



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS

**“La ausencia y ocupación farmacológica del receptor de
hidrocarburo de arilo aumenta los niveles del ácido kinurénico
confiriendo protección neuronal en el modelo bioquímico de la
enfermedad de Huntington”**

TESIS

Que presenta

M. en C. Lucia Gabriela García Lara

Para obtener el Grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE

Neurobiología Celular y Molecular

Director de la Tesis: José Segovia

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio 44 del departamento de Fisiología, Biofísica y Neurobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N., bajo la dirección del Dr. José Segovia y con la asesoría del Dr. Benjamín Florán Garduño, Dr. Jorge Pacheco Rosado, Dr. Daniel Martínez Fong y el Dr. Francisco García Sierra.

Durante la realización del presente trabajo el autor contó con el apoyo de la beca 243154 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt)

Índice

Índice de Figuras	1
Abreviaturas	3
Resumen	5
Abstract	6
1. Introducción	7
1.1 Enfermedad de Huntington	7
1.1.1 Sintomatología	8
1.1.2 Huntingtina	8
1.1.3 Alteraciones mitocondriales	9
1.1.4 Estrés oxidante	10
1.1.5 Neurotoxicidad	10
1.1.6 Modelos experimentales de la EH	11
1.2 Vía de las kinureninas	12
1.3 Receptor de glutamato tipo NMDA	14
1.4 Receptor de hidrocarburos de arilo	15
1.4.1 Ligandos exógenos	16
1.4.2 Ligandos endógenos	17
1.5 Relación entre la vía de las kinureninas y la enfermedad de Huntington.	18
2. Justificación	20
3. Hipótesis	21
4. Objetivo general	21
5. Objetivos particulares	21
6. Materiales y métodos	22
6.1 Ratones C57BL/6 nulos para el Ahr	22
6.2 Genotipificación	22
6.2.1 Extracción del DNA	22
6.2.2 Condiciones para la PCR	23
6.3 Lesión estereotóxica con QUIN para generar el modelo de excitotoxicidad.	24
6.4 Tratamiento farmacológico de los ratones.	24
6.5 Determinación del daño neuronal	24
6.5.1 Cuantificación de la conducta de giro.	24
6.6 Determinación del daño oxidante.	25
6.6.1 Cuantificación de la peroxidación de lípidos.	25
6.6.2 Cuantificación de la formación de especies reactivas de oxígeno.	25
6.7 Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)	26
6.7.1 Determinación de los metabolitos de la vía de las kinureninas	26
6.7.2 Determinación estriatal del contenido de GABA.....	26

6.8 Western blot	27
6.9 Actividad motora y conducta.....	28
6.9.1 Evaluación de la actividad motora.	28
6.9.2 Test de Rotarod.....	28
6.10 Análisis histológico.	29
6.10.1 Tinción de Nissl	29
6.10.2 Tinción de Fluoro-Jade B	29
6.10.3. Inmunofluorescencia	30
6.11 Análisis estadístico	30
6. Resultados	30
7. Discusión	49
8. Conclusiones	58
9. Perspectivas	59
10. Bibliografía	60
Artículo	

Índice de figuras

Figura 1	Vía metabólica de las kinureninas	13
Figura 2	Separación de la vía de las kinureninas en el cerebro.	14
Figura 3	Determinación de los metabolitos de la VK mediante HPLC.	31
Figura 4	Efecto de la ausencia del Ahr sobre la expresión de la enzima KAT II.	32
Figura 5	Efecto de la ausencia del Ahr sobre la conducta motora en el rotarod.	33
Figura 6	Efecto de la ausencia del Ahr sobre el daño oxidante inducido por la lesión estriatal con QUIN	34
Figura 7	Efecto de la ausencia del Ahr sobre la conducta de giro inducida por la lesión estriatal con QUIN.	34
Figura 8	Efecto de la lesión con QUIN sobre la expresión de KAT II.	35
Figura 9	Efecto de la ausencia del Ahr sobre el contenido de GABA estriatal después de la administración de QUIN.	36
Figura 10	Efecto de la lesión con QUIN sobre la expresión de la subunidad NR1 del NMDAr	37
Figura 11	Volumen de la lesión estriatal inducida por QUIN.	38
Figura 12	Determinación de KYNA mediante HPLC.	39
Figura 13	Efecto de la ocupación farmacológica del Ahr sobre la expresión de la enzima KAT II.	40
Figura 14	El tratamiento con resveratrol no afecta el peso de los grupos de ratones.	40
Figura 15	Efecto de la ocupación farmacológica del Ahr mediante el resveratrol sobre la conducta en la prueba del rotarod.	41
Figura 16	Efecto de la ocupación farmacológica del Ahr mediante el resveratrol sobre la conducta espontánea de los ratones silvestres en la prueba de campo abierto.	42
Figura 17	Efecto de la ocupación farmacológica del Ahr mediante el resveratrol sobre la conducta espontánea de los ratones <i>knock-out</i> en la prueba de campo abierto.	42
Figura 18	Efecto de la ocupación farmacológica del Ahr mediante el resveratrol sobre la conducta de giro.	43
Figura 19	Efecto de la ocupación farmacológica del Ahr mediante el resveratrol sobre el daño oxidante	44
Figura 20	Efecto de la ocupación farmacológica del Ahr mediante el resveratrol sobre el contenido de GABA.	45
Figura 21	Efecto de la ocupación farmacológica del Ahr mediante el resveratrol sobre la expresión de la enzima GAD ₆₇ .	46
Figura 22	Efecto de la ocupación farmacológica del Ahr mediante el resveratrol sobre la expresión de la enzima KAT II.	47
Figura 23	Efecto de la ocupación farmacológica del Ahr mediante el resveratrol sobre la degeneración neuronal inducida por la lesión con QUIN.	48
Figura 24	El pre-tratamiento con resveratrol inhibe la degeneración neuronal inducida por la excitotoxicidad del QUIN en los ratones silvestres.	48

Figura 25. Efecto de la ocupación farmacológica del Ahr mediante el resveratrol 49
sobre la astrogliosis inducida por la lesión con QUIN.

Abreviaturas

Abreviatura	Significado
α 7nACh	α 7 receptor nicotínico de acetilcolina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ahr	Receptor de hidrocarburos de arilo
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
AMPC	Adenosín monofosfato cíclico
ANOVA	Análisis de varianza
ATP	Adenosina trifosfato
ARNT	Translocador nuclear del Ahr
DCFH-DA	diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína
DCF	2',7'-diclorofluoresceína
EH	Enfermedad de Huntington
ERO	Especies reactivas de oxígeno
ES	Error estándar
FJB	Fluoro-Jade B
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GAD	Glutamato descarboxilasa
GPR35	Receptor acoplado a proteína G 35
HAH	Hidrocarburos aromáticos halogenados
htt	Huntingtina
3-HAO	3-hydroxi antranilato oxidasa
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
IDO	Indolamina 2-3 dioxigenasa
KAT	Kinurenina aminotransferasa
KMO	Kinurenina 3-monooxigenasa
KYNA	Ácido kinurénico
KYN	L- Kinurenina
NMDA	N-metil-D-aspartato
NMDAr	Receptor a NMDA
QPRT	Quinolínico-fosforibosil-transferasa
QUIN	Ácido quinólinico
PAH	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
PCB	Bifeniles policlorados
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PL	Peroxidación de lípidos

poli-Q	Poli-glutamina
Rpm	Revoluciones por minuto
Rsv	Resveratrol
SNC	Sistema Nervioso Central
TCDD	2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina
TDO	Triptófano 2,3-dioxigenasa
UV	Ultravioleta
VK	Vía de las kinureninas

Resumen

La L-kinurenina (Kyn) es un metabolito intermedio en el catabolismo del triptófano. La Kyn se convierte enzimáticamente por la kinurenina aminotransferasa (KAT) en ácido kinurénico (KYNA), el cual es un antagonista al sitio de glicina del receptor NMDA. Tanto la Kyn como el KYNA también son ligandos endógenos del receptor de hidrocarburos arilo (Ahr), un factor de transcripción que regula la expresión de un conjunto de genes. Interesantemente, los niveles de KYNA están reducidos en varias regiones cerebrales de pacientes de la enfermedad de Huntington (EH).

El presente trabajo utiliza como modelo un ratón *knock-out* para el gen Ahr y ratones silvestres de la misma edad para determinar el efecto de la ausencia de Ahr sobre la disponibilidad KYNA.

Encontramos que en los ratones *knock-out* hay un aumento en los niveles de KYNA en áreas específicas del cerebro asociadas con una mayor expresión de la KAT tipo II. Además estos ratones mostraron mejor desempeño motriz en la prueba del rotarod, indicando protección constitutiva del tejido estriatal. Por lo tanto, realizamos una lesión en el estriado con ácido quinolínico (QUIN), modelo bioquímico de EH, tanto en ratones de tipo silvestre como en los *knock-out*. Debido al nivel de KYNA en los ratones nulos para el gen Ahr hubo un efecto neuroprotector contra el insulto excitotóxico en comparación con los ratones silvestres.

A continuación, determinamos si la ocupación farmacológica del Ahr tenía efectos sobre los niveles de KYNA cerebral. Utilizamos como agonista a la toxina TCDD y al resveratrol como un antagonista competitivo del Ahr. Observamos que ambos agentes aumentaron los niveles de KYNA en el estriado de los ratones silvestres mientras que en los ratones nulos para el gen Ahr no hubo diferencias con respecto del control.

Por lo tanto, la ocupación farmacológica del Ahr promueve un aumento en los niveles de KYNA estriatales. Esto sugiere que la modulación de la actividad del Ahr podría ser neuroprotectora. En virtud de esto, inyectamos QUIN en el estriado de ambos genotipos previamente tratados con resveratrol o con su vehículo. La ocupación farmacológica del Ahr y por consiguiente el incremento en los niveles de KYNA en los ratones silvestres produce un efecto neuroprotector frente a la lesión excitotóxica en comparación con los ratones sin tratamiento. Mientras que en los ratones *knock-out* para el gen Ahr, con o sin tratamiento, no se presentaron diferencias. Esto indica que los efectos observados en los ratones silvestres con tratamiento se deben a la ocupación del Ahr y no a otros efectos secundarios del resveratrol.

En conclusión, tanto la ausencia como la ocupación farmacológica del Ahr aumentan los niveles del KYNA confiriendo protección neuronal en el modelo bioquímico de la enfermedad de Huntington.

Abstract

L-kynurenine (Kyn) is a key element of tryptophan metabolism; it is enzymatically converted by kynurenine aminotransferase (KAT) to kynurenic acid (KYNA), which acts as an antagonist to the NMDA receptor–glycine site. Kyn and KYNA are also endogenous ligands of the aryl hydrocarbon receptor (Ahr), a transcription factor that regulates the expression of a diverse set of genes. Interestingly, KYNA levels are reduced in several regions of the brain of Huntington’s disease (HD) patients.

The present work uses an Ahr-null mouse and age-matched wild-type mice to determine the effect of the absence of Ahr on KYNA availability.

First, we found that, in Ahr-null mice, there is an increase of KYNA levels in specific brain areas associated with higher expression of KAT II. Ahr-null mice also show improved motor performance in the rotarod test, indicating a constitutive protection of striatal tissue. Therefore, we induced an excitotoxic insult by intrastriatal administration of quinolinic acid (QUIN), a biochemical model of HD, in both Ahr-null and wild-type mice to evaluate the neurological damage as well as the oxidative stress caused by the lesion. Due to the high level of KYNA in Ahr-null mice there was a neuroprotective effect against the neurotoxic insult.

Next, we determine whether the pharmacologically induced occupancy of Ahr had effects on KYNA bioavailability. We used TCDD, a powerful Ahr agonist and resveratrol a competitive antagonist of the Ahr, to assess their effects on cerebral KYNA levels. We observed that both agents increased the striatal levels of KYNA. This result indicates that the occupancy of Ahr by either an agonist or an antagonist causes an increase of KYNA levels in the striata of mice. This strongly suggests that modulating Ahr activity could be neuroprotective. Therefore, we injected QUIN into the striatum of wild type and Ahr-null mice previously treated with resveratrol or vehicle. KYNA increased levels induced a neuroprotective effect against the excitotoxic insult in the wild type mice. In the Ahr-null mice there was no effect due to the resveratrol treatment.

Therefore, both the lack and the pharmacological occupancy of the Ahr increase KYNA levels and induce neuroprotection in a biochemical model of HD.

1. Introducción

1.1 Enfermedad de Huntington

La Enfermedad de Huntington (EH) es un trastorno hereditario, neurodegenerativo, incapacitante y progresivo. Afecta de igual manera a hombres y mujeres. La prevalencia es de 5 a 10 casos por cada 100,000 habitantes. Sin embargo, en países orientales y en la población de ascendencia africana la incidencia es menor [1].

En 1872, el médico George Huntington describió la enfermedad que ahora lleva su nombre. Sin embargo, no fue sino hasta 1983 cuando se identificó la alteración genética responsable de la EH en el cromosoma 4 [2]. Diez años después, se descubrió que el gen IT15 contiene una mutación caracterizada por una expansión inestable de repeticiones del triplete de nucleótidos CAG, el cual codifica al aminoácido glutamina (Q). Al producto de este gen se le denominó huntingtina (htt) [3]. Por lo tanto, la EH se hereda de forma autosómica dominante. Cada hijo de un portador tiene el 50% de probabilidad de heredar la enfermedad. A medida que el gen se transmite por la vía paterna, el número de repeticiones tiende a aumentar [4].

La severidad y la edad de inicio dependen del número repeticiones de los tripletes CAG; a mayor cantidad de repeticiones, el inicio es más temprano (Tabla 1). Por lo tanto, existen dos tipos de EH, la juvenil y la de inicio tardío [5]. La EH de inicio tardío es la más común y los síntomas se presentan entre los 35 y 50 años. Mientras que la de aparición temprana representa un 10% de los casos, se inicia antes de los 20 años y la rigidez se desarrolla desde el inicio [6].

Tabla 1. Relación de repetidos CAG y riesgo de aparición de la EH.

Número de repeticiones CAG	Clasificación	Resultado
Menos de 26	Normal	No se presenta la enfermedad.
27-35	Intermedio	El portador no desarrolla la enfermedad, pero la siguiente generación está en riesgo de presentarla.
36 a 60	Patológica	Desarrollo de la enfermedad de inicio tardío.
61 a 200	Patológica	Desarrollo de la enfermedad juvenil.

1.1.1 Sintomatología

La enfermedad presenta una sintomatología conductual y motriz ya que la degeneración neuronal altera el control motriz y diversos procesos cognoscitivos. Los cambios de comportamiento pueden ocurrir antes de los problemas motrices y pueden abarcar: irritabilidad, malhumor, impaciencia, paranoia, psicosis, comportamientos antisociales, demencia, depresión y procesamiento lingüístico disminuido [7, 8]. Cabe mencionar que no todos los pacientes sufren los mismos síntomas ni su intensidad es la misma.

La sintomatología motriz en la EH tiene dos fases. En la primera fase inician los movimientos coreiformes; los cuales son movimientos espasmódicos, involuntarios, rápidos y súbitos de los brazos, piernas, cara y tronco que producen dificultad al caminar, hablar o deglutir; marcha inestable y dificultades en las actividades motoras voluntarias. La segunda fase consiste en la incapacidad para generar movimiento o movimientos enlentecidos, rigidez y contracciones musculares sostenidas causando torceduras y posturas anormales. La condición de debilidad del paciente produce complicaciones como neumonía, problemas cardíacos o infecciones que eventualmente llevan a la muerte, la cual ocurre 15 a 20 años después del inicio de la enfermedad.

1.1.2 Huntingtina

La htt se encuentra en todos los tejidos del cuerpo, pero su mayor expresión es en el cerebro. Su función fisiológica no ha sido claramente definida; sin embargo, es importante

en el desarrollo embrionario, en la generación y expansión de células hematopoyéticas y en la supervivencia neuronal [9]. También está asociada a microtúbulos y vesículas sinápticas, por lo tanto, se sugiere un posible papel en el tráfico vesicular [10]. La repetición de los tripletes CAG en el gen causa un tracto de poli-glutaminas (poli-Q) en la proteína, por lo cual, ésta adquiere funciones diferentes, tales como: nuevas interacciones proteína-proteína y en consecuencia precipitación y agregación de un grupo de proteínas, el sistema del proteosoma es afectado, la actividad transcripcional es anormal y se incrementa la vulnerabilidad mitocondrial [11].

La muerte celular progresiva se presenta principalmente en el núcleo estriado conformado por el caudado, el putamen y el globo pálido [12, 13]. Las neuronas estriatales medianas espinosas GABAérgicas son las más afectadas y la atrofia causa la dilatación de los ventrículos laterales. La EH también afecta a otras regiones del cerebro, tales como: la sustancia negra, corteza cerebral, hipocampo [14], el tálamo y el núcleo subtalámico [15], y cerebelo [16].

La muerte neuronal es producto de mecanismos complementarios y secuenciales. En este proceso, suceden anomalías en la función mitocondrial por consiguiente el metabolismo energético se reduce y se genera el estrés oxidante, además también se presenta el fenómeno conocido como neurotoxicidad [17].

1.1.3 Alteraciones mitocondriales

La mitocondria es el organelo celular encargado de suministrar la mayor parte de la energía necesaria para la actividad celular. En la EH, la actividad de los complejos mitocondriales II y III disminuye un 55% mientras la actividad del complejo IV decae un 25%, en el caudado y en el putamen [18]. Además, se produce un aumento en las deleciones del ADN mitocondrial de los lóbulos temporal y frontal de la corteza, así como un aumento de marcadores del daño oxidante del ADN, en el caudado y en la corteza frontal [19].

1.1.4 Estrés oxidante

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son moléculas generadas en la mitocondria durante el transporte de electrones en la cadena de fosforilación oxidativa. Las ERO son altamente reactivas debido a que poseen electrones desapareados, por lo tanto pueden reaccionar con proteínas, lípidos de membrana y ácidos nucleicos, alterando su función. A estas alteraciones se les conoce como estrés oxidante. Nuestro grupo de trabajo demostró en un modelo transgénico de la EH, un incremento dependiente de la edad en la peroxidación de lípidos y en la formación de ERO [20, 21]. El estrés oxidante se incrementa por metales de transición, como el hierro y el cobre. En la EH se observa un aumento significativo en la concentración de hierro lo que probablemente contribuya a la selectividad de la pérdida neuronal. Además, se activa la enzima sintasa de óxido nítrico neuronal (nNOS) con la subsecuente producción de óxido nítrico (NO). Posteriormente, el NO reacciona con el anión superóxido (O_2^-) generando al potente radical peroxinitrito ($ONOO^-$). Éstos radicales libres contribuyen al aumento de la concentración de hierro libre.

1.1.5 Neurotoxicidad

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador en el sistema nervioso central y puede causar la muerte neuronal a través de un mecanismo conocido como excitotoxicidad. Las neuronas corticales envían sus axones a las neuronas estriatales liberando glutamato. Las neuronas del estriado presentan gran cantidad de receptores a glutamato tipo NMDA y AMPA. En la EH se incrementa la sensibilidad de las neuronas estriatales a la activación de sus receptores NMDA; es decir, incluso bajas concentraciones de glutamato pueden activarlos. Por otro lado, los radicales libres inhiben la captación del glutamato por parte de las células de la glía, aumentando su concentración extracelular [6].

1.1.6 Modelos experimentales de la EH

Con los modelos animales que recrean la EH se pueden estudiar los aspectos celulares, moleculares y conductuales en las diferentes etapas del desarrollo, así como también se pueden probar nuevos fármacos y terapias.

Antes de que se descubriera al gen responsable de la EH, los modelos utilizados se basaban en la administración intra-estriatal de agonistas del receptor de glutamato [22]. Los primeros modelos neurotóxicos fueron el ácido iboténico y el ácido kaínico. Posteriormente, el ácido quinolínico (QUIN), reemplazó a las primeras neurotoxinas debido a que es un mejor modelo [23], ya que provoca la muerte selectiva de las neuronas GABAérgicas, disminuye los niveles de ATP y aumenta las ERO así como el estrés oxidante [24]. Por otro lado, la administración periférica de toxinas mitocondriales como el malonato [25] y el ácido 3-nitropropiónico [26] también desencadenan los cambios celulares de la EH.

Los factores clave para el enfoque de los modelos transgénicos son los siguientes: el uso de un fragmento o del gen completo de la htt mutada; la longitud de los repetidos CAG incorporados en la construcción genética; el uso de una región codificante únicamente con los repetidos CAG o con uno o más codones CAA (que también codifican para glutamina); la expresión de la htt mutada en el locus endógeno de htt; el uso del ADNc o del ADN genómico con todos los intrones y las secuencias reguladoras; y el uso del promotor de la htt o el uso de otro promotor para dirigir la expresión de la proteína mutante [22].

