



**CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE
FISIOLOGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS**

**La ausencia del receptor de hidrocarburos de arilo en el ratón
R6/1 confiere protección en el deterioro motor y conductual
presente en un modelo de la enfermedad de Huntington**

**TESIS QUE PRESENTA
LBD Quetzalli Denisse Ángeles López**

Para obtener el grado de
Maestra en Ciencias

En la especialidad de
Neurobiología celular y molecular

Director de la Tesis:
Dr. José Segovia Vila

CIUDAD DE MÉXICO

AGOSTO, 2017

AGRADECIMIENTOS

A CINVESTAV unidad Zacatenco y a CONACYT por la oportunidad de continuar mi formación académica.

A mi tutor, Dr. José Segovia Vila por darme la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo y confiarme la realización del presente trabajo.

A mi asesora, Dra. Francisca Pérez Severiano por su invaluable apoyo en este proyecto y por la confianza y enseñanzas que me ha brindado a lo largo de mi estancia en CINVESTAV.

A mi asesor, Dr. Benjamín Florán Garduño por sus observaciones y sugerencias que ayudaron a enriquecer este trabajo.

A la Dra. María Asunción Cabañas Cortés del Departamento de Biología Celular, por la asesoría y apoyo brindado en el manejo de los ratones nulos para el Ahr.

Al técnico Rubén Sánchez por su apoyo en el manejo y mantenimiento de los ratones usados en este proyecto.

A la Dra. Lucía Gabriela García Lara por sus aportaciones a este proyecto.

Al Dr. Rolando Castañeda Arellano, por compartir sus conocimientos con todos los miembros del laboratorio y por brindarme su apoyo, confianza y amistad.

Al QFI Leonardo Moreno García por el apoyo técnico.

A todos mis compañeros de Lab. 44: Daniel, Erik, Liz, Marco, Nico, Rosy, Manuel y Eli. A las auxiliares de investigación: Paula y Araceli, por el apoyo en el laboratorio.

A todos los investigadores del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, por sus enseñanzas desde mi ingreso a CINVESTAV.

Los ratones transgénicos R6/1 fueron comprados a los laboratorios Jackson, con el proyecto de Ciencia Básica del Conacyt otorgado a la Dra. Francisca Perez Severiano (CB 2014 Proyecto #241911).

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi familia. A mi papá Isaac, a mi mamá Ernestina y a mis hermanos Yesenia y Axel por todo su amor y apoyo, nada de esto sería posible sin ustedes.

A la familia Rosas Martínez y Sánchez Martínez, por su inmenso apoyo y cariño.

A mis amigos de la maestría: Lupita, Gustavo, Mary, Luis y Leo, por todos los momentos compartidos; y especialmente a Lore por su inmenso apoyo y cariño.

A mis amigos: Rafael, Bety, Andrea, Rogelio, Marco, Gerardo, Gabriel, Araceli, Rosa y Maleni, por todos los momentos compartidos.

ÍNDICE

RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	8
1. INTRODUCCIÓN.....	9
1.1 Signos y síntomas	10
1.2 Neuropatología	10
1.3 Huntingtina (htt)	11
1.4 Alteraciones mitocondriales y estrés oxidante en EH	12
1.5 Modelos de la enfermedad de Huntington	12
1.5.1 Modelos bioquímicos.....	12
1.5.2 Modelos transgénicos	13
1.6 Vía de las kinureninas.....	14
1.7 Receptor de hidrocarburos arilo.....	17
2. ANTECEDENTES.....	18
3. JUSTIFICACIÓN.....	20
4. OBJETIVO GENERAL.....	20
5. OBJETIVOS PARTICULARES	20
6. MATERIAL Y MÉTODOS	21
6.1 Animales	21
6.1.1 Ratones C57BL/6 nulos-Ahr.....	21
6.1.2 Ratones de la línea R6/1	21
6.2 Reproducción de los ratones R6/1-Ahr-nulos	22
6.3 Genotipificación	22
6.3.1 Extracción del ADN de ratones transgénicos	22
6.3.2 Condiciones para la PCR	22

