase sólida indica que la banda encontrada 47 kDa representa la expresión de KAT II en los grupos tratados con PROB, KYN y la combinación de ambos (P + K) (Yu y cols., 1999; Han y cols., 2008). Los resultados del presente estudio indican que probenecid es capaz de atenuar la neurotoxicidad inducida por QUIN, como está reportado en trabajos anteriores donde se observó una reducción en la conducta de giro, recuperación en los niveles de GABA y disminución del daño oxidante 2 hrs después de la administración de los tratamientos y disminución de la muerte neuronal en el cuerpo estriado a los 6 días de la lesión con QUIN. (Santamaría y cols., 1996; Martínez-Lazcano y cols., 2009).

A pesar de que el PROB, al ser un inhibidor del transporte de ácidos orgánicos y por lo tanto evite la salida de KYNA del cerebro, la combinación de ambas sustancias no incrementa la expresión enzimática.

Después de la cuantificación por HPLC de los metabolitos principales (KYN y KYNA) en el tejido estriatal de los diferentes grupos tratados con KYN, PROB o la combinación de ambos; encontramos que la administración de KYN tiende a aumentar los niveles de KYNA, como era de esperarse, ya que se está administrando el precursor, mientras que la administración de PROB no altera los niveles de KYNA respecto al grupo control. Como se puede observar, el tratamiento de la combinación (K + P) es el que muestra el mayor aumento de los niveles de KYNA. Estos resultados sugieren que el PROB impide la eliminación de KYNA del SNC, como está postulado. Por otra parte, nuestros resultados muestran que la administración sistémica de KYN no incrementa los niveles de KYN cuantificados en el LCR, lo que concuerda con la idea de que la KYN administrada es convertida principalmente a KYNA. De manera interesante, la administración conjunta de (K + P) también incrementa los niveles de KYN en el LCR.

Nuestros resultados concuerdan con trabajos anteriores donde la administración de KYN aumenta los niveles de KYNA en hipocampo, corteza cerebral y cuerpo estriado de mamíferos (Turski y cols., 1989), mientras que Miller y cols. en 1992 administraron la combinación de KYN y PROB obteniendo un aumento en los niveles de KYNA.

Se desconoce si los niveles de KYNA se ven afectados por la administración de los tratamientos con KYN, PROB y la combinación de ambos. Está demostrado que la administración vía microdiálisis o por vía periférica del precursor KYN aumenta las concentraciones de KYNA en LCR y en plasma, de manera dosis dependiente. Cuando KYN se administró vía periférica, el pico máximo de concentración se obtuvo en un rango de 2-2.5 hrs después de su administración (Swartz y cols., 1990; Ogaya y cols., 2010)

En nuestros resultados encontramos que la administración de KYN tiende a aumentar los niveles de KYNA, como era de esperarse, ya que se está administrando el precursor, mientras que la administración de PROB no altera los niveles de KYNA respecto al grupo control. Como se puede observar, el tratamiento de la combinación (K + P) es el que provoca el mayor aumento de los niveles de KYNA. Estos resultados sugieren que el PROB impide la eliminación de KYNA del SNC, como está postulado. Por otra parte, nuestros resultados muestran que la administración sistémica de KYN no incrementa los niveles de KYN cuantificados en el LCR, lo que concuerda con la idea de que la KYN administrada principalmente es convertida a KYNA. De manera interesante, la administración conjunta de (K + P) también incrementa los niveles de KYN en el LCR.

10 CONCLUSIÓN

Los resultados del presente estudio indican que kinurenina y probenecid son capaces de atenuar la neurotoxicidad inducida por QUIN 2 horas después de la administración de los tratamientos debido al incremento en la expresión de la enzima KAT II, responsable de la síntesis de KYNA, lo que confirma que el efecto neuroprotector ejercido por KYNA es principalmente debido a la acción antagónica del NMDAr.

11 PERSPECTIVAS

Es necesario llevar a cabo la demostración del mecanismo de modulación de la KAT II *in vitro*, mediante el uso de astrocitos, empleando cada fármaco por separado, ya que tanto en el presente trabajo como en estudios previos se observa que tanto la kinurenina como el probenecid solos o combinados ejercen un efecto neuroprotector, lo puede sugerir que existen mecanismos diferentes además del bloqueo del ácido kinurénico por al NMDAr.