Los organismos utilizados para estudiar a la EH son: gusanos (*Caenorhabditis elegans*), moscas de la fruta (*Drosophila melanogaster*), ratones, ratas, ovejas y más recientemente cerdos y monos [22].

Los ratones son los más utilizados para el estudio de la EH y aunque no desarrollan todos los cambios neurológicos de un paciente, desde 1996 cuando surge el primer modelo del ratón transgénico poli-Q, se ha avanzado ampliamente en el entendimiento de esta patología [27].

Los modelos animales de la EH que utilizan ratones se engloban en dos grandes grupos. El modelo transgénico de la EH tiene un fragmento o el gen completo de la htt mutada, insertada al azar dentro de su genoma, bajo el control de varios promotores que la expresan, además tienen su propia huntingtina silvestre. El modelo knock-in de la EH tiene un fragmento o el gen completo de la htt mutada insertado dentro del propio gen de la huntingtina. Por lo tanto, el promotor endógeno del ratón controla al gen insertado que expresa el tracto de la poli-Q expandida [17, 22] .

Los modelos de ratones transgénicos R6/1 y R6/2 expresan el primer exón de la htt humana; con 116 y 144 repetidos CAG, respectivamente. Ambos modelos se encuentran bajo el control del promotor humano htt [28].

1.2 Vía de las kinureninas

El triptófano es un aminoácido esencial. En tejidos periféricos, sólo el 1% del triptófano se convierte en serotonina y más del 95% se metaboliza a través de la vía de las kinureninas (VK) (Fig. 1) [29]. El 40 % de la Kyn se genera en el sistema nervioso central (SNC) mientras que el 60% se transporta a través de la barrera hematoencefálica por un transportador de aminoácidos neutros [30].

A partir de la Kyn, mediante la enzima kinurenina aminotransferasa (KAT), se sintetiza el ácido kinurénico (KYNA) en astrocitos y neuronas. Mientras que el QUIN, es sintetizado en la microglía. Una vez que se han sintetizado el KYNA y el QUIN se liberan al medio extracelular para modular a sus objetivos postsinápticos neuronales (Fig. 2). Aunque

existen transportadores para aniones orgánicos en el cerebro, tanto el KYNA como el QUIN no son removidos del espacio extracelular por mecanismos de recaptura. El eflujo del cerebro constituye el mayor mecanismo de depuración para ambos metabolitos [31].

El KYNA es un antagonista al sitio de glicina del receptor NMDA (NMDAr) [32]; por otro lado, también es un antagonista no competitivo de los receptores nicotínicos de acetilcolina ($\alpha 7nACh$) [33] por lo que reduce la señalización de acetilcolina, de dopamina en el estriado [34] y de glutamato en la corteza prefrontal [35]. Además, el KYNA es un ligando del receptor acoplado a proteína G, GPR35 [36]. La concentración del KYNA está en el rango nanomolar. El KYNA también posee propiedades antioxidantes debido a su función como eliminador y neutralizador de radicales libres como los hidroxilos y los aniones superóxidos [37].

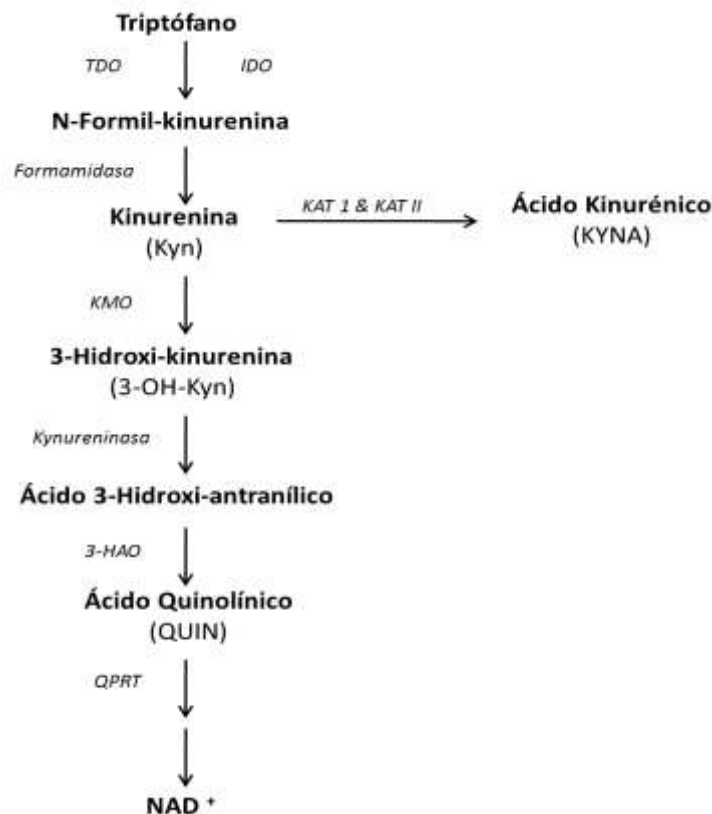


Figura 1: Vía metabólica de las kinureninas. IDO: Indolamina 2-3 dioxigenasa, TDO: Triptófano 2,3-dioxigenasa, KMO: Kinurenina 3-monooxigenasa, KAT: Kinurenina aminotransferasa 3-HAO: 3-hidroxi antranilato oxidasa, QPRT: Quinolínico-fosforibosil-transferasa.

El QUIN es un agonista de los NMDAR. Su concentración está en el rango nanomolar (50-100 nM) o en concentraciones micromolares bajas [38]. El QUIN provoca la estimulación de la liberación del glutamato y asimismo inhibe la re-captura del glutamato por parte de los astrocitos [39], la generación de intermediarios reactivos de oxígeno [40], la peroxidación de lípidos [41] y el agotamiento de antioxidantes.

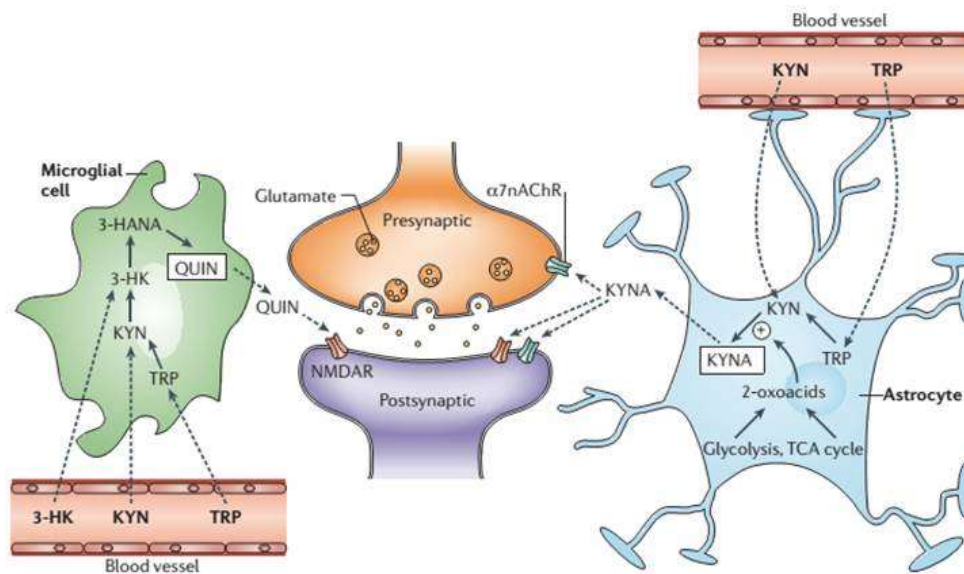


Figura 2. Separación de la vía de las kinurenas en el cerebro. El metabolismo de la VK es determinado por el triptófano (TRP), la kinurena (KYN) o la 3-hidrokinurena (3-HK) que atraviesan la barrera hematoencefálica o por los metabolitos que son sintetizados en el SNC. 3 HANA: ácido 3 hidroxiantranílico; α7nAChR, α7 receptor nicotínico de acetilcolina; NMDAR, receptor a NMDA; TCA: ácido tricarbóxico. Tomado de [42].

1.3 Receptores de glutamato tipo NMDA

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador del SNC. Las acciones fisiológicas del glutamato están mediadas por la activación de sus receptores. Estos se han dividido en dos grupos de acuerdo con su estructura y el sistema de traducción empleado: los receptores ionotrópicos (iGluR) y los receptores metabotrópicos (mGluR).

Los iGluR están implicados en la neurotransmisión rápida en el SNC. Están formados por 4 subunidades que constituyen un canal catiónico dependiente del ligando que permite el paso selectivo de iones sodio o calcio, produciendo una despolarización de la neurona. Se

han subdividido, según sus propiedades electrofisiológicas y farmacológicas, en función del agonista que los activa: receptores NMDA (ácido N-metil-D-aspartato), receptores AMPA (ácido α - amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico) y receptores de kainato.

En condiciones de reposo, el NMDAR está bloqueado por Mg^{2+} de una manera dependiente de voltaje. Además, el canal requiere de glicina para activarse eficientemente; asimismo, es regulado por poliaminas y Zn^{2+} . Los NMDAR están formados por las subunidades NR1, NR2A-D, NR3-B; por lo menos, una de las subunidades presentes en el receptor debe ser la subunidad NR1 para que el receptor sea funcional [43].

Cuando hay una excesiva liberación de glutamato se induce la muerte neuronal por la sobreactivación de sus receptores, principalmente de tipo NMDA; a este proceso se le conoce como excitotoxicidad [44]. La sobreactivación de los iGluR produce una elevación de Ca^{2+} intracelular que promueve la peroxidación de lípidos (PL) de la membrana citoplasmática, del retículo endoplasmático y de la mitocondria. El aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} también desencadena la activación de vías de señalización intracelular relacionadas con la muerte celular apoptótica como son: la activación de diferentes enzimas dependientes de Ca^{2+} (proteasas, nucleasas y fosfolipasas).

1.4 Receptor de hidrocarburos de arilo

El receptor de hidrocarburos de arilo (Ahr) es un factor de transcripción que pertenece a la familia de proteínas altamente conservadas bHLH (hélice-bucle-hélice) / PAS (Per-ARNT-Sim). El Ahr tiene funciones importantes en el desarrollo cardíaco, la proliferación celular, la homeostasis inmune, respuesta inflamatoria, ritmicidad circadiana y el metabolismo de la glucosa. Tanto el Ahr como su translocador nuclear (ARNT) se encuentran en el SNC, principalmente en el estriado, bulbo olfatorio, hipotálamo, hipocampo, corteza, cerebelo y sustancia negra [45].

Después de la unión del ligando, el Ahr se transloca al núcleo, donde se dimeriza con el ARNT y se une a elementos de respuesta a xenobióticos (XRE) o dioxinas (DRE) en el ADN [46]. Los mecanismos por los cuales los ligandos del Ahr, tanto exógenos como endógenos, afectan los procesos celulares son poco conocidos, pero parecen implicar múltiples interacciones entre Ahr y otras vías de señalización.

El Ahr regula genes implicados en el metabolismo de xenobióticos tales como: el citocromo P450 (CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1), la glutatión S-transferasa (GST) y la UDP glucuronil transferasa (UGT).

1.4.1 Ligandos exógenos

Los ligandos exógenos del Ahr son moléculas de tipo hidrofóbico como los hidrocarburos aromáticos halogenados (HAHs), los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) y los bifeniles policlorados (PCBs) los cuales presentan potentes efectos tóxicos y cancerígenos.

Toxina 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD)

El TCDD es el ligando mejor estudiado del Ahr [47]. Es un contaminante ambiental muy potente que produce efectos biológicos adversos, incluyendo carcinogénesis, toxicidad reproductiva [48], disfunción inmune [49], hepatotoxicidad [50] y teratogénesis. La constante de disociación (kD) del TCDD está en el rango picomolar. El tratamiento oral de TCDD tiene efectos en el cerebro ya que se ha reportado que en la rata dicho tratamiento induce la expresión de su gen blanco CYP1A1 en el caudado-putamen, cerebelo, corteza e hipocampo [45].

Resveratrol (Rsv)

El Rsv es una fitoalexina natural producida por las algunas plantas como respuesta al daño o la infección por hongos. Sin embargo, el Rsv también actúa como antagonista competitivo del Ahr. Promueve la translocación del complejo Ahr-Rsv al núcleo y su unión a los sitios DRE pero la trans-activación génica no se lleva a cabo [51]. El Rsv se transporta

rápidamente en la sangre, entre 10 y 120 minutos después de su administración intraperitoneal a ratas y gerbos [52]. Debido a su alta solubilidad lipídica, el resveratrol puede depositarse en el tejido adiposo y otros tejidos con alto contenido de lípidos, tales como el SNC [53]. Se ha demostrado que el Rsv atraviesa la barrera hematoencefálica y se incorpora en el tejido cerebral de los gerbos [52].

El Rsv tiene las propiedades requeridas de potencia y no toxicidad para justificar las pruebas clínicas como un posible agente profiláctico contra la patología inducida por el Ahr [51]. Además, ya se ha reportado un efecto de neuro-protección en algunos desórdenes neurológicos, como la EH [54]. El tratamiento con resveratrol abate el daño cognitivo y motriz inducido por el ácido 3-nitropropionico [55] y protege del daño causado inducido por el ácido kainico [56]. Por otro lado, la activación de Sir2, proteína homóloga de la sirtuina 1, a través del tratamiento con resveratrol, rescata el fenotipo de disfunción neuronal inducido por el tracto de poli-Q en el modelo transgénico de *C. elegans* y en el cultivo neuronal derivado de los ratones knock-in HdhQ111 [57].

1.4.2 Ligandos endógenos

KYNA

En el 2010, se identificó al KYNA, en células de cáncer de mama (MCF-7), como un ligando endógeno del Ahr capaz de activar los genes blanco que regula el Ahr, como a la interleucina 6. En una línea celular humana transfectada con el DRE, se reportó que la incubación con KYNA produce el 25 % del efecto máximo (EC_{25}) de 104 nM, mientras que en una línea celular de ratón, la EC_{25} fue de 10 μ M [58].

Kyn

En el 2011, se realizó un análisis de microarreglo sobre células de glioma tratadas con Kyn revelando una amplia inducción de los genes responsivos al Ahr. Asimismo, hay un decremento en la localización citoplasmática de la Kyn y un aumento en la acumulación

nuclear, dicho patrón es muy similar al inducido por el TCDD. Así pues, hay una inducción en la actividad de la luciferasa como gen reportero unido al DRE, dando una respuesta que produce el 50% del efecto máximo (EC_{50}) de 36.6 μ M [59].

1.5 Relación entre la vía de las kinureninas y la enfermedad de Huntington.

La administración de QUIN en el estriado reproduce algunas de las alteraciones bioquímicas de la EH, tales como: muerte de las neuronas medianas espinosas, disminución de los niveles del neurotransmisor GABA, aumento de Ca^{2+} citosólico, estrés oxidante y agotamiento de ATP [23, 60, 61]. Por otro lado, el KYNA se comporta como un agente neuroprotector endógeno capaz de prevenir la pérdida neuronal después de un insulto excitotóxico.

En modelos experimentales de la EH se ha mostrado que el incremento en los niveles de KYNA, protegen del daño inducido por QUIN [62]. Así pues, el co-tratamiento de Kyn y probenecid, inhibidor del transporte de KYNA del líquido extracelular, incrementa los niveles de KYNA por lo tanto bloquea los efectos de la lesión con QUIN en la sustancia negra [63, 64] y en el estriado [65].

Se ha reportado la alteración en el metabolismo de las kinureninas en la EH [66]. La activación de la microglía regula positivamente la VK potenciando la liberación de 3OH-Kyn (generador de radicales libres) y de QUIN, los cuales generan la muerte neuronal por una combinación de producción de ERO, estrés oxidante y activación del NMDAr. El aumento de QUIN y de 3OH-Kyn está reportado en pacientes [67] así como en diferentes modelos animales de la EH [68, 69]. Además, la actividad de la enzima 3-hidroxiantranilato oxidasa (enzima responsable de la síntesis del QUIN, Fig. 1.) está aumentada en los pacientes con EH [70].

Por otro lado, en la EH hay un menor nivel de KYNA en la corteza, estriado y líquido cefalorraquídeo. Además, la actividad de la enzima kinurenina aminotransferasa (KAT, enzima limitante de la síntesis de KYNA, Fig. 1) está disminuida en el estriado de los pacientes con EH [71-73]. Por lo tanto, existe un desbalance entre los metabolitos neuroactivos que puede resultar en mayor daño oxidante.

En la EH, la transmisión glutamatérgica está sobreactivada como consecuencia de la mutación en la *htt*, lo que origina una mayor excitabilidad y neurotoxicidad mediada por el NMDAr [74-77]. La subpoblación de neuronas medianas espinosas del estriado es hipersensible al glutamato liberado por las aferentes de la corteza y del tálamo debido al aumento de los receptores ionotrópicos post-sinápticos (NMDA, AMPA, Kainato) [78]. Además hay una reducción en la recaptura del glutamato debido a la disminución del transportador de glutamato, GLT1 [79]. Siguiendo esta línea de razonamiento, el QUIN induce la liberación de glutamato y la inhibición de su re-captura; por lo tanto, hay una sobre-estimulación del sistema glutamatérgico [39].

La concentración de KYNA en el líquido cefalorraquídeo y en el cerebro está en el rango de 10 a 150 nM. Pero, la afinidad de KYNA por el sitio de glicina del NMDAr es aproximadamente de 10 a 20 μ M [80]. Por lo tanto, otros blancos participan en las acciones fisiológicas del KYNA cuando sus niveles aumentan debido a la ausencia del Ahr. Las terminales de los axones glutamatérgicos de la corteza en humanos y del estriado en rata expresan los receptores α 7nAChR, los cuales regulan la liberación de glutamato de la neurona. Por lo tanto, el KYNA (antagonista no competitivo α 7nACh) está implicado en la supresión de la liberación presináptica de glutamato [35]. De esta manera, se ha reportado que la inyección de KYNA en el estriado de rata inhibe la liberación presináptica de glutamato sin modificar la función de los receptores iGluR o mGluR [81]. Además, el KYNA activa a los receptores GPR35 expresados en los astrocitos, por lo tanto hay una disminución en los niveles de AMPc y de calcio intracelular lo cual conlleva a una

reducción de la liberación de aminoácidos gliales y de mediadores inflamatorios de los leucocitos [82].

Se pensaba que la presencia de KAT II estaba restringida a los astrocitos ya que no se había encontrado una señal específica en las neuronas o en la microglía [83]. Sin embargo, recientemente, se observó que la enzima KAT II está localizada tanto en astrocitos como en neuronas del cerebro de ratón adulto [84]. Por lo tanto, tanto ligandos exógenos como el TCDD y el Rsv como los ligandos endógenos como la Kyn y la KYNA pueden unirse al Ahr tanto en los astrocitos como en las neuronas.

Por lo antes mencionado, es posible modular la función de las sinapsis excitadoras al aumentar o disminuir la disponibilidad de KYNA. Si se incrementarán los niveles de KYNA se podría obtener un efecto neuroprotector ya que incluso un leve aumento en la concentración de éste metabolito en el cerebro reduce la transmisión excitadora [80].

2. Justificación

Se ha reportado una disminución de los niveles de KYNA en los cerebros de pacientes de la EH, una enfermedad que aún no tiene tratamientos efectivos. La utilización de un modelo murino con mutación nula para el Ahr nos permitirá evaluar si existe una mayor disponibilidad de kinurena y por consiguiente de KYNA en estos animales. Dado que a la fecha no se ha estudiado si existe neuroprotección contra el insulto farmacológico del QUIN en los ratones con mutación nula para el Ahr. Este estudio nos permitirá entender mejor los procesos de daño en el modelo experimental de la EH.

3. Hipótesis

La ausencia y/o el bloqueo del Ahr aumentará la biodisponibilidad de KYN, por lo que se incrementará la síntesis de KYNA, lo cual tendrá un efecto neuroprotector ante insultos excitotóxicos.

4. Objetivo general

Determinar la relación que existe entre el receptor de hidrocarburos de arilo, la biodisponibilidad de los metabolitos del triptófano; KYN, KYNA y la protección neuronal.

5. Objetivos particulares

Determinar los niveles de metabolitos de la vía de las kinureninas en el ratón con mutación nula para el receptor de hidrocarburos de arilo y evaluar la conducta motriz.

Evaluar el efecto de la lesión estriatal con ácido quinolínico en ratones silvestres y nulos para el receptor de hidrocarburos de arilo.