6.4	Actividad motora y conducta.....	24
6.4.1	Evaluación de la actividad motora.....	24
6.4.2	Evaluación de la conducta de <i>feet clasping</i>	24
6.4.3	Test de Rotarod.....	25
6.4.4	Prueba de la Caja claro-oscuro (Light-dark box test).	25
6.5	Análisis estadístico.	25
7.	RESULTADOS	26
7.1	Se desarrolló un ratón doble transgénico sin el receptor de hidrocarburos arilo que sobreexpresa a la huntingtina mutada (Genotipo: R6/1 Ahr -/-).....	26
7.2	El fenotipo del ratón R6/1 Ahr -/- es diferente al del ratón R6/1 Ahr +/+ 28	
7.3	La ausencia del receptor Ahr en el R6/1 no disminuye la pérdida del peso corporal.....	29
7.4	Los animales R6/1 Ahr ^{-/-} no presentan <i>feet-clasping</i>	31
7.5	Los ratones R6/1 Ahr ^{-/-} no presentan deterioro en su coordinación motriz a las 30 semanas	32
7.6	Los ratones R6/1 Ahr ^{-/-} no presentan deterioro en su conducta ambulatoria a las 30 semanas.....	34
7.7	La conducta de ansiedad en el ratón R6/1 Ahr ^{-/-} es normal.....	37
8.	DISCUSIÓN.....	39
9.	CONCLUSIONES	42
10.	PERSPECTIVAS.....	42
11.	BIBLIOGRAFÍA	43

RESUMEN

La enfermedad de Huntington (EH) es un trastorno neurodegenerativo hereditario ocasionado por una expansión anormal de repetidos del triplete CAG en el gen de la huntingtina, este gen codifica para una proteína con el mismo nombre. Los pacientes con EH presentan movimientos coreiformes, ocasionados por la pérdida de neuronas en el estriado y la corteza cerebral. Un mecanismo propuesto relacionado con la pérdida neuronal causada por el estrés oxidante, es el desbalance de algunos metabolitos de la vía de las kinureninas, ya que los pacientes con EH presentan un incremento de los niveles de ácido quinolínico y 3-hidroxicinurenina, sustancias productoras de radicales libres, y reducción en los niveles de ácido kinurénico (KYNA), metabolito antioxidante. Además, el KYNA es un neuroprotector, anticonvulsivante y de manera interesante, es ligando endógeno del receptor de hidrocarburos de arilo (Ahr). Trabajos previos demostraron que los ratones nulos para este receptor, presentan niveles elevados de KYNA y una mejora en la coordinación motora comparados con los ratones silvestres. Debido a lo anterior, se han planteado estrategias que permitan aumentar la disponibilidad de KYNA en modelos animales de la EH. Por lo tanto, en este estudio se reprodujo a través de retrocruzas a un ratón doble transgénico, con sobreexpresión de la huntingtina mutada y knock-out para el Ahr (R6/1Ahr^{-/-}). Nuestros resultados muestran que a las 30 semanas el ratón doble transgénico tiene un peso corporal similar al del ratón R6/1, sin embargo, la postura de *feet-clasping*, un indicativo de daño neuronal en el R6/1, no fue observada. Además, su coordinación motora y su conducta ambulatoria no se deterioraron a lo largo del tiempo a diferencia del ratón R6/1, pero su conducta exploratoria disminuyó. Por último, la conducta de ansiedad de los ratones dobles transgénicos resultó similar a la de los ratones silvestres. Proponemos que lo anterior puede ser atribuido al efecto del aumento en la disponibilidad de KYNA en el ratón doble transgénico. Este trabajo da evidencia de que la ausencia del Ahr evita el deterioro motor y conductual presente en un modelo transgénico de la EH.