12 BIBLIOGRAFÍA

1. Adkinson K.D., Artru A.A., Powers K.M., Shen D.D. (1994). Contribution of probenecid sensitive anion transport processes at the brain capillary endothelium and choroid plexus to the efficient efflux of valproic acid from the the central nervous system. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 268:797-805.
2. Beal M.F, Kowall N.W., Ellison D.W., Mazurek M.F., Schwarcz K.J., Martin J.B. (1986). *Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid.* *Nature* 321:168-171.
3. Beal M.F., Matson W.R., Swartz K.J., Gamache P.H., Bird E.D. (1990). *Kynurenine pathway measurements in Huntington's disease striatum: evidence for reduced formation of kynurenic acid.* *J Neurochem.* 55:1327-1339.
4. Carlock L., Walker P.D., Shan Y., Gutridge K. (1995). *Transcription of the Huntington disease gene during the quinolinic acid excitotoxic cascade.* *Neuroreport* 6:1121-1124.
5. Chiarugi A., Carpenedo R., Moroni F. (1996). *Kynurenine disposition in blood and brain of mice: effects of selective inhibitors of kynurenine hydroxylase and of kynureninase.* *J Neurochem.* 67:692-698.
6. Connick J.H., Heywood G.C., Sills G.J, Thompson G.G., Brodie M.J., Stone T.W. (1992). *Nicotinylalanine increases cerebral kynurenic acid content and has anticonvulsant activity.* *Gen. Pharmacol.* 23:235-239.
7. Cozzi A.R., Carpenedo, F. Moroni. (1999). *Kynurenine hydroxylase inhibitors reduce ischemic brain damage: studies with (m-nitrobenzoyl)-alanine and 3,4-dimethoxy-[N-4-(nitrophenyl)thiazol-2-yl]-benzenesulphonamide (Ro 61-8048) in models of focal or global brain ischemia.* *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 19:771-777.

8. Danysz W., Parsons A.C. (1998). *Glycine and N-methyl-D-aspartate receptors: physiological significance and possible therapeutic applications*. 1: Pharmacol. Rev. 50:597-664.
9. Deguchi Y, Inabe K, Tomiyasu K, Nozawa K, Yamada S, Kimura R. (1995). *Study on brain interstitial fluid distribution and blood-brain barrier transport of baclofen in rats by microdialysis*. Pharm. Res. 12:1838-1244.
10. DiFiglia M. (1990). Excitotoxic injury of the neostriatum: a model for Huntington's disease. Trends Neurosci 13:286-289.
11. DiFiglia M., Sapp E., Chase K.O., Davies S.W., Bates G.P., Vonsattel J.P., Aronin N. (1997). *Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain*. Science 277:1990-1993.
12. Dykstra K.H., Arya A., Arriola D.M., Bungay P.M., Morrison P.F., Dedrick R.L. (1993). *Microdialysis study of zidovudine (AZT) transport in rat brain*. J. Pharmacol. Exp. Ther. 267:1227-1236.
13. Eastman C.L., Guilarte T.R. (1989). *Cytotoxicity of 3-hydroxykynurenine in a neuronal hybrid cell line*. Brain Res. 495:225-231.
14. Foster A.C., Vezzani A., French E.D., Schwarcz R. (1984). *Kynurenic acid blocks neurotoxicity and seizures induced in rats by the related brain metabolite quinolinic acid*. Neurosci. Lett. 48:273-278.
15. Giordana M.T. Huntington's disease. (1995). *In Neuropathological Diagnostic criteria for Brain Banking*, ed por FF Cruz-Sánchez, R David y ML Cuzner. Amsterdam: IOS Press: 89-98.
16. Golden P.L., Brouwer K.R., Pollack G.M. (1993). *Assessment of valproic acid serum-cerebrospinal fluid transport by microdialysis*. Pharm. Res. 10:1765-1771.

17. Guidetti P., Wu H.Q., Schwarcz R. (2000). *In situ produced 7-chlorokynurenate provides protection against quinolinate- and malonate-induced neurotoxicity in the rat striatum*. *Exp. Neurol.* 163:123-130.
18. Han Q, Cai T, Tagle Da, Li J. (2010). *Structure, expression, and function of kynurenine aminotransferases in human and rodent brains*. *Cell. Mol. Life Sci.* 67:353-368.
19. Han Q., CAI T., Tagle D.A., Robinson H., Li J. (2008). *Substrate specificity and structure of human amino adipate aminotransferase II*. *Biosci. Reports* 28:205-215.
20. Hesselink MB, Smolders H, Eilbacher B, De Boer AG, Breimer DD, Danysz W. (1999). *The role of probenecid-sensitive organic acid transport in the pharmacokinetics of N-methyl-D-aspartate receptor antagonists acting at the glycine(B)-site: microdialysis and maximum electroshock seizures studies*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 290:543-550
21. Heyes, M.P., Saito, K., Lackner, A., Wiley, C.A., Achim, C.L., Markey, S.P. (1998). *Sources of the neurotoxin quinolinic acid in the brain of HIV-1-infected patients and retrovirus-infected macaques*. 1: *FASEB J.* 12:881-896.
22. Jauch D.A., Sethy V.H., Weick B.G., Chase T.N., Schwarcz R. (1993). *Intravenous administration of L-kynurenine to rhesus monkeys: effect on quinolinate and kynurenate levels in serum and cerebrospinal fluid*. *Neuropharmacol.* 32:467-472.
23. Kalonia H., Kumar P., Kumar A. (2011^a). *Attenuation of proinflammatory cytokines and apoptotic process by verapamil and diltiazem against quinolinic acid induced Huntington like alterations in rats*. *Brain Research.* 1372:115-126.