Evaluar farmacológicamente la ocupación del Ahr y su efecto sobre los niveles del ácido kinurénico.

Evaluar el efecto de la lesión con ácido quinolínico sobre los ratones silvestres y *knock-out* con el tratamiento farmacológico del antagonista del Ahr.

6. Materiales y métodos

6.1 Ratones C57BL/6 nulos para el Ahr

La generación de los ratones C57BL/6 nulos para el Ahr fueron generados mediante la interrupción en el exón 1 del gen de Ahr [85] y generosamente fueron donados por el Dr. Frank J. González (National Cancer Institute, Bethesda, MD). Todos los estudios fueron llevados a cabo bajo la Regulación Mexicana del Cuidado y Mantenimiento Animal (NOM-062-ZOO-1999, 2001) y la regulación interna del Cinvestav. Los ratones se mantuvieron en el cuarto de experimentación del laboratorio. El cuarto de experimentación cuenta con un sistema de filtración del aire, temperatura ambiental ($28 \pm 2^\circ\text{C}$) y humedad relativa ($50 \pm 10\%$) controladas y ciclos de luz-oscuridad de 12:12 horas, con libre acceso de comida y agua. El manejo de todo el equipo y de los animales se ha realizado en campana de flujo laminar, lo que garantiza un adecuado control sanitario.

6.2 Genotipificación

6.2.1 Extracción del ADN

Después de cumplir 4 semanas de edad, se tomó una biopsia de la cola de cada ratón, aproximadamente de 1 cm de longitud. Para la digestión del tejido y liberación del ADN, se agregaron 500 μL de buffer de lisis (tris-base 1M a un pH de 8.5, EDTA 0.5 M, SDS 20%, NaCl 1M) y 1.25 μL de proteinasa K (20 mg/mL). Se colocaron en un agitador a una temperatura de 50°C durante toda la noche. Los tubos se centrifugaron a 13 000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se tomó el sobrenadante y se agregaron a otro tubo con 500 μL de isopropanol, se mezclaron vigorosamente hasta observar el ADN precipitado. Para lavar el ADN, se transfirió a otro tubo con 500 μL de alcohol al 70% y se mezcló vigorosamente. Se eliminó el exceso de alcohol por decantación y se dejó secar al aire durante 5 minutos. Para disolver el ADN, se le adicionó el agua inyectable necesaria. Se realizó el corrimiento electroforético en un gel de agarosa al 1% para evaluar la

integridad del ADN. La cantidad y pureza del ADN se determinó mediante un espectrofotómetro.

6.2.2 Condiciones para la PCR

La identificación del genotipo se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final [86]. Los oligonucleótidos que se utilizaron para la amplificación del gen del receptor de hidrocarburos de arilo fueron (5' GGC TAG CGT GCG GGT TTC TC) y (5' CTA GAA CGG CAC TAG GTA GGT CAG). La mezcla de reacción tuvo un volumen final de 25 µL y estuvo constituida por:

Receptor de hidrocarburos arilo	
	Volumen para 1 reacción (µL)
Buffer 10x	7.6
Mg(OAc) ₂ 25 mM	1.5
dNTP's 10 mM	2.0
Oligo F 50 µM	1.0
Oligo R 50 µM	1.0
Taq ADN pol	0.3
H ₂ O inyectable	10.6
ADN	1.0
Vol. Total	25

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes:

Receptor de hidrocarburos arilo		
Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	94°C	3 min
30	94°C	1 min
	60°C	1 min
	72°C	2.30 min
1	72°C	10 min

Los productos obtenidos por PCR se analizaron en un gel de agarosa al 3%, el cual es teñido con 2 μ L de una solución de bromuro de etidio (10 mg/mL) y se observaron con luz UV.

6.3 Lesión estereotáxica con QUIN para generar el modelo de excitotoxicidad

Los ratones fueron anestesiados con pentobarbital sódico a una dosis de 55 mg/kg, (i.p). Los animales fueron colocados en un aparato estereotáxico y se les inyectó 1 μ L de la excitotoxina QUIN (30 nmol/ μ L) en el cuerpo estriado del hemisferio derecho. Las coordenadas fueron las siguientes: 0.6 mm anterior, -2.2 mm lateral a bregma y -3 mm ventral a la duramadre con respecto al atlas del cerebro de ratón [87].

6.4 Tratamiento farmacológico de los ratones

El TCDD se diluyó en aceite vegetal para que la dosis entregada tuviera un volumen de 100 μ L. Ratones machos de 10 semanas de edad fueron tratados con una sola dosis de 250 μ M TCDD/kg o con aceite vegetal mediante sonda gástrica. Siete días después de la administración de TCDD los ratones fueron sacrificados. El tratamiento con Rsv se realizó de acuerdo al protocolo previamente descrito [56]. El Rsv fue disuelto en 40% de etanol y después se diluyó con agua hasta que la concentración final de etanol fuera de 2.5% vol/vol. La dosis de Rsv fue de 25 mg/Kg de peso/día. Ratones machos de 4 semanas de edad recibieron la mezcla de Rsv o el vehículo en el agua de beber durante 42 días. Grupos independientes de ratones machos de 7 semanas de edad recibieron Rsv o vehículo durante 21 días. Tres días antes de que terminara este tratamiento los ratones fueron inyectados con QUIN.

6.5 Determinación del daño neuronal

6.5.1 Cuantificación de la conducta de giro.

La medición del daño neuronal inducido por QUIN se realizó mediante la cuantificación de la conducta de giro. Después de tres días de la lesión intraestriatal con QUIN se administró de forma intraperitoneal R(-)-apomorfina (1 mg/kg). Cada ratón fue colocado en una caja

de policarbonato (25X40X20 cm) y se registró el número de giros ipsilaterales durante 30 minutos.

6.6 Determinación del daño oxidante

La medición del estado oxidante, se realizó mediante la cuantificación de la peroxidación de lípidos (PL) y la formación de las especies reactivas de oxígeno (ERO), para lo cual se obtuvo el cuerpo estriado de ambos hemisferios 2 horas después de la inyección con QUIN.

6.6.1 Cuantificación de la peroxidación de lípidos.

El cuerpo estriado del hemisferio derecho se homogenizó en 2.2 mL de solución salina. A un mL de dicho homogenado se le adicionaron 4 mL de una solución cloroformo-metanol (2:1, v:v). Posteriormente, la mezcla fue refrigerada durante 30 minutos en oscuridad para permitir la separación de las fases. La fase acuosa (fase superior) se aspiró con una bomba de vacío. Finalmente, 2 mL de la fase orgánica (clorofórmica) se transfirió a una celda de cuarzo y se agregaron 200 μ L de metanol. La muestra se analizó usando un espectrofotómetro de fluorescencia (Perkin Elmer LS50B) a una longitud de onda de 370 nm de excitación y 430 nm de emisión. La cuantificación de proteínas se realizó por el método de ácido bicinconínico (Pierce) en placas de ELISA con una lectura de absorción de 540 nm. Los resultados se reportaron como unidades relativas de fluorescencia/ mg de proteína [20].

6.6.2 Cuantificación de la formación de especies reactivas de oxígeno.

La formación de ERO se evaluó utilizando diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA), el cual es oxidado por acción de las ROS para formar 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), la cual es capaz de generar fluorescencia. Cinco μ L del homogenado utilizado en la PL fueron mezclados con 45 μ L de solución amortiguadora TRIS-HEPES (18:1) (TRIS pH 7.4: solución HEPES conteniendo NaCl 120 mM, KCl 2.5 mM NaH₂PO₄ mM, MgCl₂ 0.1 mM, NaHCO₃ 5mM, glucosa 6.0 mM, CaCl₂ 1.0 mM, HEPES 10.0 mM). A partir de esta mezcla

se tomaron 5 μ L los cuales se incubaron con 145 μ L de solución amortiguadora TRIS-HEPES (18:1) y 50 μ L de DCF-DA 50 μ M a 37°C durante 1 hora con agitación constante en una placa de 96 pozos. Posteriormente, se realizó la determinación de la fluorescencia de cada muestra en un multi-lector de placa FLx800 (Biotek instruments, Inc.), a una longitud de onda de 488 nm de excitación y 525 nm de emisión. Los valores obtenidos fueron calculados a partir de la interpolación en una curva de calibración de diclorofluoresceína DCF 100 nM. Los valores de proteínas de cada muestra se utilizaron para expresar los resultados como moles de DCF /mg proteína/min.

6.7 Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

6.7.1 Determinación de los metabolitos de la vía de las kinureninas.

Los animales se sacrificaron por decapitación y se realizó la extracción del tejido estriatal. El contenido estriatal de los analitos se determinó por HPLC (Sistema Agilent serie 1100) utilizando una columna de fase reversa Alltech-adsorbosphere, OPA-HS, tamaño de partículas de 5 μ m, 100 mm largo X 4.6 mm de diámetro interno. El cuerpo estriado se homogenizó en 250 μ L de agua miliQ, los homogenados se centrifugaron a 14,000 rpm durante 15 minutos a 4°C; 20 μ L del sobrenadante obtenido se inyectaron al sistema para su análisis. El KYNA se analizó por medio de la detección por fluorescencia a 246 nm de excitación y 400 nm de emisión. Por medio de la detección de UV-visible a 238 nm se analizaron la DL-kyn, 3 OH-kyn y el QUIN. Los cromatogramas se integraron y procesaron utilizando el software ChemStation de Agilent, Rev. 10.02. Las condiciones para el análisis fueron: flujo: 1.1 mL/min; tiempo: 10 minutos; solventes: agua: 0%, metanol: 2%, acetonitrilo: 0%, buffer de acetatos 10mM: 98%.

6.7.2 Determinación estriatal del contenido de GABA

El contenido de GABA estriatal se llevó a cabo en HPLC con detección de fluorescencia (excitación 232 nm y emisión 455 nm) seguido de una derivatización con una precolumna ofaldehido-mercaptoetanol y separada con una columna OPA HS (5mm de partículas, 100

X 4.6 mm; Grace). Para evitar la formación de GABA post-mortem, a cada ratón se le inyectó con el inhibidor de GAD, el ácido 3-mercapto propiónico (0.25 mmol/kg) dos minutos antes del sacrificio. El estriado se obtuvo cuatro días después de la inyección de QUIN y las muestras se mantuvieron a -70°C hasta su análisis. El estriado se sometió a sonicación en 40 volúmenes de 85% de metanol, grado HPLC. El homogenado se centrifugó a 10,000 g durante 15 minutos a 4°C y se obtuvo el sobrenadante. La fase móvil consistió en un buffer de acetato de sodio 50 mM (pH 5.9)/ tetrahidrofurano grado HPLC 1.5% con un gradiente lineal con metanol. El tiempo de retención es de aproximadamente 5.2 minutos. Los cromatogramas se integraron y procesaron con el programa Chemstation 10.02 con la curva de calibración. Este método es preciso y reproducible (CV < 10%), con una recuperación del 98–100%.

6.8 Western blot

La extracción de proteínas se realizó siguiendo el manual del Kit comercial TriPure. La cuantificación de proteínas se realizó por el método de ácido bicinonínico (Pierce) en placas de ELISA con una lectura de absorción de 540 nm. Se tomó un volumen correspondiente a 50 µg de proteína de cada muestra y se mezcló con un volumen igual de solución amortiguadora (4% SDS, 20% glicerol, 2% 2-mercaptoetanol, 0.004% azul de bromofenol, 0.125 M Tris-Hcl, pH 6.8). La desnaturalización de las proteínas se realizó mediante un baño de agua en ebullición durante 5 minutos. La electroforesis se llevó a cabo a 100 V, durante 2 horas. La transferencia se realizó utilizando membranas de nitrocelulosa con el sistema de electro-transferencia semiseco durante 1 hora a 100 mA. El bloqueo de proteínas inespecíficas se realizó con una mezcla de leche descremada al 5% disuelta en TBS 1X (0.2 M NaCl, 0.02 M Tris, pH 7.6)-Tween 0.05%, incubándose por 1 hora a temperatura ambiente. La inmunodetección de las proteínas se realizó incubando por separado con los anticuerpos primarios (Tabla 2) durante toda la noche a 4°C con agitación constante. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con TBS-Tween al 0.05% y la membrana se incubó con el anticuerpo secundario (Tabla 2) durante 1 hora a temperatura ambiente, con agitación constante.

Tabla 2. Anticuerpos primarios y secundarios

Anticuerpo primario		Anticuerpo secundario	
KAT II (1:200)	Santa Cruz, sc-67376	peroxidasa anti-conejo (1:4000)	Invitrogen, 656120
GAD ₆₇ (1:5000)	Millipore, MAB5406	peroxidasa anti-ratón (1:3000)	Life technologies, 626520
NR 1 (1:500)	Santa Cruz, sc-1 467	peroxidasa anti-cabra (1:6000)	Invitrogen, 811620
Actina (1:5000)	Donado por el Dr. J.M. Hernández (Cinvestav)	peroxidasa anti-ratón (1:5000)	Life technologies, 626520

La detección de las proteínas se realizó con un reactivo que genera quimioluminiscencia y se utilizó una película Kodak. Las imágenes fueron capturadas usando un instrumento BIODOC-it System (UVP). Después de realizar el análisis densitométrico, los resultados (normalizados con la expresión de actina) fueron expresados como unidades arbitrarias de densidad óptica (DO).

6.9 Actividad motora y conducta

6.9.1 Evaluación de la actividad motora

La actividad motora fue registrada por medio de un sistema automatizado (Electronic Motility Meter 40Fc; Motron Products). La sesión tuvo una duración de 5 minutos. Cada ratón se introdujo en una caja de acrílico transparente con las siguientes medidas: 21 cm de ancho x 33 cm de largo y 29 cm de altura [88].

6.9.2 Test de Rotarod

La coordinación y equilibrio motor fueron evaluados mediante el análisis por el rotarod [88]. Los ratones fueron entrenados tres veces durante 3 días consecutivos a diferentes velocidades constantes (10, 20 y 30 rpm). La prueba se realizó al cuarto día, los ratones se sometieron a una rampa de velocidad de 2 a 40 rpm durante 5 minutos, los ratones tuvieron un descanso mayor a una hora para su recuperación y se realizó nuevamente la

prueba. La latencia de caerse del rotarod y la velocidad a la cual cayeron fue registrada para cada ratón y el promedio de las dos pruebas fue utilizado para el análisis estadístico.

6.10 Análisis histológico

Los ratones fueron anestesiados con pentobarbital y se perfundieron transcárdialmente con solución salina al 0.9% seguido de una solución de paraformaldehído al 0.4% en buffer de fosfatos al 0.1M, pH de 7.4. Se obtuvieron los cerebros y se colocaron en la misma solución de fijación. Se realizaron cortes coronales de 30 μm de grosor en un vibratomo.

6.10.1 Tinción de Nissl

Los cortes fueron teñidos con violeta de cresilo. El volumen de la lesión fue calculado por la observación de todos los cortes en los cuales el daño neuronal estuviera presente, área pálida causada por la pérdida de los cuerpos celulares. El área fue medida utilizando el programa Image J y el volumen total de la lesión se obtuvo de la suma de las áreas multiplicada por el ancho de los cortes (30 μm).

6.10.2 Tinción de Fluoro-Jade B

La tinción con fluoro-jade B se utiliza para determinar la degeneración neuronal. Los cortes fueron montados en porta-objetos y secados durante una noche. Las laminillas se calentaron a 50 °C durante 10 minutos antes de ser sumergidas en etanol al 70% durante 2 minutos, después se colocaron en agua destilada durante 2 minutos más. Las laminillas se incubaron en una solución de permanganato de potasio al 0.06% durante 15 minutos y después se lavaron dos veces en agua destilada durante 2 minutos. Finalmente, las laminillas se sumergieron en una solución de ácido acético al 0.1 % con Fluoro-Jade B al 0.0004% durante 30 minutos y se lavaron nuevamente en agua destilada durante 2 minutos, se secaron durante 1 hora en la oscuridad, y se sumergieron en xileno durante 10 minutos y se les colocó el cubre-objetos. La observación de las células positivas a Fluoro-Jade B se realizó usando la microscopia de fluorescencia (Olympus Bx51).

6.10.3 Inmunofluorescencia

La astrogliosis se determinó mediante la inmunofluorescencia para la proteína ácida fibrilar glial (GFAP). Los cortes coronales fueron incubados a temperatura ambiente durante 30 minutos en PBS 1x/ Triton X-100 0.2% después fueron bloqueados durante 1 hora en una solución de PBS 1x/BSA 1%. Los cortes se incubaron con el anticuerpo primario GFAP (1: 750, DAKO, Z0334) durante toda la noche, a temperatura ambiente, y después se incubaron con el anticuerpo secundario (FITC anti-conejo IgG) durante 2 horas. Los cortes se analizaron mediante microscopia de fluorescencia confocal (Leica TCS-SPE) y empleando el software Leica LAS AF lite (Leica Microsystems).

6.11 Análisis estadístico.

Todos los resultados están expresados como el promedio \pm el error estándar (ES). Los datos obtenidos fueron analizados con la prueba estadística de t de student ó con la prueba de ANOVA de dos factores seguida por la prueba post hoc de Tukey. El valor de P <0.05 fue considerado estadísticamente significativo. Los análisis se realizaron utilizando el software Prism 6.0 (GraphPad).

7. Resultados

Objetivo 1. Determinar los niveles de metabolitos de la vía de las kinureninas en el ratón con mutación nula para el receptor de hidrocarburos arilo y evaluar la conducta motriz.

Con el fin de analizar el efecto de la ausencia del Ahr sobre los metabolitos de la VK se evaluó a la Kyn, la 3H-Kyn, el QUIN y el KYNA en el estriado, hipocampo y corteza tanto de ratones intactos silvestres como de ratones *knock-out*. No se encontraron diferencias en los niveles de Kyn, 3H-Kyn y de QUIN entre las dos genotipos en las estructuras analizadas. Sin embargo, hay mayor nivel de KYNA tanto en la corteza como en el estriado de los

ratones nulos para el gen *Ahr* en comparación con los ratones silvestres. En el hipocampo no hubo diferencias significativas (Fig. 3).

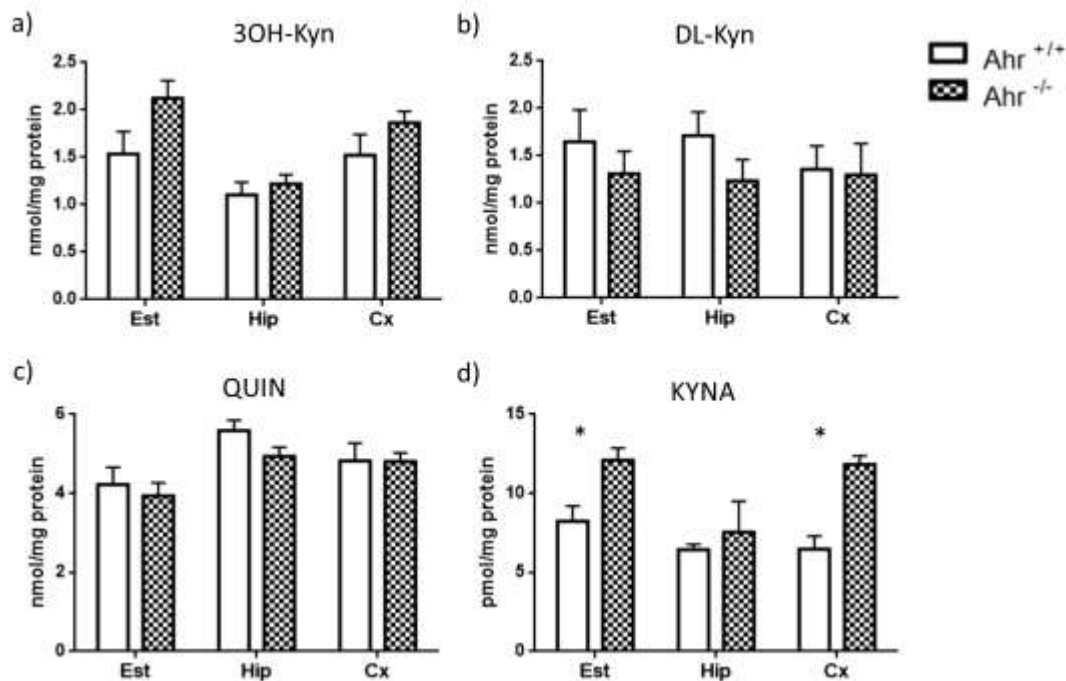


Figura 3. Determinación de los metabolitos de la VK mediante HPLC. Los niveles del KYNA están aumentados significativamente en el estriado (Est) y corteza (Cx) de los ratones *knock-out* (*Ahr*^{-/-}) en comparación con los ratones silvestres (*Ahr*^{+/+}). No hubo diferencias en el hipocampo (Hip) en ninguno de los metabolitos de ambos genotipos. Cada barra representa la media \pm ES, $n = 4$, t de Student, * $p < 0.05$.