ABSTRACT

Huntington's disease (HD) is an inherited neurodegenerative disorder. HD is caused by a CAG abnormal repeat expansion in the huntingtin gene (*IT15*) coding for a protein with the same name. Huntington disease patients present or develop choreiform movements that are caused by the loss of neurons in the striatum and cerebral cortex. One of the mechanisms proposed to explain neuronal loss by oxidative stress is the imbalance of some metabolites of the kynurenine pathway, and it was observed that HD patients have an increase in the levels of quinoline and 3-Hydroxykynurenine, metabolites that produce free radicals, and reduction in levels of kynurenic acid (KYNA), antioxidant metabolite. In addition, KYNA is a neuroprotective, anticonvulsant and interestingly, it is endogenous ligand of the aryl hydrocarbon receptor (Ahr). Previous work has shown that null mice for this receptor have elevated levels of KYNA and have improving motor coordination compared to wild type mice. Due to the above, strategies have been proposed to increase the availability of KYNA in animal models of HD. Therefore, in this study we used a double transgenic mouse, with mutated huntingtin overexpression and knockout for Ahr (R6/1 Ahr $-/-$). Our results show that at 30 weeks, the double transgenic mouse has a body weight similar to R6/1 mouse, however, feet-clasping posture, an indicative of neuronal damage in the R6/1, was not observed. In addition, its motor coordination and ambulatory behavior did not deteriorate over time unlike the R6/1 mouse, but its exploratory behavior decreased. Finally, the anxiety behavior of transgenic double mice was similar to wild type mice. We propose that the above can be attributed to the effect of increase in the availability of KYNA in the transgenic double mouse. This work provides evidence that the absence of Ahr avoids the motor and behavioral deterioration present in a transgenic model of HD.

1. INTRODUCCIÓN

La EH es un desorden neurodegenerativo progresivo que tiene una incidencia de aproximadamente a 0.38 individuos por cada 100,000 habitantes por año en todo el mundo, siendo Europa, Norte América y Australia, los países con mayor prevalencia (5.70 por 100,000 habitantes), a diferencia de Asia que presenta una prevalencia mucho menor (0.40 por 100,000) (Pringsheim et al., 2012). Su nombre es en honor al médico George Huntington, quién fue el primero en describirla en 1872. Sin embargo, fue hasta 1993 cuando se descubrió el gen causante de la EH (*IT15*).

El gen de la EH se localiza en la región 4p16.3 en el brazo corto del cromosoma 4, consta de 67 exones y codifica para la proteína huntingtina (htt) (Gusella et al., 1983). La EH ocurre por la expansión del codón CAG en el exón 1 del gen de la huntingtina (Mangiarini et al., 1996). El triplete CAG codifica para el aminoácido glutamina, por lo cual la expansión de éste provoca un número anormal de glutaminas en el extremo N-terminal de la proteína htt (Gusella et al., 1983). La presencia de un número mayor a 35 repetidos de CAG aumenta la posibilidad de que el individuo presente los síntomas característicos de la enfermedad, a diferencia de los individuos sanos que en promedio presentan entre 17 y 20 repetidos (Kremer et al., 1994). Por otra parte, los repetidos entre 36 y 39 presentan penetrancia genética reducida, por ello un individuo con un número de repetidos dentro de ese rango no desarrollará necesariamente los síntomas característicos de la enfermedad durante su vida, sin embargo, su descendencia se encuentra en riesgo de desarrollar la EH. Además, el número de repetidos de CAG está inversamente relacionado con la edad de inicio de la sintomatología (Andrew et al., 1993; Rubinsztein et al., 1993); por tal razón, un número mayor a 60 repetidos está asociado a una edad temprana de inicio de los síntomas de EH, que también es conocido como EH juvenil. También se ha observado que los pacientes homocigotos presentan una edad de inicio igual a los pacientes heterocigotos, sin embargo, la progresión de la enfermedad es más severa en los

homocigotos (Lee et al., 2012). El número de repetidos tiende a extenderse cuando se da la formación de las células sexuales y generalmente sucede cuando el gen es heredado por vía paterna (Kehoe et al., 1999). Las mutaciones espontáneas son muy raras y sólo explican el 0.1% de los casos de la EH.

1.1 Signos y síntomas

Los primeros síntomas de la EH se presentan entre la tercera y quinta década de vida y se dividen principalmente en síntomas psiquiátricos, cognitivos y motores, siendo los psiquiátricos y cognitivos los primeros en presentarse. Las anomalías motoras resultan progresivas, así como el deterioro intelectual (Budworth & McMurray, 2013).