24. Kalonia H., Kumar P., Kumar A. (2011^b). *Licofelone attenuates quinolinic acid induced Huntington like symptoms: possible behavioral, biochemical and cellular alterations*. Prog. Neuro-psychopharmacol. Biolo. Psychi. 35:607-615.
25. Kessler M., Terramani T., Lynch G., Baudry M. (1989). *A glycine site associated with N-methyl-D-aspartic acid receptors: characterization and identification of a new class of antagonists*. J Neurochem. 52:1319-1328
26. Krobitch A., Kazantsev A. (2010). *Huntington's disease: From molecular basis to therapeutic advances*. Int. J. Biochem. Cell Biol. 43:20-24.
27. Kubista M., Andrade J.M., Benqtsson M., Forootan A., Jonák J., Lind K., Sindelka R., Sjöback R., Strömbom L., Ståhlberg A., Zoric N.(2006). Mol Aspects Med. 27:95-125.
28. Livak K.J., Schmittgen T.D. (2001) *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method*. Methods. 25:402-408.
29. Lowe J., Lennox G., Leigh P.N. *Disorders of movement and system degenerations. En: Greenfield's Neuropathology, V. 2*, ed por DI Graham y PL Lantos. Londres: Arnold, 6.^a ed., 1997: 281-366.
30. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randal R.J. (1951). Protein measure with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275.
31. Martínez–Lazcano, Juan Carlos. (2009). *Efecto de los pretratamientos solos y combinado de probenecid y kinurenina sobre el daño oxidativo en un modelo experimental de la enfermedad de Huntington*. (Tesis de Doctorado – UNAM).
32. Miller J.M., MacGarvey U., Beal M.F. (1992). *The effect of peripheral loading with kynurenine and probenecid on extracellular striatal kynurenic acid concentrations*. Neurosci. Lett. 146:115-118.

33. Miranda A.F., Boegman R.J., Beninger R.J., Jhamandas K. (1997). *Protection against quinolinic acid-mediated excitotoxicity in nigrostriatal dopaminergic neurons by endogenous kynurenic acid*. *Neuroscience*. 78:967-975
34. Moroni F., Lombardi G., Carla V., Pellegrini D., Carassale G.L., Cortesini C. (1986). *Content of quinolinic acid and of other tryptophan metabolites increases in brain regions of rats used as experimental models of hepatic encephalopathy*. *J Neurochem*. 46:869-874.
35. Moroni F., Russi P., Gallo-Mezo M.A., Moneti G., Pellicciari R. (1991). *Modulation of quinolinic and kynurenic acid content in the rat brain: effects of endotoxins and nicotylalanine*. *J. Neurochem*. 57:1630-1635.
36. Moroni F., Russi P., Lombardi G., Beni M., Carla V. (1988). *Presence of kynurenic acid in the mammalian brain*. *J. Neurochem*. 51:177-180.
37. Moroni, F. (1999). *Tryptophan metabolism and brain function: focus on kynurenine and other indole metabolites*. *Eur. J. Pharmacol*. 375:87-100.
38. Naora K., Ichikawa N., Nishimura N., Hirano H., Shen D.D., Iwamoto K. (1996). *Saturable transport of valproic acid in rat choroid plexus in vitro*. *J. Pharm. Sci*. 85:423-426.
39. Németh H., Robotka H., Toldi J., Vécsei L. (2007). *Kynurenines in the Central Nervous System: Recent Developments*. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry* 7:45-56.
40. Németh H., Robotka H., Toldi J., Vécsei L. (2007). *Kynurenines in the Central Nervous System : Recent Developments*. *System*. :45-56.
41. Ogaya T., Song Z., Ishii k., Fukishima T. (2010). *Changes in extracellular kynurenic acid concentrations in rat prefrontal cortex after D-kynurenine infusion: an in vivo microdialysis study*. *Neurochem. Res*. 35:559-563