Para investigar las causas de éstas diferencias se determinó, por medio de Western blot, los niveles de expresión relativa de la enzima KAT II, enzima que convierte la Kyn en KYNA, en las mismas estructuras analizadas tanto en ratones intactos silvestres y *knock-out*. Encontramos que la expresión de KAT II es más alta en el estriado y en la corteza de los ratones *knock-out* en comparación con los ratones silvestres. No encontramos diferencias en el hipocampo de ningún genotipo (Fig. 4).

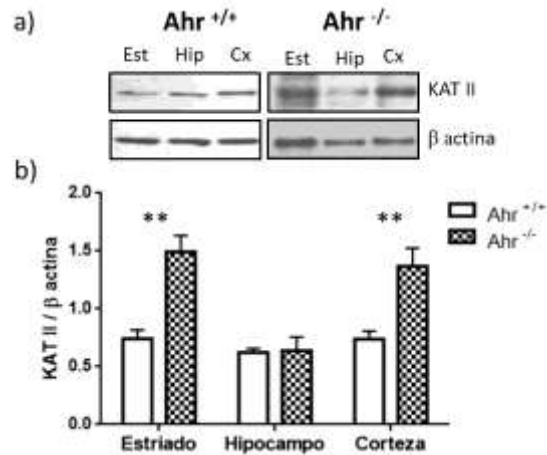


Figura 4. Efecto de la ausencia del Ahr sobre la expresión de la enzima KAT II.

a) Experimento representativo de la expresión, por Western blot, de la enzima KAT II y β actina en el estriado (Est), hipocampo (Hip) y corteza (Cx) de los ratones silvestres ($Ahr^{+/+}$) y *knock-out* ($Ahr^{-/-}$). b) Análisis densitométrico de KAT II. Cada barra representa la media \pm ES, $n = 3-4$, t de Student, ** $p < 0.01$.

Con el fin de analizar el efecto de la ausencia del Ahr sobre la conducta motora en los ratones de ambos genotipos, entrenamos animales intactos en el rotarod durante 3 días consecutivos a diferentes velocidades. La prueba de aprendizaje se realizó al cuarto día. En la prueba los animales fueron sometidos a una rampa de 2 a 40 rpm durante 5 minutos y se registró el tiempo y la velocidad a la cual los ratones cayeron. Los ratones *knock-out* se mantuvieron por más tiempo en el rodillo (Fig. 5a) y cayeron a una velocidad mayor que los ratones silvestres (Fig. 5b). Por lo tanto, la ausencia del Ahr y la consecuente disponibilidad de KYNA producen una protección constitutiva que mejora el desempeño motor.

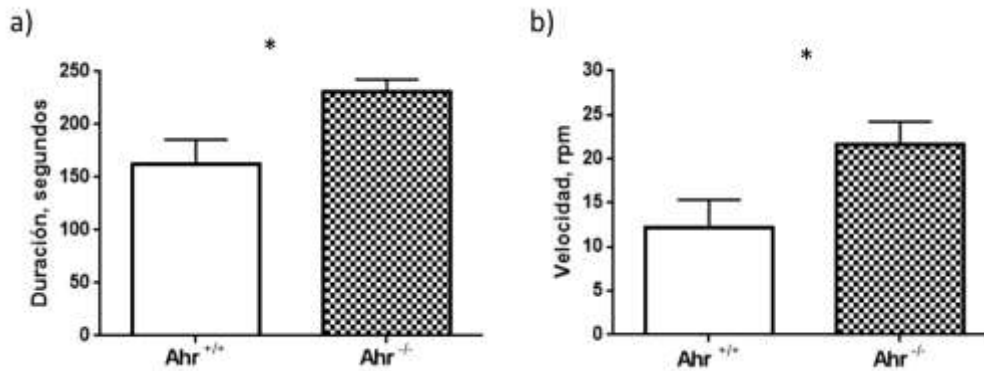


Figura 5. Efecto de la ausencia del Ahr sobre la conducta motora en el rotarod. Los ratones *knock-out* ($Ahr^{-/-}$) muestran un mejor desempeño y coordinación en comparación con los ratones silvestres ($Ahr^{+/+}$). a) Segundos que duraron los ratones en el rodillo. b) Velocidad a la cual los ratones cayeron. Cada barra representa la media \pm ES, $n = 4-5$, t de Student. * $p < 0.05$

Objetivo 2. Evaluar el efecto de la lesión estriatal con ácido quinolínico en ratones silvestres y nulos para el receptor de hidrocarburos arilo.

Para determinar si el aumento en los niveles de KYNA y de KAT II proveen un efecto de neuroprotección por una lesión excitotóxica, se administró una dosis de 30 nmol/ μ L de QUIN en el estriado de ratones tanto *knock-out* como silvestres. Primero, se analizó el estrés oxidante por medio del índice de peroxidación de lípidos (PL) y de las especies reactivas de oxígeno (ERO). La inyección de QUIN indujo tanto la PL como ERO en el lado lesionado de los animales silvestres en comparación con su lado control; mientras que no hubo diferencias entre el estriado lesionado y control de los ratones *knock-out* (Fig. 6). Este resultado muestra que los ratones *knock-out* están protegidos contra un insulto neurotóxico.

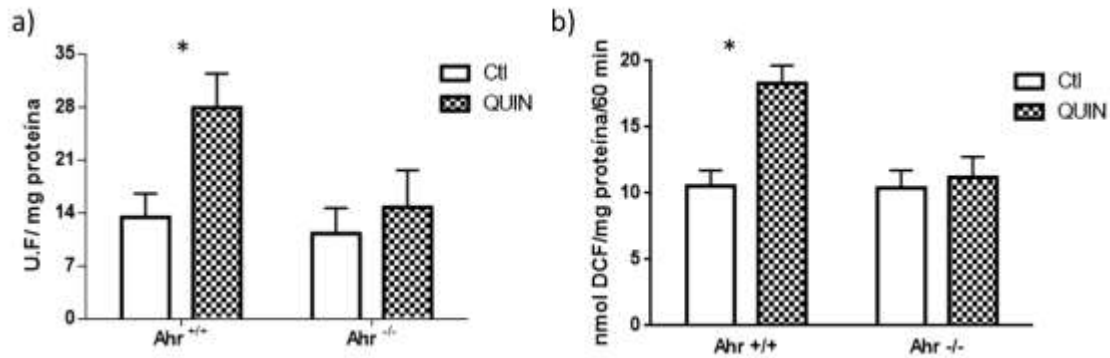


Figura 6. Efecto de la ausencia del Ahr sobre el daño oxidante inducido por la lesión estriatal con QUIN. El estriado de los ratones silvestres (Ahr^{+/+}) presenta mayor a) PL y b) ERO con respecto a su lado control. En los ratones nulos para el Ahr (Ahr^{-/-}) no presentan cambios significativos. U.F: unidades fluorescentes. Cada barra representa la media \pm ES, $n = 6$, t de Student. * $p < 0.05$.

La administración sistémica de apomorfina en ratones lesionados con QUIN induce la conducta de giro ipsilateral. Los ratones silvestres tuvieron en promedio 54.29 ± 6.267 giros mientras que los ratones *knock-out* únicamente tuvieron 28.29 ± 4.965 giros (Fig. 7). Por lo tanto, la conducta de giro en los ratones *knock-out* es significativamente menor comparada con la de los ratones silvestres.

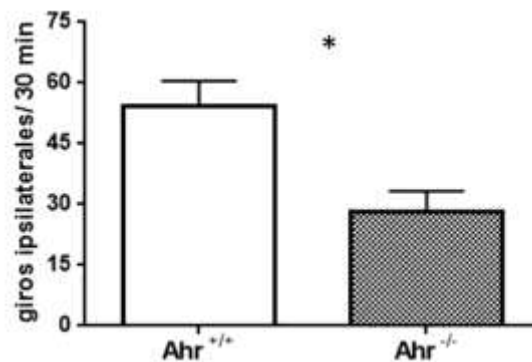


Figura 7. Efecto de la ausencia del Ahr sobre la conducta de giro inducida por la lesión estriatal con QUIN. Hay una reducción en la conducta de giro en los ratones *knock-out* (Ahr^{-/-}) con respecto a los ratones silvestres (Ahr^{+/+}). Cada barra representa la media \pm ES, $n = 3$, t de Student. * $p < 0.05$.

Para evaluar el impacto de la administración de QUIN sobre la síntesis de KYNA se evaluó la expresión relativa de la KAT II en la corteza y el estriado en los ratones silvestres y en los ratones *knock-out* tanto en el lado lesionado como en el lado contralateral. En el estriado y corteza de los ratones silvestres se encontró una mayor expresión de KAT II en el lado lesionado comparado con su lado control (Fig. 8a). Sin embargo, en los ratones nulos para el gen *Ahr* no hubo diferencias significativas en la expresión de KAT II (Fig. 8b). Este experimento demuestra que los ratones *knock-out* no son sensibles a la administración intra-estriatal de QUIN.

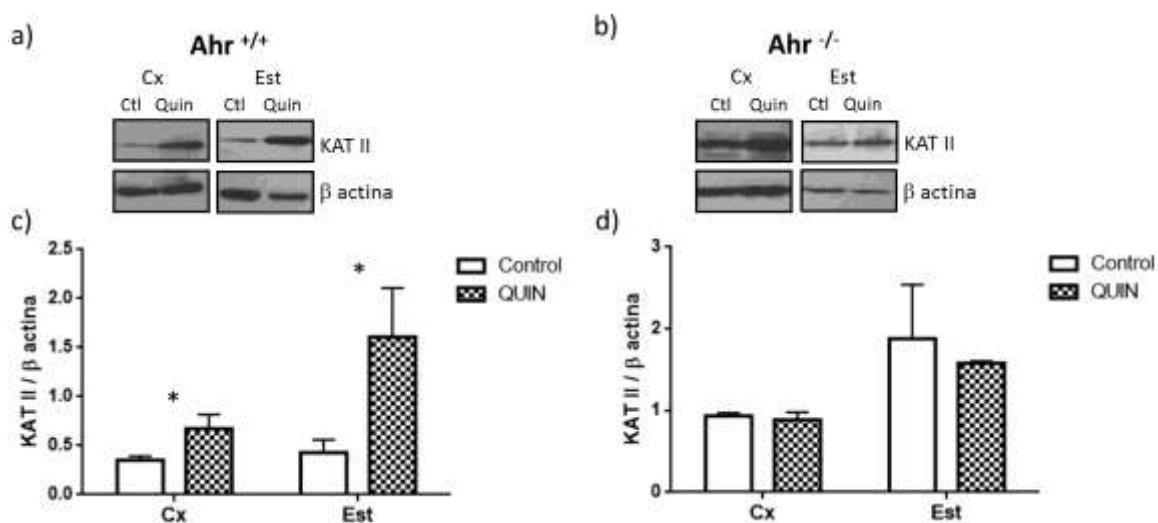


Figura 8. Efecto de la lesión con QUIN sobre la expresión de KAT II. Experimento representativo de la expresión, analizada por Western blot, de la enzima KAT II y β actina en el estriado (Est) y corteza (Cx) con la lesión de QUIN y en el estriado control (ctl) de a) ratones silvestres (*Ahr*^{+/+}) y b) ratones *knock-out* (*Ahr*^{-/-}). Análisis densitométrico de KAT II en c) *Ahr*^{+/+} y d) *Ahr*^{-/-}. Cada barra representa la media \pm ES, *n* =6-8, t de Student.

**p* < 0.05.

El contenido estriatal de GABA es un indicador del estado y de la integridad de las neuronas GABAérgicas. Con esto en mente, determinamos el efecto de la ausencia del *Ahr* en los ratones silvestres y *knock-out* lesionados con QUIN en el estriado, representado por el contenido de GABA. Hubo un decremento significativo en el contenido de GABA estriatal del lado lesionado del ratón silvestre comparado con el lado contralateral. Mientras que la lesión con QUIN no tuvo efecto sobre el lado lesionado comparado con su

lado control del ratón *knock-out*, indicando una protección neuronal en contra de la lesión (Fig. 9a). Los niveles basales de GABA de los ratones *knock-out* son menores en comparación con los ratones silvestres. Por lo tanto, quisimos caracterizar la neurotransmisión GABAérgica, por medio de la expresión relativa de la enzima GAD₆₇ (descarboxilasa de ácido glutámico) en el estriado lesionado y el estriado control de los ratones silvestres y *knock-out*. Encontramos un decremento significativo en la expresión relativa de GAD₆₇ del lado lesionado en los animales silvestres comparado con su control. Sin embargo, en el ratón *knock-out* no hubo diferencias en la expresión de GAD₆₇ entre ambos lados (Fig. 9b).

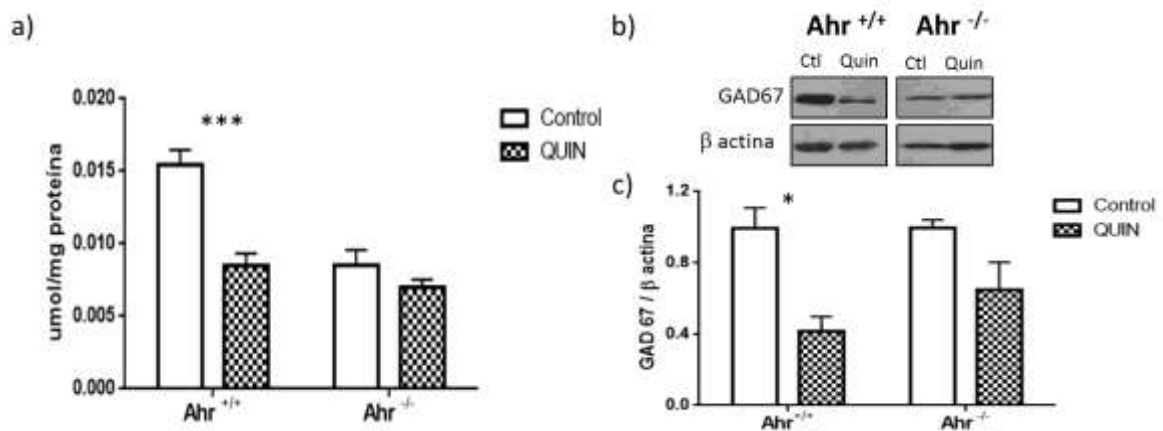


Figura 9. Efecto de la ausencia del Ahr sobre el contenido de GABA estriatal después de la administración de QUIN. El estriado de los ratones silvestres muestra una disminución significativa en a) los niveles de GABA y b) de la enzima GAD₆₇ con respecto a su lado controlateral. Los ratones *Ahr*^{-/-} no muestran diferencias significativas. c) Análisis densitométrico. Cada barra representa la media \pm ES, $n = 3$, t de Student.

* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

Para evaluar el impacto de la administración de QUIN sobre la neuro-transmisión glutamatérgica, se evaluó la expresión relativa de la subunidad NR1 del NMDAr en la corteza y el estriado en los ratones silvestres y en los ratones *knock-out* tanto en el lado lesionado como en el lado contralateral. En el estriado y corteza de los ratones silvestres se encontró una disminución en la expresión de NR1 en el lado lesionado comparado con su lado control (Fig. 10a). Sin embargo, en los ratones nulos para el gen *Ahr* no hubo

diferencias significativas en la expresión de NR1 (Fig. 10b). Este experimento sugiere la pérdida neuronal en el estriado lesionado con QUIN en los ratones silvestres.

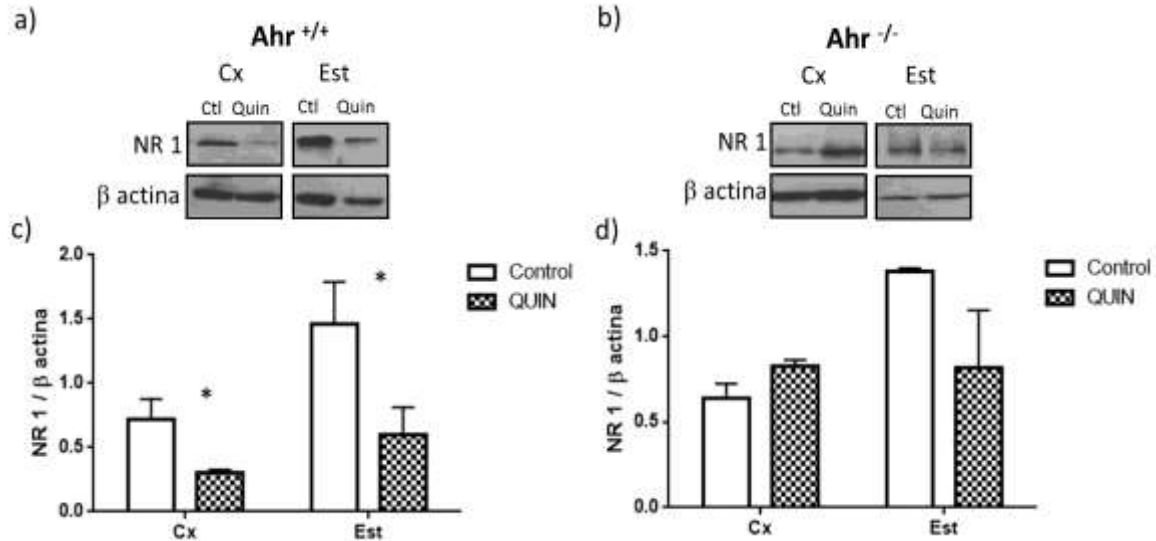


Figura 10. Efecto de la lesión con QUIN sobre la expresión de la subunidad NR1 del NMDAr. Experimento representativo de la expresión, evaluada por Western blot, de la subunidad NR1 y β actina en el estriado (Est) y corteza (Cx) lesionados con QUIN y del lado contralateral en a) ratones silvestres (*Ahr*^{+/+}) y b) ratones *knock-out* (*Ahr*^{-/-}). Análisis densitométrico de NR1 en ratones c) *Ahr*^{+/+} y d) *Ahr*^{-/-}. Cada barra representa la media ± ES, *n* =6, *t* de Student. **p* < 0.05.

Para confirmar el efecto de neuro-protección como resultado de la ausencia del receptor *Ahr* determinamos el volumen de la lesión inducida por QUIN en el estriado, por medio de la técnica histológica de violeta de cresilo (tinción de Nissl) en la cual la lesión se hace presente como una región pálida en los cortes teñidos (Fig. 11a). La lesión es significativamente mayor en el animal silvestre ($1.44 \pm 0.21 \text{ mm}^3$) comparado con la lesión en el animal *knock-out* ($0.79 \pm 0.13 \text{ mm}^3$) (Fig 11b).

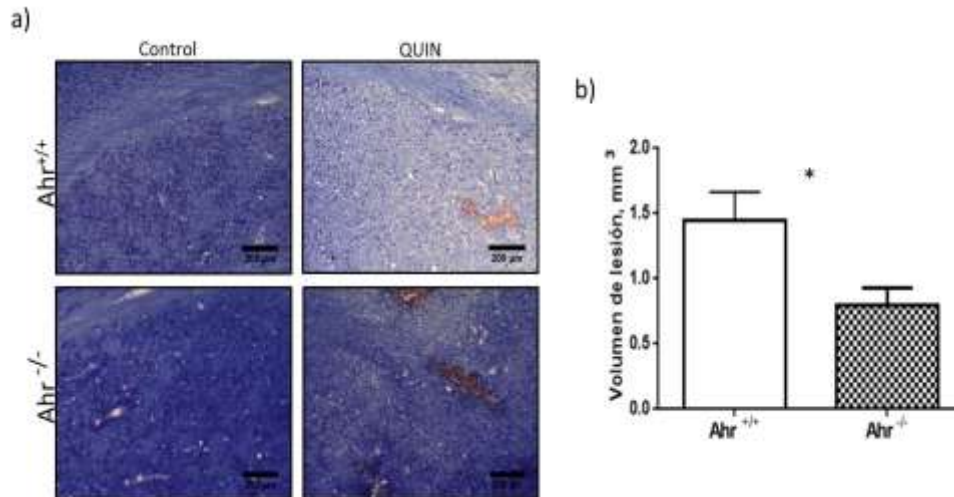


Figura 11. Volumen de la lesión estriatal inducida por QUIN. a) Imagen representativa de la tinción con violeta de cresilo en el estriado control y en el lado lesionado con QUIN de ratones silvestres ($Ahr^{+/+}$) y *knock-out* ($Ahr^{-/-}$). b) Volumen de la lesión en los ratones $Ahr^{+/+}$ y $Ahr^{-/-}$. Cada barra representa la media \pm ES, $n = 6-8$, t de Student. * $p < 0.05$.