La progresión de las alteraciones motoras sigue tres estadios. Inicialmente, los movimientos voluntarios son acompañados por temblores; progresivamente, durante una segunda fase o fase hipercinética, los pacientes pierden la coordinación de su cuerpo, debido a la presencia de movimientos involuntarios abruptos (coreiformes) incluyendo los músculos de las piernas, cabeza y tronco, limitando las capacidades diarias de los pacientes. Además, en esta fase hay deterioro de las funciones cognitivas y pérdida de peso debido a un estado hipermetabólico por el que cursan los pacientes. En la etapa final (aproximadamente 20 años después de la edad de inicio), los movimientos coreiformes son sustituidos por rigidez y bradicinesia. La muerte de los pacientes generalmente ocurre en esta etapa (Grimbergen et al., 2008).

1.2 Neuropatología

Las principales alteraciones fenotípicas en la EH son consecuencia de la pérdida selectiva de neuronas espinosas medianas en el caudado, el putámen y el globo pálido (Graveland et al., 1985; Vonsattel et al., 1985). Las neuronas espinosas medianas estriatales son las más vulnerables; éstas contienen encefalina y proyectan al globo pálido externo (Rubinsztein, 2003). Otras regiones del cerebro que también resultan muy afectadas incluyen la sustancia

negra, las capas corticales 3, 5 y 6 y la región CA1 del hipocampo (Spargo et al., 1993), el giro angular en el lóbulo parietal (Macdonald et al., 1997), las células de Purkinje del cerebelo (Barban & Paris, 1984), el núcleo tuberal lateral del hipotálamo y el complejo centromedial-parafascicular del tálamo (Heinsen et al., 1999).

Otra de las características patológicas de la EH es la presencia de inclusiones nucleares y citoplasmáticas que contienen la htt mutada (Davies et al., 1997); sin embargo, algunos estudios sugieren que estas inclusiones no son predictores de la disfunción celular, por el contrario, parecen ser mediadas por estados intermedios de agregados de poliglutamina (Mukai et al., 2005).

1.3 Huntingtina (htt)

La htt humana es una proteína de 350 kDa expresada en todas las células humanas, aunque su expresión es mayor en el sistema nervioso central y en los testículos (DiFiglia et al., 1995). Su función aún no es bien conocida. Sin embargo, es una proteína necesaria para el desarrollo y el funcionamiento normal del cerebro en humanos. Además, ha sido asociada con múltiples organelos en la célula como son núcleo, membrana plasmática, vesículas endocíticas, retículo endoplásmico, endosomas, aparato de Golgi y mitocondria (Trottier et al., 1995), por lo anterior se cree que puede tener funciones de andamiaje.

La htt presenta muchas modificaciones postraduccionales incluyendo ubiquitinación, fosforilación, acetilación, sumoilación y palmitoilación. Estas modificaciones pueden regular su estabilidad, localización y función (DiFiglia et al., 1997; Goldberg et al., 1996). Algunos estudios también han implicado a la htt en transcripción, debido a que interactúa con varios factores de transcripción y proteínas reguladoras de la transcripción. Por ejemplo, se ha propuesto que la htt regula la producción del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Zuccato et al., 2003; Zuccato & Cattaneo, 2007).

1.4 Alteraciones mitocondriales y estrés oxidante en EH

La mitocondria es una fuente importante de especies reactivas de oxígeno (ERO) y además es un blanco clave del daño generado por las ERO. Las ERO ocasionan peroxidación de lípidos y daño oxidante al DNA por la formación de 8-hidroxy-2'-deosiguanosina (8-OHdG). En modelos de ratones transgénicos de la EH ha sido encontrado un incremento en la peroxidación de lípidos en el estriado (Pérez-Severiano et al., 2000). Además, también se ha encontrado daño oxidante al DNA tanto en modelos de ratones transgénicos como en pacientes con EH (Polidori et al., 1999; Bogdanov et al., 2001). El daño a la mitocondria observado en la EH ocasionado por la htt mutada ocurre por diversos mecanismos que incluyen la reducción de la producción de energía y el potencial de membrana, alteraciones en la homeostasis del calcio, aumento del estrés oxidante y la activación de vías apoptóticas mediadas por caspasas (Browne et al., 1997; Browne et al., 1999; Brustovetsky et al., 2005; Panov et al., 2002).