42. Okuda S., Nishiyama N., Saito H., Katsuki H. (1996). *Hydrogen peroxide-mediated neuronal cell death induced by an endogenous neurotoxin, 3-hydroxykynurenine*. PNAS 93(22):12553-12558.
43. Okuda, S., Nishiyama, N., Saito, H., Katsuki, H. (1998). *3-Hydroxykynurenine, an endogenous oxidative stress generator, causes neuronal cell death with apoptotic features and region selectivity*. J. Neurochem. 70:299-307.
44. Okuno, E., Nakamura, M., Schwarcz, R. (1991). *Two kynurenine aminotransferases in human brain*. Brain Res. 542:307-312.
45. Pérez-Severiano F, Escalante B, Ríos C. (1998). *Nitric oxide synthase inhibition prevents acute quinolinate-induced striatal neurotoxicity*. Neurochem. Res. 23:1297-1302.
46. Perkins M.N., Stone T.W. (1982). *An iontophoretic investigation of the actions of convulsant kynurenines and their interaction with the endogenous excitant quinolinic acid*. Brain Res. 247:184-187.
47. Reddy P.H., Williams M., Tagle D.A. (1999). *Recent advances in understanding the pathogenesis of Huntington's disease*. Trends Neurosci. 22:248-255.
48. Roberts RC, McCarthy KE, Du F, Ottersen OP, Okuno E, Schwarcz R. (1995). *3-Hydroxyanthranilic acid oxygenase-containing astrocytic processes surround glutamate-containing axon terminals in the rat striatum*. J Neurosci. 15(2):1150-61.
49. Robitaille Y., Lopes-Cendes I., Becher M., Rouleau G., Clark AW. (1997). *The neuropathology of CAG repeat diseases: review and update of genetic and molecular features*. Brain Pathol. 7:901-926.
50. Russi P, Alesiani M, Lombardi G, Davolio P, Pellicciari R, Moroni F. (1992). *Nicotinylalanine increases the formation of kynurenic acid in the brain and antagonizes convulsions*. J. Neurochem. 59:2076-80.

51. Sanberg P.R., Coyle J.T. (1984). *Scientific approaches to Huntington's disease*, *CRCCrit Rev. Clin. Neurobiol.* 44.
52. Santamaría A., Ríos C., Solís F., Ordaz J., González L., Altagracia M., Kravzov J. (1996). *Systemic DL-Kynurenine and probenecid pretreatment attenuates quinolinic acid-induced neurotoxicity in rats*. *Neuropharmacology* 35:23-28.
53. Sapko M.T., Guidetti P., Yu P., Tagle D.A., Pellicciari R., Schwarcz R. (2006). *Endogenous kynurenate controls the vulnerability of striatal neurons to quinolinate: Implications for Huntington's disease*. *Exp. Neurol.* 197:31- 40.
54. Sardar A.M., Bell J.E., Reynolds G.P. (1995). *Increased concentrations of the neurotoxin 3-hydroxykynurenine in the frontal cortex of HIV-1-positive patients*. *J. Neurochem.* 64:932-935.
55. Schwarcz R. (2004). *The kynurenine pathway of tryptophan degradation as a drug target*. *Curr. Opinion Pharmacol.* 4:12-17.
56. Schwarcz R., Du F. (1991). *Quinolinic acid and kynurenic acid in the mammalian brain*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 294:185-199.
57. Schwarcz R., Tamminga C.A., Kurlan R., Shoulson I. (1988). *Cerebrospinal fluid levels of quinolinic acid in Huntington's disease and schizophrenia*. *Ann. Neurol.* 24:580-582.
58. Schwarcz R., Whetsell W., Mangano R., (1984). *Seizureactivity and lesions after introhippocampal quinolinic acid injection*. *Exp. Neurology.* 84:1-17.
59. Schwarcz R., Whetsell W.O. Jr, Mangano R.M. (1983). *Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain*. *Science* 219:316-318.