Objetivo 3. Evaluar farmacológicamente la ocupación del Ahr y su efecto sobre los niveles del ácido kinurénico.

Para evaluar el efecto de la manipulación farmacológica del Ahr sobre los niveles de KYNA; se trató a ambos tipos de ratones con una dosis única del agonista selectivo del Ahr, el TCDD, para después evaluar los niveles de KYNA cerebrales. En el ratón *knock-out* para el gen Ahr no se observaron diferencias entre los ratones tratados en comparación con los ratones vehículo. Sin embargo, el tratamiento con TCDD aumentó aproximadamente un 40 % los niveles de KYNA en el estriado (Fig. 12a) y en la corteza (Fig. 12b) de ratones silvestres. Esto sugiere que la inducción de KYNA después del tratamiento con TCDD es dependiente de la ocupación del Ahr ya que en los ratones que no tienen al Ahr no tuvo efecto alguno.

Después, quisimos poner a prueba el tratamiento con el antagonista del Ahr, el resveratrol (Rsv). Los ratones *knock-out* tanto tratados como controles no mostraron diferencias en los niveles de KYNA. Pero, el tratamiento con el Rsv sobre los ratones

silvestres, resultó en la inducción de KYNA en el estriado (Fig. 12 c) y corteza (Fig. 12 d) en comparación con los ratones silvestres vehículo.

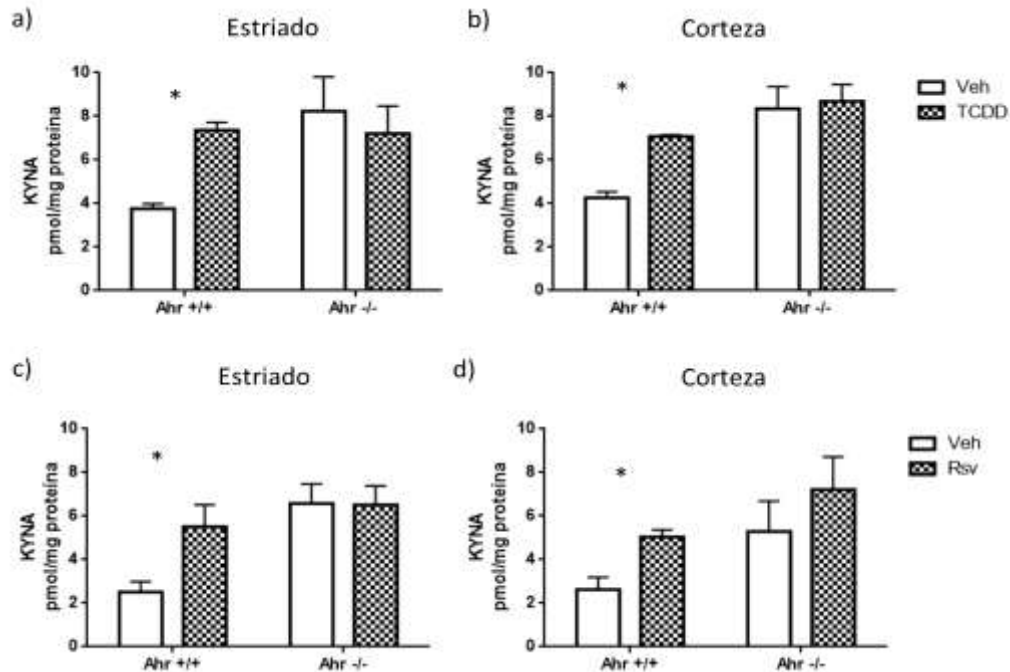


Figura 12. Determinación de KYNA mediante HPLC. Los niveles de KYNA aumentan en el estriado y corteza de los ratones silvestres (Ahr^{+/+}) tratados con a y b) TCDD y con c y d) Rsv en comparación con los ratones Ahr^{+/+} que recibieron el vehículo respectivo. Los ratones nulos para Ahr (Ahr^{-/-}) no muestran diferencias. Cada barra representa la media ± ES, n = 4, t de Student. *p < 0.05.

Para investigar la modulación de ambos agentes sobre los niveles de KYNA, se evaluó la expresión relativa de KAT II en el estriado de los ratones silvestres y en los ratones *knock-out*. Se observó que la expresión de la enzima KAT II es mayor en el estriado de los ratones silvestres tratados con TCDD y con Rsv en comparación con su grupo vehículo respectivo. Sin embargo, en los ratones nulos para el gen Ahr no hubo diferencias significativas en la expresión de KAT II (Fig. 13).

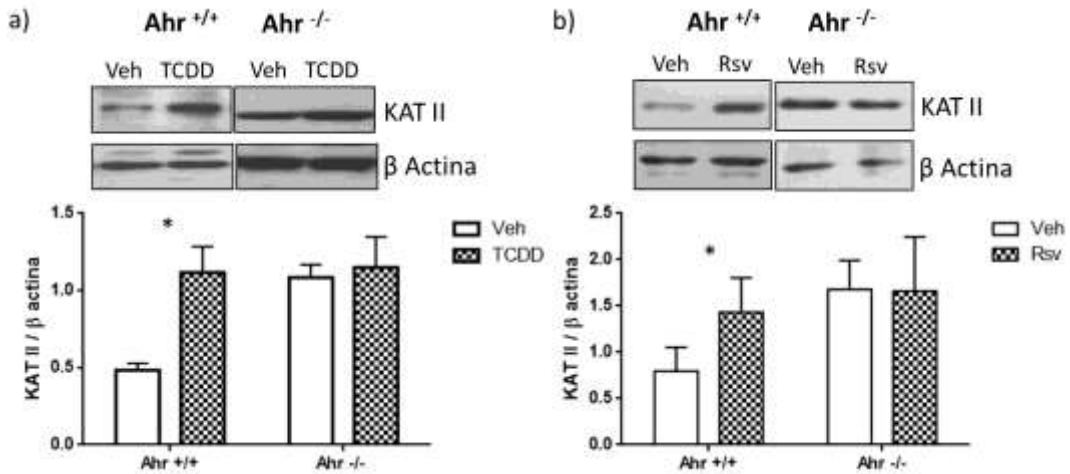


Figura 13. Efecto de la ocupación farmacológica del Ahr sobre la expresión de la enzima KAT II. Experimento representativo de la detección de la enzima KAT II, mediante Western blot, inducida por el tratamiento con a) TCDD y con b) Rsv en el estriado de los ratones silvestres (*Ahr*^{+/+}). Los ratones nulos para Ahr no muestran diferencias (*Ahr*^{-/-}). Cada barra representa la media \pm ES, $n = 4$, t de Student. * $p < 0.05$.

Debido a los efectos secundarios que provoca el TCDD no se realizaron pruebas a largo plazo con esta dioxina. En cambio, el tratamiento con el Rsv se realizó durante 6 semanas. En este tiempo se llevaron a cabo varias pruebas motoras así como la medición del peso de todos los grupos (Fig. 14).

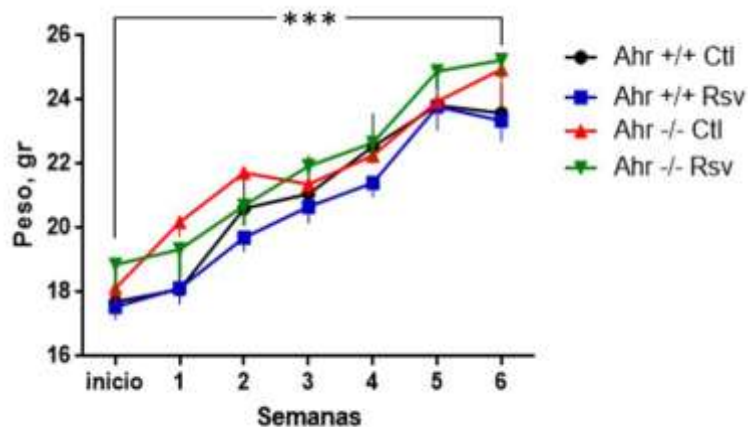


Figura 14. El tratamiento con resveratrol no afecta el peso de los grupos de ratones. No hay diferencias entre los tratamientos pero si en el tiempo. $n = 5-7$, ANOVA de dos factores de medidas repetidas con post-hoc de Tukey. *** $p < 0.001$.

Los ratones fueron entrenados en la prueba del rotarod a la tercera y sexta semana del tratamiento con Rsv. El grupo de ratones silvestres que recibieron el Rsv ($Ahr^{+/+}/Rsv$) se mantuvo por más tiempo en el rodillo y por consiguiente se cayó a una velocidad mayor que los ratones silvestres-vehículo ($Ahr^{+/+}/Veh$). Los ratones *knock-out* para el gen *Ahr* con o sin tratamiento tuvieron un mejor desempeño (Fig. 15). Estos datos demuestran que la ocupación farmacológica del *Ahr* por el Rsv y por consecuencia el aumento del KYNA mejora el balance y el comportamiento motriz.

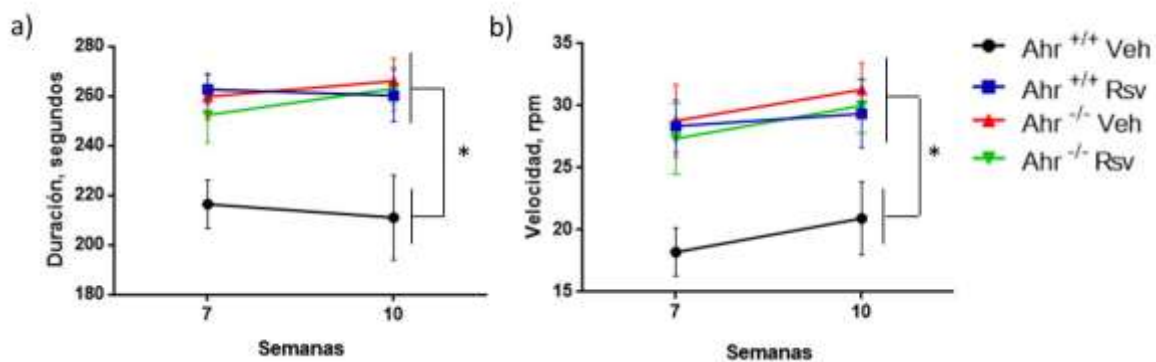


Figura 15. Efecto de la ocupación farmacológica del *Ahr* mediante el resveratrol sobre la conducta en la prueba del rotarod. a) Tiempo de permanencia sobre el rodillo. b) Velocidad alcanzada. No hay diferencias en el tiempo pero si entre los tratamientos, es decir, el grupo $Ahr^{+/+}/Veh$ fue diferente de todos los demás. $n = 5-7$, ANOVA de dos factores con post hoc de Tukey. $p < 0.0001$.

También se evaluó la actividad espontánea mediante la prueba de campo abierto a la tercera y sexta semana con el tratamiento con Rsv. Los ratones silvestres de 7 semanas de edad y con tres semanas con el tratamiento mostraron un aumento en la actividad horizontal en comparación con los ratones $Ahr^{+/+}/Veh$, sin embargo no hubo cambios en la actividad vertical. Así tampoco hubo cambios en la actividad horizontal ni en la vertical cuando los ratones cumplieron las 6 semanas del tratamiento con Rsv, es decir, cuando tenían 10 semanas de edad (Fig. 16).

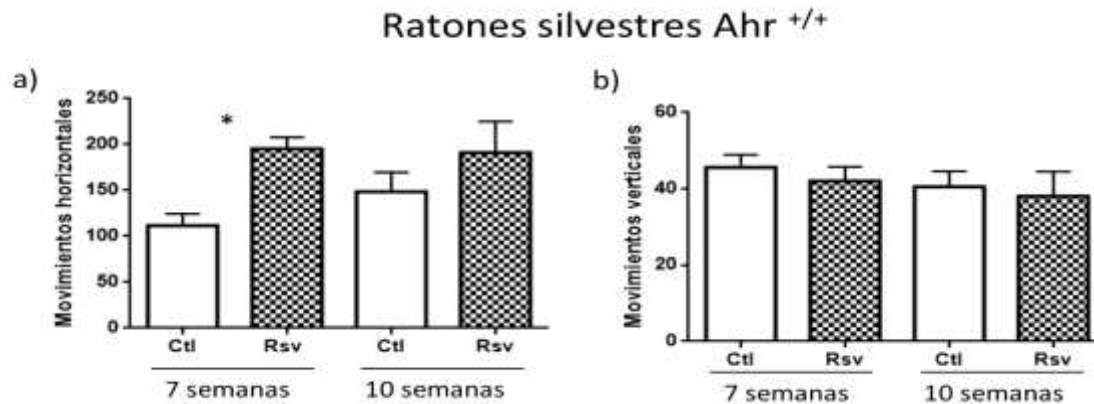


Figura 16. Efecto de la ocupación farmacológica del Ahr mediante el resveratrol sobre la conducta espontánea de los ratones silvestres en la prueba de campo abierto. Los animales tratados con Rsv, a la edad de 7 semanas muestran un incremento en a) los movimientos horizontales. No hay diferencias en b) los movimientos verticales. Cada barra representa la media \pm ES, $n = 4$, t de Student. * $p < 0.05$.

Por el otro lado, los ratones *knock-out* para el gen Ahr, no mostraron diferencias en la actividad motora en ninguna semana del tratamiento (Fig. 17).

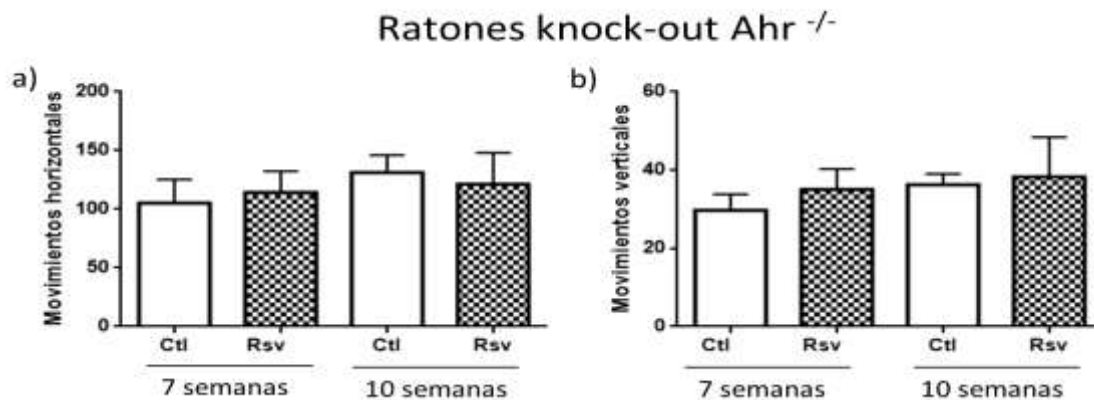


Figura 17. Efecto de la ocupación farmacológica del Ahr mediante el resveratrol sobre la conducta espontánea de los ratones *knock-out* en la prueba de campo abierto. No hubo diferencias en a) los movimientos horizontales ni verticales en ninguna de las semanas probadas. Cada barra representa la media \pm ES, $n = 4$, t de Student, * $p < 0.05$.

Presumiblemente, el aumento en el KYNA y de KAT II induce un mejor desempeño, coordinación y equilibrio motriz en los ratones silvestres en la prueba del rotarod.

Objetivo 4. Evaluar el efecto de la lesión con ácido quinolínico sobre los ratones silvestres y *knock-out* con el tratamiento farmacológico del antagonista del Ahr.

La ocupación farmacológica del Ahr, ya sea mediante un antagonista o de un agonista, provoca el aumento en los niveles de KYNA en el estriado y corteza de los ratones silvestres con tratamiento; así como un aumento en la expresión de KAT II en el estriado.

De esta manera, inyectamos QUIN en el estriado de ambos genotipos previamente tratados con Rsv durante tres semanas para analizar el daño neuronal. Primeramente, medimos la conducta de giro y encontramos que los ratones Ahr^{+/+}/Veh mostraron un promedio de 52.13 ± 6.64 giros ipsilaterales mientras que los ratones Ahr^{+/+}/Rsv únicamente mostraron un promedio de 33.00 ± 3.19 giros. Por lo tanto, la conducta de giro es menor en los ratones silvestres tratados con Rsv en comparación con los ratones silvestres que se les dio el vehículo. En cuanto a los ratones *knock-out* para el gen Ahr, no hubo diferencias. Los ratones Ahr^{-/-}/Veh mostraron en promedio 24.75 ± 3.30 giros mientras que los que tomaron Rsv mostraron un promedio de 21.50 ± 3.57 giros (Fig. 18).

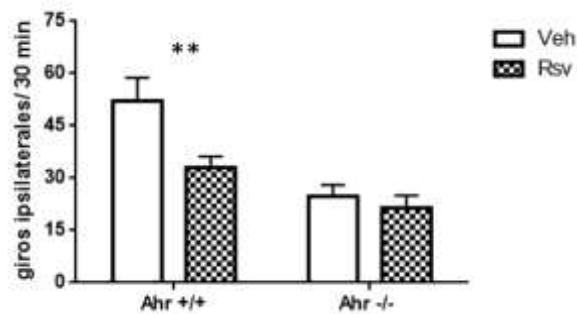


Figura 18. Efecto de la ocupación farmacológica del Ahr mediante el resveratrol sobre la conducta de giro. La administración de QUIN induce en los ratones Ahr^{+/+}/Veh mayor número de giros con respecto a los ratones Ahr^{+/+}/Rsv. No hay diferencias en los ratones Ahr^{-/-}. Cada barra representa la media ± ES. *n* = 4-7, *t* de Student. ***p* < 0.01.

Como la lesión con QUIN induce la PL [89], determinamos si la ocupación farmacológica del Ahr por parte de su antagonista Rsv y por consiguiente la inducción en los niveles de

KYNA proveen un efecto protector contra la lesión excitotóxica. Se determinó el índice de la PL y los niveles de ERO dos horas después de la lesión. El insulto excitotóxico generó un incremento significativo tanto en la PL (Fig. 19a) como en los niveles de ERO (Fig. 19b) en el estriado lesionado de los ratones *Ahr*^{+/+}/Veh en comparación con su lado contralateral. Sin embargo la lesión con QUIN no generó el daño oxidante en los ratones *Ahr*^{+/+}/Rsv ya que no mostraron diferencias significativas. Así mismo, los ratones nulos para el gen *Ahr* con o sin tratamiento no tuvieron diferencias entre el lado lesionado y contralateral tanto en la PL (Fig. 19c) como en los niveles de ERO (Fig. 19d).

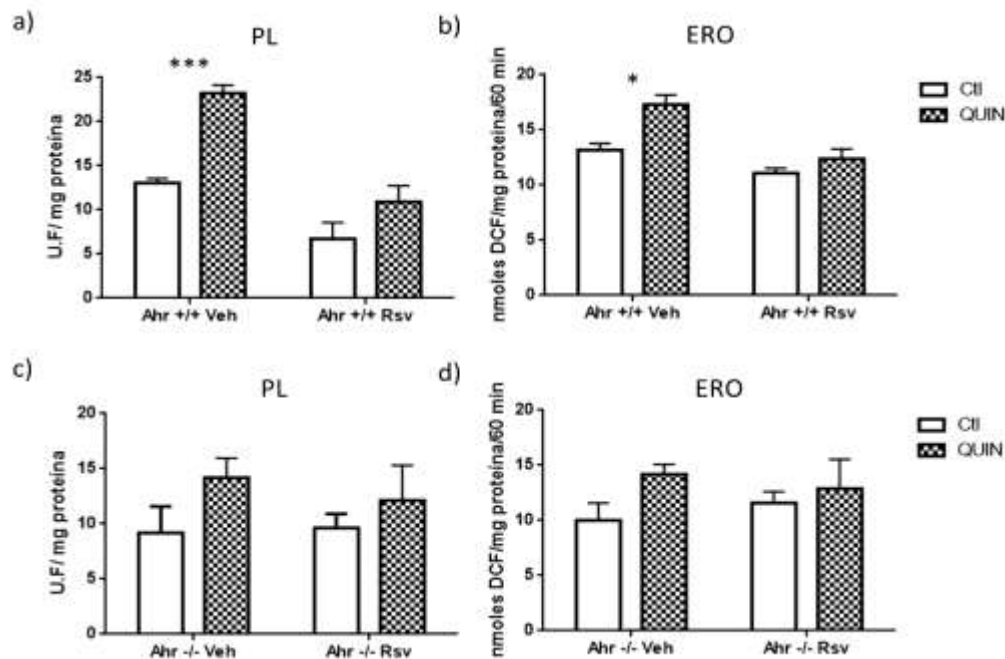


Figura 19. Efecto de la ocupación farmacológica del Ahr mediante el resveratrol sobre el daño oxidante. El estriado lesionado de los ratones *Ahr*^{+/+}/Veh mostró un incremento significativo en a) la peroxidación de lípidos (PL) y b) especies reactivas de oxígeno (ERO) en comparación con su lado contralateral. No hubo diferencias en los ratones silvestres con resveratrol ni en los ratones *knock-out* con o sin resveratrol. Cada barra representa la media \pm ES. *n* = 3, *t* de Student. **p* < 0.05, ****p* < 0.001.