También se ha reportado la reducción en la actividad de varias enzimas involucradas en el metabolismo energético que incluyen los complejos I, II, III y IV (Arenas et al., 1998; Browne, 2008; Gash, & Mann, 1996). La reducción en la producción del ATP y el fallo energético pueden hacer a las neuronas estriatales más vulnerables a otros daños patológicos.

1.5 Modelos de la enfermedad de Huntington

1.5.1 Modelos bioquímicos

Los primeros modelos para el estudio de la EH aparecieron una vez que la mutación que ocasiona la enfermedad fue descubierta y se basaron en el uso de excitotoxinas administradas de forma intra-estriatal como el ácido kaínico y el ácido quinolínico que causan la muerte selectiva de las neuronas espinosas medianas (Coyle & Schwarcz, 1976; McGeer & McGeer, 1976; Schwarcz et al., 1983; Beal et al., 1986). Posteriormente, fueron usados fármacos que alteraran la función de la mitocondria como son el ácido 3-Nitropropiónico, el

cual induce un daño patológico similar en el estriado de ratones (Bogdanov et al., 1998).

1.5.2 Modelos transgénicos

Los primeros modelos transgénicos se desarrollaron en cultivos celulares y animales como *Drosophila*, *C. elegans*, rata y ratón, los cuales fueron modificados genéticamente para expresar a la htt mutada. Hoy en día se han desarrollado varios modelos transgénicos y *knock-in*.

1.5.2.1 R6/1 y R6/2

La línea R6 fue la primera línea de ratones transgénicos portadores de la mutación de la EH. Los ratones expresan el exón 1 del gen de la huntingtina humana con una expansión de repetidos CAG bajo el control del promotor de la htt humana. La línea R6/1 tiene alrededor de 116 repetidos del triplete CAG. El transgén se expresa en un 31% de los niveles endógenos. La línea R6/2 tiene alrededor de 150 repetidos de CAG que son expresados en un 75% de los niveles endógenos (Mangiarini et al., 1996).

1.5.2.2 N171-82Q

El ratón transgénico N171-82Q expresa un cDNA que codifica para el fragmento N-terminal de la htt con 82 glutaminas bajo el control del promotor prion del ratón. Los síntomas conductuales en este ratón comienzan a las 10 semanas de edad (Schilling et al., 1999).

1.5.2.3 Modelos transgénicos YAC y BAC

Los ratones transgénicos con YAC fueron generados por la expresión del gen completo de la htt humana con números variables de repetidos CAG (Hodgson et al., 1999). Los modelos transgénicos por la técnica BAC así como los YAC, permiten la expresión del gen de la htt humana bajo el control de los elementos endógenos regulatorios de la htt. Este modelo ha sido usado principalmente para definir el efecto de mutaciones específicas en la región N-terminal del gen de la htt (Gu et al., 2009).

1.5.2.4 Modelos knock-in

En los modelos *knock-in* el gen endógeno de la htt en el ratón es reemplazado por la htt mutada que posee la expansión de repetidos CAG (Menalled et al., 2003). A pesar de que en teoría estos modelos deberían reproducir de forma “fidel” la enfermedad de los humanos, se ha observado que el fenotipo que muestran es más leve que el observado en otros modelos y en los humanos (Chang et al., 2015).

1.6 Vía de las kinureninas

El triptófano es un aminoácido esencial para los seres humanos y la principal ruta por la cual se metaboliza es la vía de las kinureninas (VK) (Figura 1), la VK produce algunos metabolitos neuroactivos y otros que tienen la capacidad de generar radicales libres, así como también permite la formación del cofactor nicotinamin-adenin-dinucleótido (NAD⁺) (Amaral et al., 2013).

El ácido quinolínico (QUIN), metabolito producto de la vía de las kinureninas, es un agonista competitivo del receptor NMDA que contiene las subunidades NR2A y NR2B; su potencial neurotóxico puede atribuirse a distintos mecanismos que incluyen la estimulación de la liberación de glutamato sinaptosomal, la inhibición de la recaptura del glutamato por los astrocitos, la generación de intermediarios reactivos de oxígeno, la eliminación de antioxidantes endógenos y la peroxidación de moléculas lipídicas (Guillemin, 2012).