60. Schwarcz, R., Pellicciari, R. (2002). *Manipulation of brain kynurenines: glial targets, neuronal effects, and clinical opportunities*. J. Pharmacol. Exp. Ther. 303:1-10.
61. Schwarcz, R., Rassoulpour, A., Wu, H.Q., Medoff, D., Tamminga, C.A., Roberts, R.C. (2001). *Increased cortical kynurenate content in schizophrenia*. Biol. Psychiatry 50:521-530.
62. Sieradzan K.A., Mann D.M. (2001). *The selective vulnerability of nerve cells in Huntington's disease*. Neuropathol. Appl. Neurobiol. 27:1-21.
63. Silva A.D., Pérez C.V., Villeda H.J., Carrillo M.P., González H.I., García E., Colín B.L., Pedraza Ch. J., Santamaría A. (2011). *Protective effect of L-kynurenine and probenecid on 6-hydroxydopamine-induced striatal toxicity in rats: implications of modulating kynurenate as a protective strategy*. Neurotoxicology and Teratology. 33:303-312.
64. Speciale C., Wu H.Q., Cini M., Marconi M., Varasi M., Schwarcz R. (1996). *(R,S)-3,4-dichlorobenzoylalanine (FCE 28833A) causes a large and persistent increase in brain kynurenic acid levels in rats*. Eur. J. Pharmacol. 315:263-267.
65. Stone T.W. (2001). *Kynurenines in the CNS: from endogenous obscurity to therapeutic importance*. Prog. Neurobiol. 64:185-218
66. Stone T.W., Connick J.H., Winn P., Hastings M.H., English M. (1987). *Endogenous excitotoxic agents*. Ciba Found. Symp. 126:204-220.
67. Stone T.W., Perkins M.N. (1981). *Quinolinic acid: a potent endogenous excitant at amino acid receptors in CNS*. Eur. J. Pharmacol. 72:411-412.
68. Strong T.V., Tagle D.A., Valdes J.M., Elmer L.W., Boehm K., Swaroop M., Kaatz K.W., Collins FS, Albin RL. (1993). *Widespread expression of the human and rat Huntington's disease gene in brain and nonneural tissues*. Nat. Genet. 5:259-265.

69. Suzuki Y., Ishihara R., Ishii Y., Nakazawa A., Deguchi K., Matsumoto Y., Nishinari C., Nakane Y., Fukumoto T. (1996). *Antimicrobial activity of cefodizime against clinical isolates*. Jpn. J. Antibiot. 49:947-65.
70. Swartz K.J., During M.J., Freese A., Beal M.F. (1990). *Cerebral synthesis and release of kynurenic acid: an endogenous antagonist of excitatory amino acid receptors*. J. Neurosci. 10:2965-2973.
71. Tatter S.B., Galpern W.R., Hoogeveen A.T., Isacson O. (1995). *Effects of striatal excitotoxicity on huntingtin-like immunoreactivity*. Neuroreport 30:1125-1129.
72. Taylor C.P., Vartanian M.G. (1992). *Probenecid pretreatment enhances anticonvulsant action of NBQX in mice*. Eur. J. Pharmacol. 213:151-153.
73. Turski Wa, Gramsbergen JB, Traitler H, Schwarcz R. (1989). *Rat brain slices produce and liberate kynurenic acid upon exposure to L-kynurenine*. J. Neurochem. 52:1629-1636.
74. Vamos E., Pardutz A., Klivenyi P., Toldi J., Vecsei L. (2009). *The role of kynurenines in disorders of the central nervous system: possibilities for neuroprotection*. J. Neurol. Sci. 283:21-27.
75. Vecsei L., Beal M.F. (1991). *Comparative behavioral and neurochemical studies with striatal kainic acid- or quinolinic acid-lesioned rats*. Pharmacol Biochem. Behav. 39:473-478.
76. Vonsattel J.P. y DiFiglia M. (1998). *Huntington's disease*. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 57:369-384.
77. Vonsattel J.P., Myers R.H., Stevens T.J., et al. (1985). *Neuropathologic classification of Huntington's disease*. J Neuropatol. Exp. Neurol, 34:1237-1240.

78. Wang Y., Sawchuk R.J. (1995). *Zidovudine transport in the rabbit brain during intravenous and intracerebroventricular infusion*. J. Pharm. Sci. 84:871-876.
79. Wolf H. (1974). *The effect of hormones and vitamin B6 on urinary excretion of metabolites of the kynurenine pathway*. Scand J. Clin. Lab. Invest. Suppl. 136:1-186.
80. Wolfensberger M., Amsler U., Cuénod, M., Foster A.C., Whetsell W.O., Schwarcz R. (1983). *Identification of quinolinic acid in rat and human*. Neurosci. Lett. Brain Tissue. 41:247-252.
81. Yamamoto H., Murakami H., Horiguchi K., Egawa B. (1995). *Studies on cerebrospinal fluid kynurenic acid concentrations in epileptic children*. Brain Dev. 17:327-329.
82. Yu P., Mosbrook D.M., Tagle D.A. (1999). *Genomic organization and expression analysis of mouse kynurenine aminotransferase II, a possible factor in the pathophysiology of Huntington's disease*. Mamm. Genome 10:845-852.