El déficit de la concentración de GABA en la EH es mimetizado por el insulto excitotóxico con QUIN [90]. Por esta razón, determinamos el efecto bioquímico de la ocupación del Ahr representado por el contenido de GABA en los dos genotipos de ratones, previamente

tratados con Rsv y lesionados con QUIN. Encontramos un decremento significativo del contenido de GABA en el estriado lesionado en comparación con su lado contralateral de los ratones *Ahr*^{+/+}/Veh. Sin embargo, la lesión con QUIN no tuvo el mismo efecto sobre los ratones *Ahr*^{+/+}/Rsv, lo cual indica una protección en contra del insulto excitotóxico. En el caso de los ratones nulos para el gen *Ahr* no hubo diferencias entre el lado lesionado y contralateral sin importar si fueron tratados con resveratrol o no (Fig. 20)

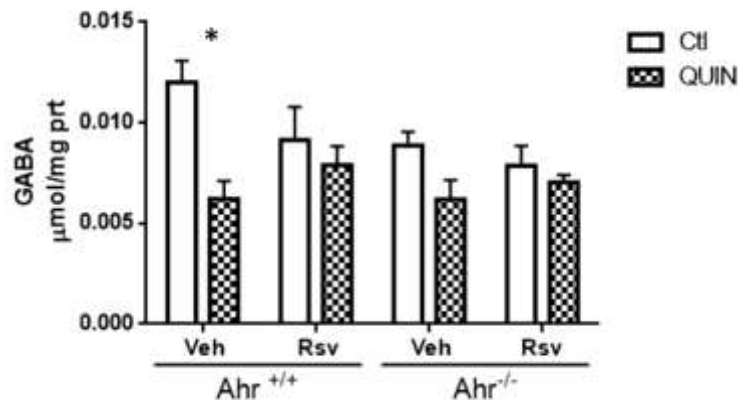


Figura 20. Efecto de la ocupación farmacológica del *Ahr* mediante el resveratrol sobre el contenido de GABA. El estriado de los ratones *Ahr*^{+/+} / Veh muestra una disminución significativa en los niveles de GABA con respecto a su control. El estriado de los ratones *Ahr*^{+/+} / Rsv y de los ratones *Ahr*^{-/-} con o sin tratamiento no muestran diferencias significativas. Cada barra representa la media \pm ES. $n = 3$, t de Student. * $p < 0.05$.

Para caracterizar la neurotransmisión GABAérgica de una mejor manera, analizamos la expresión de la enzima GAD₆₇ tanto en el estriado lesionado como contralateral en ambos genotipos con Rsv y con vehículo. Encontramos una disminución significativa en la expresión de GAD₆₇ en el lado lesionado con QUIN en los ratones silvestres-vehículo en comparación con el lado control. Sin embargo, en los ratones silvestres-resveratrol no hubo diferencias en la expresión de esta enzima (Fig. 21a). Además, tanto en los ratones *knock-out*/vehículo como en los *knock-out*/resveratrol la expresión de GAD₆₇ se mantuvo sin cambios (Fig. 21b).

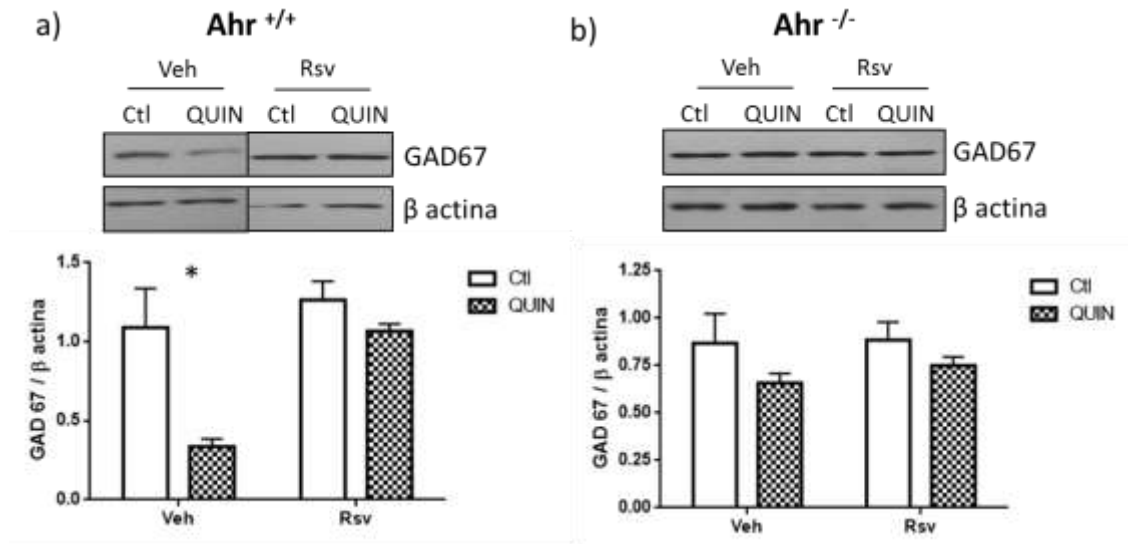


Figura 21. Efecto de la ocupación farmacológica del Ahr mediante el resveratrol sobre la expresión de la enzima GAD₆₇. Experimento representativo de la disminución de la enzima GAD₆₇ en a) estriado de los ratones *Ahr*^{+/+}/Veh con respecto a su control. El estriado de los ratones *Ahr*^{+/+}/Rsv y b) de los ratones *Ahr*^{-/-} con o sin tratamiento no muestran diferencias significativas. Cada barra representa la media \pm ES. $n = 3$, t de Student. * $p < 0.05$.

Para evaluar si la administración de QUIN tiene un impacto sobre la síntesis de KYNA en los ratones tratados con Rsv, evaluamos la expresión de KAT II en el estriado de los ratones de ambos genotipos mediante Western blot. Tanto el estriado como la corteza de los ratones que recibieron el vehículo (*Ahr*^{+/+}/Veh) muestran una expresión mayor de la enzima KAT II en comparación con su lado contralateral (Fig. 22a y 22b). Sin embargo, el tratamiento con Rsv inhibe el aumento de la expresión de KAT II inducida por QUIN en el lado lesionado de los ratones silvestres. Por otro lado, la expresión de KAT II en los ratones *knock-out* para el gen *Ahr* es independiente del insulto con QUIN (Fig. 22 c y 22d).

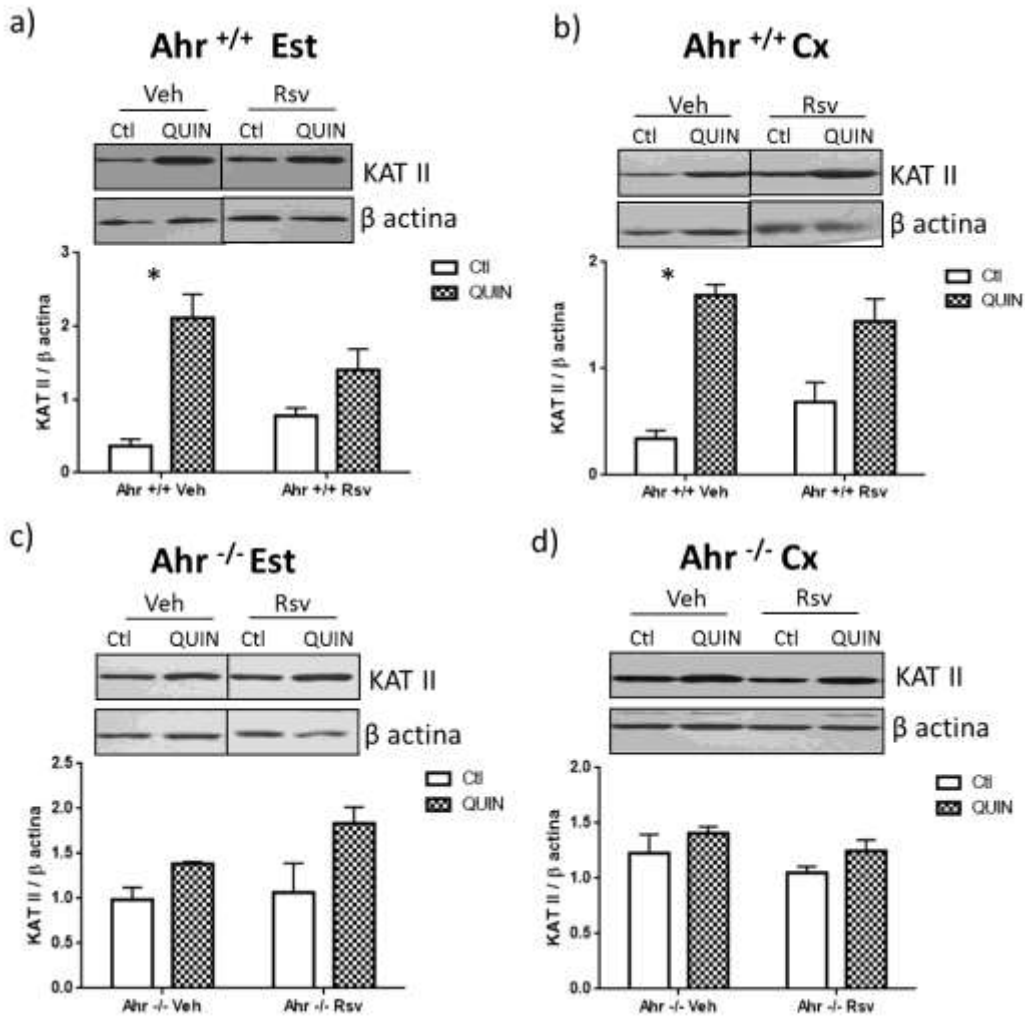


Figura 22. Efecto de la ocupación farmacológica del Ahr mediante el resveratrol sobre la expresión de la enzima KAT II. En el panel superior se muestran experimentos representativos del tratamiento con Rsv inhibiendo el incremento de la expresión de KAT II inducida por QUIN en el a) estriado lesionado y b) corteza de los ratones silvestres. En el panel inferior se muestran experimentos representativos del tratamiento con Rsv en el c) estriado lesionado y d) corteza de ratones *knock-out* en los cuales no hay diferencias. Cada barra representa la media \pm ES. $n = 3$, t de Student. * $p < 0.05$.

El Fluoro-Jade B (FJB) es un derivado polianiónico de la fluoresceína el cual se une de manera específica a las neuronas que se encuentran en el proceso de degeneración. De esta manera, se analizó la degeneración neuronal inducida por la lesión con QUIN en cortes estriales. No se detectó daño alguno en el lado no lesionado de ningún grupo. Pero el lado lesionado muestra células positivas a FJB en diferentes proporciones debido a

la excitotoxicidad que tiene el QUIN sobre cada genotipo de ratones y del tratamiento recibido (Fig. 23).

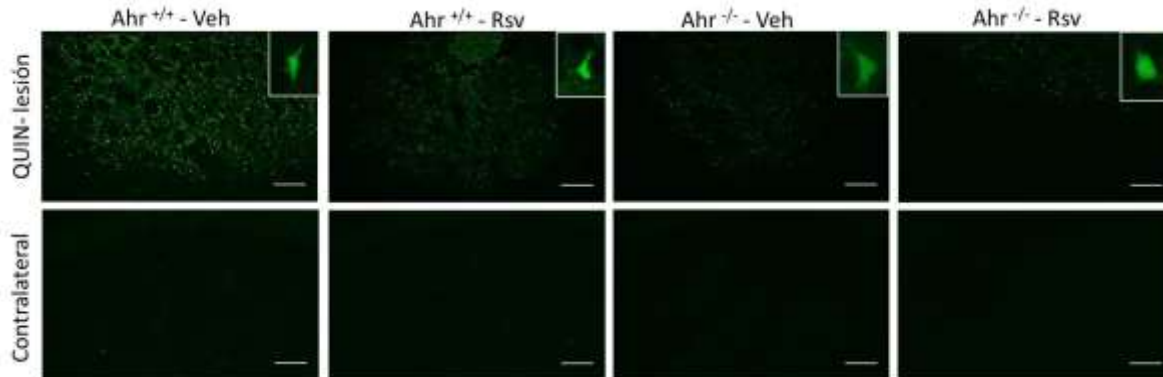


Figura 23. Efecto de la ocupación farmacológica del Ahr mediante el resveratrol sobre la degeneración neuronal inducida por la lesión con QUIN. En el panel superior se observa la degeneración de las neuronas en el lado lesionado con QUIN. En el panel inferior se muestra el lado contralateral y no se observan neuronas positivas a FJB. En el inserto se muestra el núcleo de las neuronas. Escala de la barra =100 μ m.

El conteo celular muestra más neuronas positivas a FJB en el grupo $Ahr^{+/+}/Veh$. Pero, el pre-tratamiento con Rsv en los ratones silvestres induce un decremento del 57 % con respecto al grupo vehículo. En cuanto a los ratones *knock-out* para el gen *Ahr*, el grupo que recibió el vehículo no fue estadísticamente diferente del que recibió resveratrol, aunque si se observaron escasas neuronas en proceso de degeneración (Fig. 24).

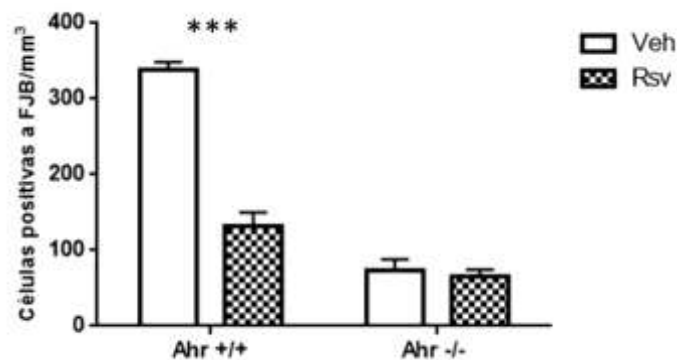


Figura 24. El pre-tratamiento con resveratrol inhibe la degeneración neuronal inducida por la excitotoxicidad del QUIN en los ratones silvestres. Cada barra representa la media \pm ES. $n = 3$, t de Student. *** $P < 0.001$.

La lesión con QUIN causa la pérdida de las neuronas estriatales y una reacción inflamatoria. Por lo tanto, evaluamos la astrogliosis mediante la técnica de inmunofluorescencia contra la proteína acida fibrilar glial (GFAP). El grupo $Ahr^{+/+}/Veh$ muestra un mayor número de células marcadas con GFAP alrededor del sitio de administración del QUIN. Mientras que el grupo que recibió el antagonista del Ahr, el Rsv, presentó una disminución significativa de células positivas a GFAP. Además, los ratones *knock-out* del gen Ahr tratados con vehículo o con Rsv muestran una escasa marca para GFAP (Fig. 25).

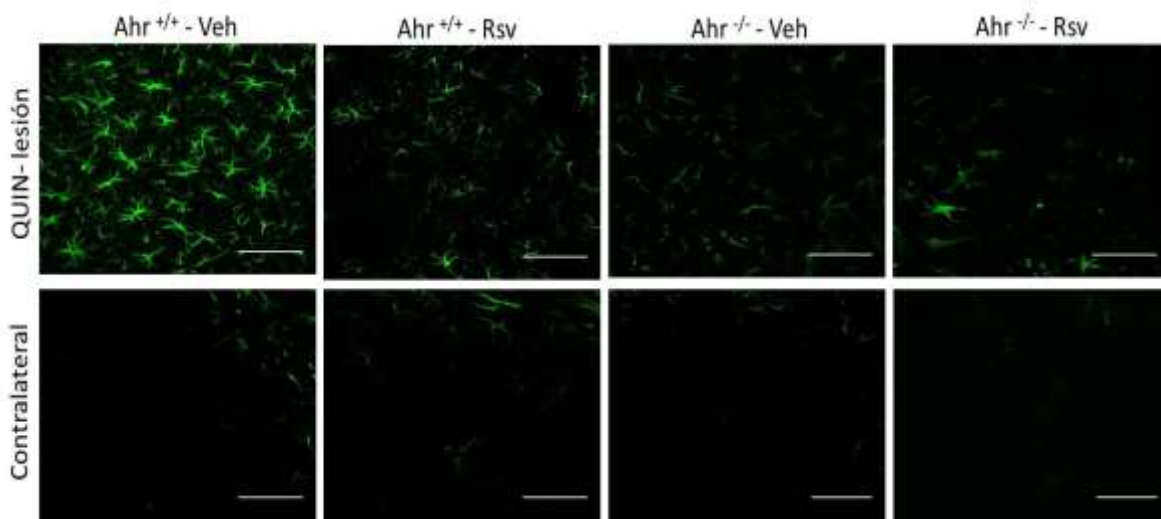


Figura 25. Efecto de la ocupación farmacológica del Ahr mediante el resveratrol sobre la astrogliosis inducida por la lesión con QUIN. El pre-tratamiento con resveratrol inhibe la astrogliosis inducida por la excitotoxicidad del QUIN en los ratones silvestres.

Escala de la barra = 30 μ m.

8. Discusión

La EH es un desorden neuro-degenerativo y hasta la fecha no tiene un tratamiento efectivo. Por lo tanto, es imprescindible el estudio de nuevos enfoques terapéuticos, como el abordaje del presente proyecto que sugiere elevar los niveles del KYNA.

El cerebro de un paciente con EH tiene una alta producción de QUIN, metabolito endógeno de la VK que actúa como una excitotoxina al inducir el estrés oxidante. Asimismo, la actividad de la enzima que lo produce, 3-hidroxiantranilato oxidasa, está elevada [70] en los pacientes de EH. Por el contrario, hay una pérdida de la biosíntesis del KYNA y en la actividad de la enzima kinurenina aminotransferasa [71-73]. Por lo tanto, quisimos evaluar si la ausencia del Ahr o su ocupación farmacológica inducen la disponibilidad de la Kyn y del KYNA para contrarrestar los efectos tóxicos de la lesión intraestriatal de QUIN.

Efecto de la ausencia del receptor de hidrocarburos de arilo sobre la vía de las kinureninas y sobre la conducta motriz.

Primero, caracterizamos la VK en el ratón con mutación nula para el receptor de hidrocarburos arilo (Ahr^{-/-}) en comparación con los ratones silvestres (Ahr^{+/+}). Se determinaron varios metabolitos de la VK en el estriado y corteza, las estructuras más afectadas en la EH, y en el hipocampo tanto de ratones intactos Ahr^{-/-} como en ratones Ahr^{+/+}. Los metabolitos analizados fueron: Kyn, 3H-Kyn, QUIN y KYNA. Los metabolitos que no tuvieron diferencias en las estructuras analizadas en ninguno de los 2 genotipos fueron Kyn, 3H-Kyn y QUIN. Sin embargo, se observó un aumento en los niveles de KYNA tanto en el estriado como en la corteza de los ratones Ahr^{-/-} en comparación con los ratones controles, Ahr^{+/+}. Estos datos indican que la ausencia del Ahr favorece la acumulación de KYNA, antagonista al NMDAr, en las regiones más afectadas en la EH. Interesantemente, la Kyn no mostró cambios significativos, especulamos que la conversión hacia el KYNA se lleva a cabo de una manera continua y que, por tal razón, la Kyn no llega a acumularse. Aproximadamente un 60% de la Kyn cerebral se deriva de fuentes extra-cerebrales [91]. Por lo tanto, siempre hay un flujo de Kyn hacia el cerebro. Tal vez, por esta razón tampoco encontramos una disminución en los niveles de este metabolito.

Aunque hubo una tendencia de incremento de los niveles de KYNA en el hipocampo, no fue significativa. Creemos que la falta de efecto es debida a las diferencias del

metabolismo de la VK así como al tipo de neuronas en diferentes partes del cerebro, y/o al número y función de los astrocitos en esas regiones.