El KYNA es un antagonista endógeno del receptor NMDA que actúa inhibiendo el sitio de unión a glicina del receptor. Además, también es antagonista de los receptores de glutamato que responden al ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico (AMPA) o ácido kaínico, aunque con menor afinidad (Perkins & Stone, 1982; Stone & Darlington, 2002).

También se sabe que el KYNA puede bloquear las acciones de la acetilcolina en el SNC debido a que actúa sobre los receptores α 7nicotinacetilcolinérgicos (α 7nAChR). Lo anterior resulta importante debido a que se ha reportado que

las terminales axonales glutamatérgicas en la neocorteza del humano y el estriado de la rata expresan estos receptores $\alpha 7nAChR$ que promueven la liberación de glutamato, por lo cual se plantea que el KYNA puede suprimir la liberación presináptica de glutamato, es decir, es un antagonista presináptico de estos receptores (Marchi et al., 2002).

Además, el KYNA induce la producción de inositol trifosfato a través del receptor acoplado a proteína G 35 (GPR35), con lo cual promueve la movilización de Ca^{2+} . Sin embargo, la expresión de GPR35 en el cerebro es baja (Wang et al., 2006). Estudios *in vivo* e *in vitro* sugieren que el KYNA es un potente secuestrador de radicales libres y además actúa como un antioxidante endógeno, aumentando así su efecto neuroprotector (Lugo-Huitrón et al., 2011).