La Kyn entra a las células gliales a través de transportadores de aminoácidos largos neutros [92] y es convertida irreversiblemente hacia el KYNA a través de la enzima KAT. Aunque existen 4 isoformas de la KAT [93], la enzima KAT II es la responsable de la formación *de novo* de KYNA [94]. La disponibilidad de Kyn es el factor principal que controla tanto la formación de KYNA así como la concentración local [80].

La enzima KAT II está presente tanto en los astrocitos cuyos procesos están próximos a las sinapsis glutamatérgicas así como en las neuronas GABAérgicas [84]; por lo tanto, el KYNA se libera al espacio extracelular para modular el tono glutamatérgico en el cerebro. Con esto en mente, analizamos la expresión de KAT II en el estriado, hipocampo y corteza de ratones intactos $Ahr^{+/+}$ y $Ahr^{-/-}$. Encontramos mayor expresión de KAT II en el estriado y corteza de los ratones $Ahr^{-/-}$ en comparación con los ratones control, $Ahr^{+/+}$. Estos resultados concuerdan con reportes previos, en los cuales el incremento en la síntesis del KYNA endógeno es el resultado de la expresión de la enzima KAT II [95-97].

En función de esto, tanto la administración exógena de Kyn como la disponibilidad causada por la ausencia del Ahr estimulan la síntesis de KYNA. Es posible que tal aumento disminuya los efectos de la acumulación excesiva del glutamato extracelular en la EH. Los niveles de Kyn y de KYNA han sido asociados con neuroprotección en diversos modelos experimentales. El pre-tratamiento con Kyn muestra un efecto protector tanto en el modelo de isquemia como en la lesión con NMDA, debido al aumento de KYNA en la corteza cerebral [98]. Por otro lado, la administración de un análogo de KYNA en un modelo transgénico de la EH prolongó la vida de estos ratones, disminuyó la pérdida de peso y la atrofia en las neuronas estriatales [99].

Aunque un mayor nivel de KYNA ha sido asociado con déficits cognitivos y desórdenes psiquiátricos [100, 101], es posible que un aumento moderado de KYNA debido a la ausencia del Ahr pueda modular el funcionamiento estriatal de una manera adecuada. Para determinar el efecto de este aumento de KYNA sobre una conducta motora no inducida farmacológicamente, analizamos la coordinación motriz en ratones intactos Ahr^{+/+} y Ahr^{-/-} mediante la prueba del rotarod. Encontramos que los ratones Ahr^{-/-} permanecen más tiempo en el rodillo y por lo tanto caen a una velocidad mayor en comparación con los ratones Ahr^{+/+}. Aunque, previamente se atribuyó esta conducta principalmente al cerebelo [102], la importancia del estriado en este paradigma de aprendizaje motor ha sido descrita [103]. Por otro lado, la depresión y el suicidio son desórdenes psiquiátricos comunes en la EH, la modulación del NMDAr a través del Ahr puede ser benéfico para los pacientes con EH y de otras patologías; puesto que se ha reportado, que en pacientes con desordenes depresivos el bloqueo del NMDAr mediante la ketamina revierte los efectos de la depresión más efectivamente que la medicación tradicional [104]. Además, puede reducir pensamientos suicidas en individuos resistentes a su tratamiento [105].

Efecto de la lesión estriatal con ácido quinolínico en ratones silvestres y nulos para el receptor de hidrocarburos de arilo.

La administración de QUIN estimula la disfunción mitocondrial [106], apoptosis [107] y la liberación de glutamato así como su re-captura por los astrocitos [39]. Además, induce el daño oxidante por la producción de radicales libres y PL [89] en una manera dependiente del NMDA [41]. Por todo lo anterior, administramos QUIN en el estriado de ratones Ahr^{+/+} y Ahr^{-/-} para determinar el efecto que tienen los niveles de KYNA sobre el índice de la PL y formación de ERO ante el insulto causado. Los ratones Ahr^{+/+} mostraron un incremento significativo en ambos parámetros en comparación con su lado control. Sin embargo, los ratones Ahr^{-/-} no presentaron diferencias. Por lo tanto, los mayores niveles de KYNA, producidos por la disponibilidad de este metabolito en el estriado de los ratones que no tienen el Ahr, confieren una protección neuronal hacia los insultos excitotóxicos.

Estudios previos sugieren que el metabolismo de la VK se encuentra desplazado hacia la producción de KYNA después de un insulto excitotóxico [108, 109]. En el presente trabajo, el impacto de la administración de QUIN sobre la síntesis de KYNA se ve reflejado en una mayor expresión de KAT II en el estriado lesionado y corteza de los ratones Ahr^{+/+}. Sin embargo, el QUIN no tuvo el mismo efecto en los ratones Ahr^{-/-}, lo cual indica que la vía bioquímica no se encuentra afectada debido a la ausencia del Ahr.

La ausencia del Ahr y el incremento consecuente de KYNA pueden atenuar la excitotoxicidad inducida por el QUIN, ya que los resultados conductuales y los bioquímicos (conducta de giro y contenido de GABA, respectivamente) del presente trabajo, demuestran la protección neuronal. Aunque el estriado de los ratones Ahr^{-/-} está protegido en contra del insulto neuro-tóxico se observa que los niveles basales de GABA son menores en comparación al nivel basal de los ratones silvestres. Este resultado concuerda con el nivel de expresión de la enzima GAD₆₇. El menor contenido de GABA en los ratones Ahr^{-/-} puede ser causado por una actividad excitadora glutamatérgica constitutivamente disminuida; sin embargo, este punto requiere mayor investigación.

Se ha reportado en cultivos primarios de neuronas corticales, que la excitotoxicidad del NMDAr aumenta al activar al Ahr y disminuye con el tratamiento de un RNA interferente diseñado para el Ahr. El knock-down del Ahr también reduce la concentración de calcio intracelular y la expresión del NMDAr [110]. Por lo tanto, estos datos indican una conexión entre la expresión del Ahr y la neurotransmisión glutamatérgica. Debido a esto, determinamos los niveles de expresión de la subunidad NR1 del receptor NMDA en el estriado control y lesionado en ambos genotipos. La expresión de NR1 está disminuida tanto en la corteza como en el estriado lesionado de los ratones Ahr^{+/+}. Sin embargo, en los ratones Ahr^{-/-} no hubo diferencias, es decir, la lesión no disminuyó la expresión de la subunidad NR1. Es posible que la disminución del NR1 en los ratones silvestres se deba a la muerte neuronal. Por lo tanto, determinamos el volumen de la lesión con QUIN en ambos genotipos. Observamos que la lesión estriatal es mayor en los ratones Ahr^{+/+} en

comparación con los ratones Ahr^{-/-}, lo cual demuestra que los niveles de KYNA ejercen una protección neuronal en contra de este tipo de insulto.

Efecto de la ocupación farmacológica del Ahr sobre los niveles del ácido kinurénico.

El Ahr es un factor de transcripción distribuido en todo el cerebro, incluyendo la corteza, hipocampo, hipotálamo, tálamo y cerebelo [111]. Se encuentra en neuronas, células endoteliales y en astrocitos [112]. La activación del Ahr mediante toxinas, como el TCDD, conlleva a citotoxicidad y carcinogénesis por la inducción del citocromo P450, lo cual genera metabolitos tóxicos y estrés oxidante [113].

Para evaluar el efecto de la ocupación farmacológica del Ahr sobre los niveles de KYNA, usamos al TCDD como agonista del Ahr y al Rsv como un antagonista competitivo.

Primero, analizamos si la ocupación farmacológica del Ahr tenía algún efecto sobre los niveles del KYNA. Únicamente se midió este metabolito neuroactivo ya que en los resultados anteriores fue el que mostró cambios significativos. Los niveles de KYNA tanto en estriado como en corteza de los ratones Ahr^{+/+} aumentaron con el tratamiento del agonista así como con el antagonista del Ahr, en comparación con su grupo vehículo respectivo. Estos datos indican que la ocupación del Ahr favorece la acumulación de KYNA, antagonista del NMDAr. Además, el hecho de que los tratamientos no tuvieran efecto sobre los niveles de KYNA en los ratones Ahr^{-/-} refuerza este resultado.

Para determinar si la ocupación farmacológica del Ahr tenía un efecto sobre la VK al favorecer la síntesis de KYNA, analizamos los niveles de expresión de la enzima KAT II en el estriado de ambos genotipos de ratones tratados con TCDD y Rsv. Encontramos una mayor expresión de KAT II en el estriado de los ratones Ahr^{+/+} tratados con TCDD y Rsv en comparación con su respectivo grupo vehículo. En los ratones Ahr^{-/-} no encontramos diferencias, ya que en estos ratones el Ahr está ausente. Es interesante que únicamente el

bloqueo del Ahr, ya sea por un agonista o un antagonista aumenten la disponibilidad del KYNA, ya que un agonista activaría la expresión génica.

Efecto de la lesión con ácido quinolínico sobre los ratones silvestres y *knock-out* con el tratamiento farmacológico del antagonista del Ahr.

Para determinar los efectos neuroprotectores de los niveles de KYNA causados por el bloqueo del Ahr, utilizamos al resveratrol, puesto que no produce efectos secundarios tóxicos como el TCDD.

En algunos modelos animales de las enfermedades neurodegenerativas, la función motora es evaluada mediante pruebas conductuales [114]; por lo tanto, analizamos la actividad motriz mediante la prueba del rotarod y de campo abierto en ambos genotipos con el tratamiento de Rsv o vehículo. En el rotarod los ratones Ahr^{-/-}, sin importar el tratamiento, demostraron un mejor desempeño y equilibrio tanto a la tercer semana como a la sexta. Interesantemente, el grupo silvestre tratado con resveratrol (Ahr^{+/+}/Rsv) mostró mejor coordinación en comparación con el grupo silvestre con vehículo (Ahr^{+/+}/Veh). Este resultado es sorprendente ya que no se había reportado una mejoría en la conducta motora de ratones silvestres con Rsv. La administración del fármaco SRT501-M, una formulación del Rsv, no mejoró el desempeño motriz en esta misma prueba ni en ratones silvestres ni en los ratones transgénicos de la EH, N171-82Q [115]. Por otro lado, el tratamiento con Rsv restauró por completo los déficits motores en otro modelo de la EH, los ratones YAC128 [116].

La actividad horizontal en el campo abierto es una medida de la conducta de exploración y actividad en general. En esta prueba, encontramos mayor actividad horizontal únicamente a la tercera semana del tratamiento con Rsv en los ratones Ahr^{+/+} en comparación con el grupo Ahr^{+/+}/Veh. Creemos que para la sexta semana con el tratamiento, los ratones se habituaron al contexto y por lo tanto no encontramos diferencias en esta semana. Por otro lado, un decremento en la actividad vertical está

relacionada con la sedación mientras que un incremento en esta medida está asociada con la ansiedad [117]. No encontramos diferencias en la actividad vertical en ninguna de las semanas probadas en ambos genotipos, sin importar del tratamiento.

Como la inyección de QUIN desencadena la degeneración de la neuronas estriatales y los daños cognitivos característicos de la EH [118]; y además, ya habíamos observado neuroprotección en los ratones $Ahr^{-/-}$ en contra de este insulto excitotóxico, quisimos evaluar el daño neuronal de la lesión con QUIN en el estriado de ambos genotipos tratados con Rsv o vehículo. La conducta de giro es una forma de evaluar la integridad funcional del estriado. El pre-tratamiento con Rsv redujo la conducta de giro en los ratones $Ahr^{+/+}$ en comparación con los $Ahr^{+/+}/Veh$, mientras que en los ratones $Ahr^{-/-}$ no hubo diferencias.

La disminución en el contenido de GABA o en la actividad y expresión de la enzima GAD_{67} , refleja la muerte de las neuronas GABAérgicas inducida por el insulto excitotóxico. Se ha reportado que una dosis de 8 mg/kg por día de Rsv restauró la actividad de la enzima GAD en la corteza olfatoria y en el hipocampo de ratas lesionadas con ácido kainico [56]. En nuestros experimentos, el tratamiento con Rsv inhibe la reducción del contenido de GABA en el estriado lesionado del ratón $Ahr^{+/+}$. Mientras que el estriado de los ratones $Ahr^{-/-}$ muestra protección hacia el insulto neurotóxico ya que no hay diferencias entre el lado lesionado y contralateral, sin importar el tratamiento recibido. Además, estos datos concuerdan con los niveles de expresión de la enzima GAD_{67} , ya que está disminuida en el lado lesionado de los ratones $Ahr^{+/+}/Veh$ pero no en los que recibieron Rsv ni en los *knock-out*.

La administración de QUIN induce el daño oxidante por la producción de radicales libres [89]. Las ERO desestabilizan a los electrones de los lípidos en la membrana plasmática, resultando en daño celular debido a la peroxidación de lípidos. Por lo tanto, analizamos el índice de estos parámetros. Los ratones $Ahr^{+/+}/Veh$ lesionados mostraron un aumento

significativo de peroxidación de lípidos y de formación de ERO en comparación con su estriado control. Pero, ni los ratones silvestres ni los *knock-out* lesionados mostraron diferencias entre el lado lesionado y el control. Por lo tanto, los niveles de KYNA producidos por la ocupación del Ahr confieren neuroprotección en contra del insulto excitotóxico como se observa en los ratones *knock-out* que no expresan al Ahr.

También quisimos analizar si la VK estaba desplazada hacia la producción de KYNA como resultado del daño neuronal del QUIN. En los ratones Ahr^{+/+}/Veh la administración de QUIN aumenta la expresión de la enzima KAT II en el estriado; sin embargo, el pre-tratamiento con Rsv inhibe este efecto. Por otro lado, el QUIN no tiene efecto sobre los niveles de KAT II en los ratones *knock-out* con o sin tratamiento, sugiriendo que no está afectando la vía bioquímica que conlleva a la síntesis de KYNA causado por la falta del Ahr.

Los astrocitos tienen una respuesta dinámica a los insultos cerebrales. La lesión con QUIN puede incrementar la respuesta inflamatoria de las células gliales [119] conllevando a una degeneración neuronal, ya que encontramos una alta expresión de células positivas a Fluoro Jade B en el grupo Ahr^{+/+} sin Rsv. Además, el área que rodea al sitio de inyección con QUIN en el grupo Ahr^{+/+}/Veh mostró una intensa marca de GFAP (proteína acida fibrilar glial) en comparación con el grupo Ahr^{+/+}/Rsv, indicando un daño mayor del estriado. Por otro lado, en los ratones *knock-out* hay una baja respuesta a GFAP y escasas neuronas en degeneración, indicando que la falta o el bloqueo del Ahr protege a las neuronas en contra de los insultos neurotóxicos.

Puesto que el Rsv no tuvo algún efecto en los ratones *knock-out* para el gen Ahr, nosotros proponemos que la neuroprotección del Rsv en los ratones silvestres es directamente causada por su actividad como antagonista del Ahr y no a otras propiedades como las de antioxidante. Es de gran interés que únicamente la ocupación farmacológica del Ahr produce el aumento en los niveles de KYNA, sin tomar en cuenta la expresión génica que estaría siendo regulada por el agonista. Por lo mismo, la regulación génica a

largo plazo dependiente del Ahr necesita ser explorada para así poder comprender mejor los efectos de la manipulación farmacológica de este factor transcripción.

La presente tesis demuestra que tanto la ausencia como la ocupación farmacológica del Ahr permiten mayor disponibilidad de la Kyn para su conversión hacia el KYNA por medio de la enzima KAT II y en consecuencia se observa un efecto neuroprotector en contra del insulto excitotóxico del QUIN. Probablemente debido a la capacidad del KYNA de inhibir la actividad glutamatérgica tanto a nivel presináptico como post sináptico; sin embargo, este aspecto necesita ser determinado. Por lo tanto, la modulación farmacológica de la actividad del Ahr podría ser una opción para regular los niveles de KYNA y un tratamiento para la EH u otras patologías en las que subyace la excitotoxicidad.

9. Conclusiones

Los ratones nulos para el gen Ahr presentan mayor nivel de la enzima KAT II y de KYNA en la corteza y en el estriado en comparación con los ratones silvestres.

Existe protección neuronal debida a la ausencia del receptor Ahr, al aumento de los niveles relativos de la proteína KAT II y de KYNA en los ratones *knock-out*.

La ocupación farmacológica del Ahr induce un aumento en los niveles de KYNA en el estriado y corteza de los ratones silvestres con el tratamiento con TCDD y Rsv; así como un aumento en la expresión de KAT II en el estriado.

El aumento en el KYNA y de KAT II induce un mejor desempeño, coordinación y equilibrio motriz en los ratones silvestres en la prueba del rotarod.

El incremento de KYNA debido a la ocupación farmacológica del Ahr por parte del Rsv confiere una neuroprotección hacia el insulto excitotóxico del QUIN.

10. Perspectivas

En los ratones silvestres y nulos para el gen Ahr:

- Evaluar otra estrategia terapéutica que permita la manipulación de la ocupación del Ahr; por ejemplo, el agonista omeprazol.
- Investigar la expresión génica derivada del tratamiento con TCDD para elucidar las diferencias entre el agonista y el antagonista del Ahr.
- Analizar el sistema glutamatérgico: niveles de glutamato, expresión de los receptores y transportadores.
- Hacer un registro electrofisiológico en rebanadas de cerebro para evaluar la respuesta del NMDAr.
- Explorar la participación del receptor 7-acetil colina nicotínico ($\alpha 7nAChR$) y del receptor acoplado a proteína G (GPR35) en la modulación de los niveles de KYNA.

Desarrollar un ratón sin el receptor de hidrocarburos arilo pero que sobreexpresa a la htt mutada.

- Evaluar en el ratón doble transgénico si una mayor disponibilidad de Kyn tiene el efecto neuroprotector ante el daño causado por la sobre expresión de la htt mutada.

11. Bibliografía

1. Pringsheim, T., et al., *The incidence and prevalence of Huntington's disease: a systematic review and meta-analysis*. *Mov Disord*, 2012. **27**(9): p. 1083-91.
2. Gusella, J.F., et al., *A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease*. *Nature*, 1983. **306**(5940): p. 234-8.
3. *A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group*. *Cell*, 1993. **72**(6): p. 971-83.
4. Kehoe, P., et al., *Age of onset in Huntington disease: sex specific influence of apolipoprotein E genotype and normal CAG repeat length*. *J Med Genet*, 1999. **36**(2): p. 108-11.
5. Andrew, S.E., et al., *The relationship between trinucleotide (CAG) repeat length and clinical features of Huntington's disease*. *Nat Genet*, 1993. **4**(4): p. 398-403.
6. Estrada Sanchez, A.M., J. Mejia-Toiber, and L. Massieu, *Excitotoxic neuronal death and the pathogenesis of Huntington's disease*. *Arch Med Res*, 2008. **39**(3): p. 265-76.
7. Abada, Y.S., R. Schreiber, and B. Ellenbroek, *Motor, emotional and cognitive deficits in adult BACHD mice: a model for Huntington's disease*. *Behav Brain Res*, 2013. **238**: p. 243-51.
8. Zeef, D.H., et al., *Motor and non-motor behaviour in experimental Huntington's disease*. *Behav Brain Res*, 2012. **226**(2): p. 435-9.
9. DiFiglia, M., et al., *Huntingtin is a cytoplasmic protein associated with vesicles in human and rat brain neurons*. *Neuron*, 1995. **14**(5): p. 1075-81.
10. Hatters, D.M., *Protein misfolding inside cells: the case of huntingtin and Huntington's disease*. *IUBMB Life*, 2008. **60**(11): p. 724-8.
11. Zheng, Z. and M.I. Diamond, *Huntington disease and the huntingtin protein*. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2012. **107**: p. 189-214.
12. Graveland, G.A., R.S. Williams, and M. DiFiglia, *Evidence for degenerative and regenerative changes in neostriatal spiny neurons in Huntington's disease*. *Science*, 1985. **227**(4688): p. 770-3.
13. Vonsattel, J.P., et al., *Neuropathological classification of Huntington's disease*. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1985. **44**(6): p. 559-77.
14. Spargo, E., I.P. Everall, and P.L. Lantos, *Neuronal loss in the hippocampus in Huntington's disease: a comparison with HIV infection*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1993. **56**(5): p. 487-91.
15. Heinsen, H., et al., *Nerve cell loss in the thalamic mediodorsal nucleus in Huntington's disease*. *Acta Neuropathol*, 1999. **97**(6): p. 613-22.
16. Jeste, D.V., L. Barban, and J. Parisi, *Reduced Purkinje cell density in Huntington's disease*. *Exp Neurol*, 1984. **85**(1): p. 78-86.
17. Beal, M.F. and R.J. Ferrante, *Experimental therapeutics in transgenic mouse models of Huntington's disease*. *Nat Rev Neurosci*, 2004. **5**(5): p. 373-84.
18. Reddy, P.H., P. Mao, and M. Manczak, *Mitochondrial structural and functional dynamics in Huntington's disease*. *Brain Res Rev*, 2009. **61**(1): p. 33-48.
19. Jin, Y.N. and G.V. Johnson, *The interrelationship between mitochondrial dysfunction and transcriptional dysregulation in Huntington disease*. *J Bioenerg Biomembr*, 2010. **42**(3): p. 199-205.

-
20. Perez-Severiano, F., C. Rios, and J. Segovia, *Striatal oxidative damage parallels the expression of a neurological phenotype in mice transgenic for the mutation of Huntington's disease*. Brain Res, 2000. **862**(1-2): p. 234-7.
 21. Perez-Severiano, F., et al., *Study of oxidative damage and antioxidant systems in two Huntington's disease rodent models*. Methods Mol Biol, 2013. **1010**: p. 177-200.
 22. Pouladi, M.A., A.J. Morton, and M.R. Hayden, *Choosing an animal model for the study of Huntington's disease*. Nat Rev Neurosci, 2013. **14**(10): p. 708-21.
 23. Schwarcz, R., W.O. Whetsell, Jr., and R.M. Mangano, *Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain*. Science, 1983. **219**(4582): p. 316-8.
 24. Leipnitz, G., et al., *Quinolinic acid reduces the antioxidant defenses in cerebral cortex of young rats*. Int J Dev Neurosci, 2005. **23**(8): p. 695-701.
 25. Greene, J.G., et al., *Inhibition of succinate dehydrogenase by malonic acid produces an "excitotoxic" lesion in rat striatum*. J Neurochem, 1993. **61**(3): p. 1151-4.
 26. Shimano, Y., et al., *Chronically administered 3-nitropropionic acid produces selective lesions in the striatum and reduces muscle tonus*. Obes Res, 1995. **3 Suppl 5**: p. 779S-784S.
 27. Vonsattel, J.P., *Huntington disease models and human neuropathology: similarities and differences*. Acta Neuropathol, 2008. **115**(1): p. 55-69.
 28. Mangiarini, L., et al., *Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice*. Cell, 1996. **87**(3): p. 493-506.
 29. Stone, T.W., *Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids*. Pharmacol Rev, 1993. **45**(3): p. 309-79.
 30. Speciale, C., et al., *High-affinity uptake of L-kynurenine by a Na⁺-independent transporter of neutral amino acids in astrocytes*. J Neurosci, 1989. **9**(6): p. 2066-72.
 31. Schwarcz, R., et al., *Kynurenines in the mammalian brain: when physiology meets pathology*. Nat Rev Neurosci, 2012. **13**(7): p. 465-77.
 32. Perkins, M.N. and T.W. Stone, *An iontophoretic investigation of the actions of convulsant kynurenines and their interaction with the endogenous excitant quinolinic acid*. Brain Res, 1982. **247**(1): p. 184-7.
 33. Hilmas, C., et al., *The brain metabolite kynurenic acid inhibits alpha7 nicotinic receptor activity and increases non-alpha7 nicotinic receptor expression: physiopathological implications*. J Neurosci, 2001. **21**(19): p. 7463-73.
 34. Rassoulpour, A., et al., *Nanomolar concentrations of kynurenic acid reduce extracellular dopamine levels in the striatum*. J Neurochem, 2005. **93**(3): p. 762-5.
 35. Wu, H.Q., et al., *The astrocyte-derived alpha7 nicotinic receptor antagonist kynurenic acid controls extracellular glutamate levels in the prefrontal cortex*. J Mol Neurosci, 2010. **40**(1-2): p. 204-10.
 36. Wang, J., et al., *Kynurenic acid as a ligand for orphan G protein-coupled receptor GPR35*. J Biol Chem, 2006. **281**(31): p. 22021-8.
 37. Lugo-Huitron, R., et al., *On the antioxidant properties of kynurenic acid: free radical scavenging activity and inhibition of oxidative stress*. Neurotoxicol Teratol, 2011. **33**(5): p. 538-47.
 38. Perkins, M.N. and T.W. Stone, *Pharmacology and regional variations of quinolinic acid-evoked excitations in the rat central nervous system*. J Pharmacol Exp Ther, 1983. **226**(2): p. 551-7.
 39. Tavares, R.G., et al., *Quinolinic acid stimulates synaptosomal glutamate release and inhibits glutamate uptake into astrocytes*. Neurochem Int, 2002. **40**(7): p. 621-7.

-
40. Platenik, J., et al., *Quinolinic acid-iron(ii) complexes: slow autoxidation, but enhanced hydroxyl radical production in the Fenton reaction*. *Free Radic Res*, 2001. **34**(5): p. 445-59.
 41. Santamaria, A. and C. Rios, *MK-801, an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, blocks quinolinic acid-induced lipid peroxidation in rat corpus striatum*. *Neurosci Lett*, 1993. **159**(1-2): p. 51-4.
 42. Schwarcz, R., et al., *Of mice, rats and men: Revisiting the quinolinic acid hypothesis of Huntington's disease*. *Prog Neurobiol*, 2010. **90**(2): p. 230-45.
 43. Flores-Soto, M.E., et al., *[Structure and function of NMDA-type glutamate receptor subunits]*. *Neurologia*, 2012. **27**(5): p. 301-10.
 44. Olney, J.W. and T. de Gubareff, *Glutamate neurotoxicity and Huntington's chorea*. *Nature*, 1978. **271**(5645): p. 557-9.
 45. Huang, P., et al., *Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on the expression of cytochrome P450 1A1, the aryl hydrocarbon receptor, and the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator in rat brain and pituitary*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2000. **169**(2): p. 159-67.
 46. Hankinson, O., *The aryl hydrocarbon receptor complex*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1995. **35**: p. 307-40.
 47. Riddick, D.S., et al., *2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin versus 3-methylcholanthrene: comparative studies of Ah receptor binding, transformation, and induction of CYP1A1*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(16): p. 12118-28.
 48. Sholts, S.B., et al., *In utero/lactational and adult exposures to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) show differential effects on craniofacial development and growth in rats*. *Toxicology*, 2015. **337**: p. 30-8.
 49. Fader, K.A., et al., *2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin Alters Lipid Metabolism and Depletes Immune Cell Populations in the Jejunum of C57BL/6 Mice*. *Toxicol Sci*, 2015. **148**(2): p. 567-80.
 50. Fullerton, A.M., R.A. Roth, and P.E. Ganey, *Pretreatment with TCDD exacerbates liver injury from Concanavalin A: critical role for NK cells*. *Toxicol Sci*, 2013. **136**(1): p. 72-85.
 51. Casper, R.F., et al., *Resveratrol has antagonist activity on the aryl hydrocarbon receptor: implications for prevention of dioxin toxicity*. *Mol Pharmacol*, 1999. **56**(4): p. 784-90.
 52. Wang, Q., et al., *Resveratrol protects against global cerebral ischemic injury in gerbils*. *Brain Res*, 2002. **958**(2): p. 439-47.
 53. Soleas, G.J., et al., *Absorption of trans-resveratrol in rats*. *Methods Enzymol*, 2001. **335**: p. 145-54.
 54. Pasinetti, G.M., et al., *Neuroprotective and metabolic effects of resveratrol: therapeutic implications for Huntington's disease and other neurodegenerative disorders*. *Exp Neurol*, 2011. **232**(1): p. 1-6.
 55. Kumar, P., et al., *Effect of resveratrol on 3-nitropropionic acid-induced biochemical and behavioural changes: possible neuroprotective mechanisms*. *Behav Pharmacol*, 2006. **17**(5-6): p. 485-92.
 56. Virgili, M. and A. Contestabile, *Partial neuroprotection of in vivo excitotoxic brain damage by chronic administration of the red wine antioxidant agent, trans-resveratrol in rats*. *Neurosci Lett*, 2000. **281**(2-3): p. 123-6.
 57. Parker, A.J., et al., *[Resveratrol rescues mutant polyglutamine cytotoxicity in nematode and mammalian neurons]*. *Med Sci (Paris)*, 2005. **21**(5): p. 556-7.
 58. DiNatale, B.C., et al., *Kynurenic acid is a potent endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand that synergistically induces interleukin-6 in the presence of inflammatory signaling*. *Toxicol Sci*, 2010. **115**(1): p. 89-97.

-
59. Opitz, C.A., et al., *An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor*. *Nature*, 2011. **478**(7368): p. 197-203.
 60. Schwarcz, R., E. Okuno, and R.J. White, *Basal ganglia lesions in the rat: effects on quinolinic acid metabolism*. *Brain Res*, 1989. **490**(1): p. 103-9.
 61. Bruyn, R.P. and J.C. Stoof, *The quinolinic acid hypothesis in Huntington's chorea*. *J Neurol Sci*, 1990. **95**(1): p. 29-38.
 62. Foster, A.C., et al., *Kynurenic acid blocks neurotoxicity and seizures induced in rats by the related brain metabolite quinolinic acid*. *Neurosci Lett*, 1984. **48**(3): p. 273-8.
 63. Miranda, A.F., et al., *Protection against quinolinic acid-mediated excitotoxicity in nigrostriatal dopaminergic neurons by endogenous kynurenic acid*. *Neuroscience*, 1997. **78**(4): p. 967-75.
 64. Miranda, A.F., et al., *Quinolinic acid lesion of the nigrostriatal pathway: effect on turning behaviour and protection by elevation of endogenous kynurenic acid in Rattus norvegicus*. *Neurosci Lett*, 1999. **262**(2): p. 81-4.
 65. Santamaria, A., et al., *Systemic DL-kynurenine and probenecid pretreatment attenuates quinolinic acid-induced neurotoxicity in rats*. *Neuropharmacology*, 1996. **35**(1): p. 23-8.
 66. Amaral, M., et al., *The causative role and therapeutic potential of the kynurenine pathway in neurodegenerative disease*. *J Mol Med (Berl)*, 2013. **91**(6): p. 705-13.
 67. Pearson, S.J. and G.P. Reynolds, *Increased brain concentrations of a neurotoxin, 3-hydroxykynurenine, in Huntington's disease*. *Neurosci Lett*, 1992. **144**(1-2): p. 199-201.
 68. Guidetti, P., et al., *Early kynurenergic impairment in Huntington's disease and in a transgenic animal model*. *Neurosci Lett*, 2000. **283**(3): p. 233-5.
 69. Guidetti, P., et al., *Elevated brain 3-hydroxykynurenine and quinolinate levels in Huntington disease mice*. *Neurobiol Dis*, 2006. **23**(1): p. 190-7.
 70. Schwarcz, R., et al., *3-Hydroxyanthranilate oxygenase activity is increased in the brains of Huntington disease victims*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. **85**(11): p. 4079-81.
 71. Beal, M.F., et al., *Kynurenine pathway measurements in Huntington's disease striatum: evidence for reduced formation of kynurenic acid*. *J Neurochem*, 1990. **55**(4): p. 1327-39.
 72. Beal, M.F., et al., *Kynurenic acid concentrations are reduced in Huntington's disease cerebral cortex*. *J Neurol Sci*, 1992. **108**(1): p. 80-7.
 73. Jauch, D., et al., *Dysfunction of brain kynurenic acid metabolism in Huntington's disease: focus on kynurenine aminotransferases*. *J Neurol Sci*, 1995. **130**(1): p. 39-47.
 74. Cepeda, C., et al., *NMDA receptor function in mouse models of Huntington disease*. *J Neurosci Res*, 2001. **66**(4): p. 525-39.
 75. Zeron, M.M., et al., *Increased sensitivity to N-methyl-D-aspartate receptor-mediated excitotoxicity in a mouse model of Huntington's disease*. *Neuron*, 2002. **33**(6): p. 849-60.
 76. Li, L., et al., *Role of NR2B-type NMDA receptors in selective neurodegeneration in Huntington disease*. *Neurobiol Aging*, 2003. **24**(8): p. 1113-21.
 77. Luthi-Carter, R., et al., *Complex alteration of NMDA receptors in transgenic Huntington's disease mouse brain: analysis of mRNA and protein expression, plasma membrane association, interacting proteins, and phosphorylation*. *Neurobiol Dis*, 2003. **14**(3): p. 624-36.
 78. Fan, M.M. and L.A. Raymond, *N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor function and excitotoxicity in Huntington's disease*. *Prog Neurobiol*, 2007. **81**(5-6): p. 272-93.
 79. Lievens, J.C., et al., *Impaired glutamate uptake in the R6 Huntington's disease transgenic mice*. *Neurobiol Dis*, 2001. **8**(5): p. 807-21.
 80. Moroni, F., et al., *Kynurenic acid: a metabolite with multiple actions and multiple targets in brain and periphery*. *J Neural Transm (Vienna)*, 2012. **119**(2): p. 133-9.

-
81. Carpenedo, R., et al., *Presynaptic kynurenate-sensitive receptors inhibit glutamate release*. Eur J Neurosci, 2001. **13**(11): p. 2141-7.
 82. Berlinguer-Palmini, R., et al., *GPR35 activation reduces Ca²⁺ transients and contributes to the kynurenic acid-dependent reduction of synaptic activity at CA3-CA1 synapses*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e82180.
 83. Guidetti, P., et al., *Astrocytic localization of kynurenine aminotransferase II in the rat brain visualized by immunocytochemistry*. Glia, 2007. **55**(1): p. 78-92.
 84. Heredi, J., et al., *Astrocytic and neuronal localization of kynurenine aminotransferase-2 in the adult mouse brain*. Brain Struct Funct, 2016.
 85. Fernandez-Salguero, P., et al., *Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor*. Science, 1995. **268**(5211): p. 722-6.
 86. Rodriguez-Sosa, M., et al., *Over-production of IFN-gamma and IL-12 in AhR-null mice*. FEBS Lett, 2005. **579**(28): p. 6403-10.
 87. Paxinos, G. and K.B.J. Franklin, *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, ed. third. 2008, San Diego
 88. Arregui, L., et al., *Adenoviral astrocyte-specific expression of BDNF in the striata of mice transgenic for Huntington's disease delays the onset of the motor phenotype*. Cell Mol Neurobiol, 2011. **31**(8): p. 1229-43.
 89. Perez-Severiano, F., B. Escalante, and C. Rios, *Nitric oxide synthase inhibition prevents acute quinolinate-induced striatal neurotoxicity*. Neurochem Res, 1998. **23**(10): p. 1297-302.
 90. Beal, M.F., et al., *Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid*. Nature, 1986. **321**(6066): p. 168-71.
 91. Gal, E.M. and A.D. Sherman, *Synthesis and metabolism of L-kynurenine in rat brain*. J Neurochem, 1978. **30**(3): p. 607-13.
 92. Speciale, C. and R. Schwarcz, *Uptake of kynurenine into rat brain slices*. J Neurochem, 1990. **54**(1): p. 156-63.
 93. Han, Q., et al., *Structure, expression, and function of kynurenine aminotransferases in human and rodent brains*. Cell Mol Life Sci, 2010. **67**(3): p. 353-68.
 94. Guidetti, P., E. Okuno, and R. Schwarcz, *Characterization of rat brain kynurenine aminotransferases I and II*. J Neurosci Res, 1997. **50**(3): p. 457-65.
 95. Saran, T., et al., *Kynurenic acid synthesis in cerebral cortical slices of rats with progressing symptoms of thioacetamide-induced hepatic encephalopathy*. J Neurosci Res, 2004. **75**(3): p. 436-40.
 96. Obara-Michlewska, M., P. Tuszyńska, and J. Albrecht, *Ammonia upregulates kynurenine aminotransferase II mRNA expression in rat brain: a role for astrocytic NMDA receptors?* Metab Brain Dis, 2013. **28**(2): p. 161-5.
 97. Hilgier, W., et al., *Modulation by kynurenine of extracellular kynurenate and glutamate in cerebral cortex of rats with acute liver failure*. Pharmacol Rep, 2014. **66**(3): p. 466-70.
 98. Nozaki, K. and M.F. Beal, *Neuroprotective effects of L-kynurenine on hypoxia-ischemia and NMDA lesions in neonatal rats*. J Cereb Blood Flow Metab, 1992. **12**(3): p. 400-7.
 99. Zadori, D., et al., *Neuroprotective effects of a novel kynurenic acid analogue in a transgenic mouse model of Huntington's disease*. J Neural Transm (Vienna), 2011. **118**(6): p. 865-75.
 100. Erhardt, S., et al., *The kynurenic acid hypothesis of schizophrenia*. Physiol Behav, 2007. **92**(1-2): p. 203-9.
 101. Alexander, K.S., et al., *Early developmental elevations of brain kynurenic acid impair cognitive flexibility in adults: reversal with galantamine*. Neuroscience, 2013. **238**: p. 19-28.

-
102. Lalonde, R., A.N. Bensoula, and M. Filali, *Rotorod sensorimotor learning in cerebellar mutant mice*. Neurosci Res, 1995. **22**(4): p. 423-6.
 103. Ogura, T., et al., *Impaired acquisition of skilled behavior in rotarod task by moderate depletion of striatal dopamine in a pre-symptomatic stage model of Parkinson's disease*. Neurosci Res, 2005. **51**(3): p. 299-308.
 104. Autry, A.E., et al., *NMDA receptor blockade at rest triggers rapid behavioural antidepressant responses*. Nature, 2011. **475**(7354): p. 91-5.
 105. Ballard, E.D., et al., *Improvement in suicidal ideation after ketamine infusion: relationship to reductions in depression and anxiety*. J Psychiatr Res, 2014. **58**: p. 161-6.
 106. Mishra, J. and A. Kumar, *Improvement of mitochondrial function by paliperidone attenuates quinolinic acid-induced behavioural and neurochemical alterations in rats: implications in Huntington's disease*. Neurotox Res, 2014. **26**(4): p. 363-81.
 107. Cao, Y., et al., *Caspase-1 inhibitor Ac-YVAD-CHO attenuates quinolinic acid-induced increases in p53 and apoptosis in rat striatum*. Acta Pharmacol Sin, 2005. **26**(2): p. 150-4.
 108. Ceresoli, G., P. Guidetti, and R. Schwarcz, *Metabolism of [5-(3)H]kynurenine in the developing rat brain in vivo: effect of intrastriatal ibotenate injections*. Brain Res Dev Brain Res, 1997. **100**(1): p. 73-81.
 109. Gramsbergen, J.B., et al., *Brain-specific modulation of kynurenic acid synthesis in the rat*. J Neurochem, 1997. **69**(1): p. 290-8.
 110. Lin, C.H., et al., *Knockdown of the aryl hydrocarbon receptor attenuates excitotoxicity and enhances NMDA-induced BDNF expression in cortical neurons*. J Neurochem, 2009. **111**(3): p. 777-89.
 111. Petersen, S.L., et al., *Distribution of mRNAs encoding the arylhydrocarbon receptor, arylhydrocarbon receptor nuclear translocator, and arylhydrocarbon receptor nuclear translocator-2 in the rat brain and brainstem*. J Comp Neurol, 2000. **427**(3): p. 428-39.
 112. Filbrandt, C.R., et al., *Presence and functional activity of the aryl hydrocarbon receptor in isolated murine cerebral vascular endothelial cells and astrocytes*. Neurotoxicology, 2004. **25**(4): p. 605-16.
 113. Nebert, D.W., et al., *Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer*. J Biol Chem, 2004. **279**(23): p. 23847-50.
 114. Anandhan, A., et al., *Resveratrol attenuates oxidative stress and improves behaviour in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) challenged mice*. Ann Neurosci, 2010. **17**(3): p. 113-9.
 115. Ho, D.J., et al., *Resveratrol protects against peripheral deficits in a mouse model of Huntington's disease*. Exp Neurol, 2010. **225**(1): p. 74-84.
 116. Naia, L., et al., *Comparative Mitochondrial-Based Protective Effects of Resveratrol and Nicotinamide in Huntington's Disease Models*. Mol Neurobiol, 2016.
 117. Prut, L. and C. Belzung, *The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review*. Eur J Pharmacol, 2003. **463**(1-3): p. 3-33.
 118. Francis, L., et al., *[Behavior characterization of a model of Huntington's disease in rats, induced by quinolinic acid]*. Rev Neurol, 2000. **30**(11): p. 1016-21.
 119. Zhu, M., et al., *Microtransplantation of whole ganglionic eminence cells ameliorates motor deficit, enlarges the volume of grafts, and prolongs survival in a rat model of Huntington's disease*. J Neurosci Res, 2013. **91**(12): p. 1563-71.