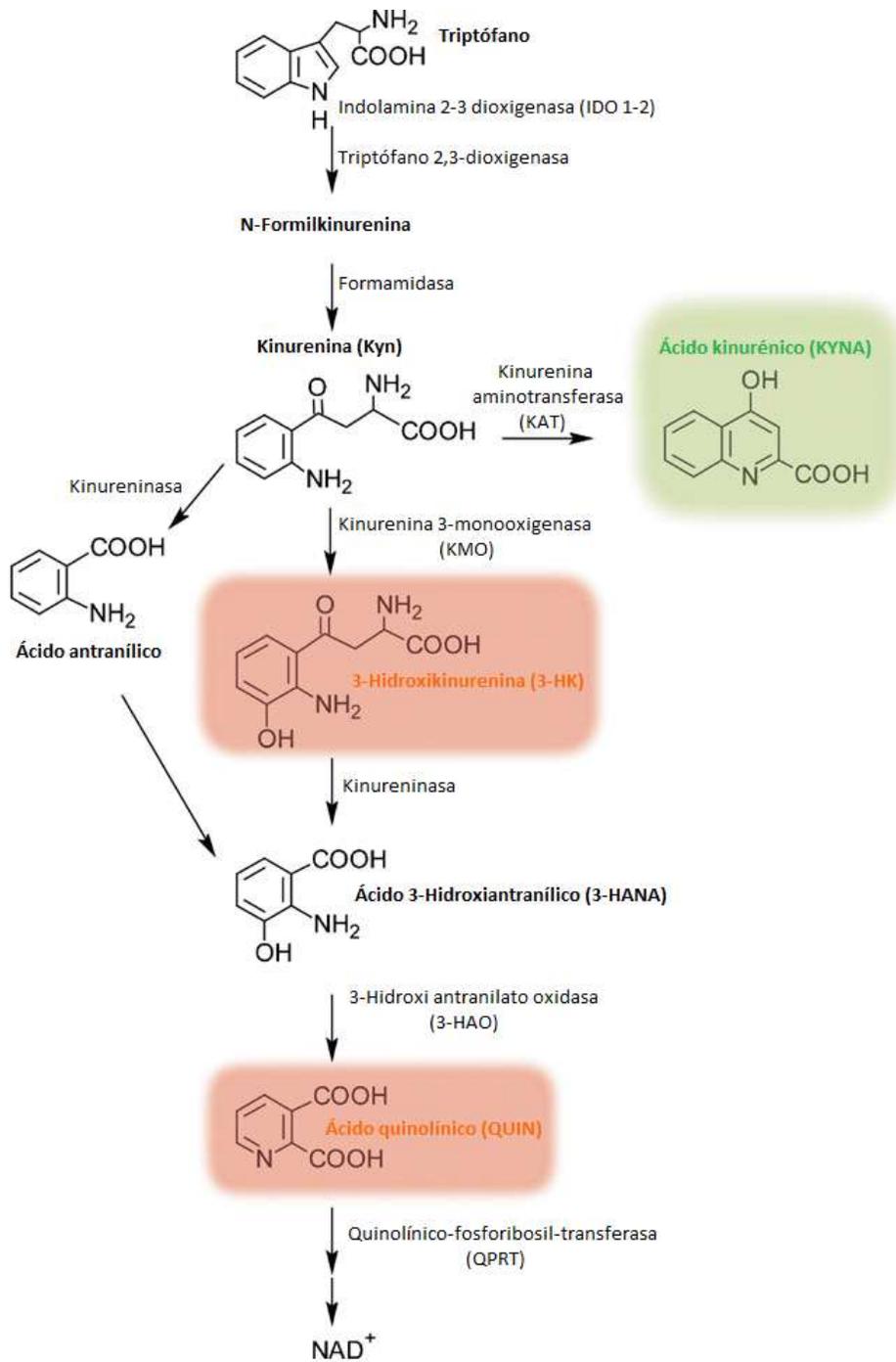


Figura 1. Vía de las kinurenas. Modificado de Amaral et al., 2013.

1.7 Receptor de hidrocarburos arilo

El Ahr es un factor de transcripción de la familia hélice-bucle-hélice/Per-Ant-Sim. En el cerebro de mamíferos el Ahr es ampliamente expresado en la corteza cerebral, hipocampo, hipotálamo y cerebelo (Petersen et al., 2000; Powers et al., 2005; Lin et al., 2008). El Ahr está involucrado en el ritmo circadiano e induce genes del citocromo P450 como son el *CYP1A2* y el *CYP1B1*.

La kinurenina (Opitz et al., 2011) y el ácido kinurénico (DiNatale et al., 2010) son ligandos endógenos del Ahr.

2. ANTECEDENTES

En múltiples modelos experimentales donde se ha inducido neurotoxicidad por la aplicación de kainato, ibotenate, ácido quinolínico y NMDA se ha probado que el ácido kinurénico tiene un papel neuroprotector (Winn et al., 1991).

En pacientes con EH se han encontrado niveles bajos de KYNA en corteza (Beal et al., 1992), estriado (Beal et al., 1990; Jauch et al., 1995) y líquido cefalorraquídeo (Heyes et al., 1992), de igual forma se ha observado disminución en la actividad de la enzima kinurenina aminotransferasa (KAT) en el estriado, la cual da origen al KYNA (Beal et al., 1990; Jauch et al., 1995).

También se ha encontrado que la actividad de la enzima 3-hidroxi antranilato oxidasa (3-HAO), la cual además de permitir la generación de QUIN es productora de radicales libres, está elevada en el cerebro de los pacientes con EH, al igual que los niveles de 3-hidroxi-L-kinurenina (3-HK) (Pearson & Reynolds, 1992; Guidetti et al., 2000).

Un desbalance en la relación KYNA/QUIN y KYNA/3-HK han sido relacionados con la aparición de síntomas tempranos de la EH (Guidetti et al., 2004).

En modelos transgénicos de la EH se han encontrado niveles elevados de la enzima Kinurenina-3-monooxigenasa (KMO), que controla la producción de QUIN y 3-HK; y un decremento en la actividad de la kinureninasa (Sathyaikumar et al., 2010), además se ha reportado el incremento de QUIN y 3-HK (Guidetti et al., 2006).

Niveles elevados de KYNA y sus análogos han mostrado brindar neuroprotección en modelos *in vivo* de la EH (Zwilling et al., 2011; Zádori et al., 2011; Giorgini et al., 2005; Campesan et al., 2011; Harris et al., 1998; Santamaría et al., 1996).

Así mismo se ha encontrado que la aplicación de análogos de KYNA en modelos transgénicos de la enfermedad, resulta en mejora en el peso de los ratones como en su actividad horizontal (Zádori et al., 2011).

La inhibición crónica de KMO en un modelo transgénico de la EH muestra mejoras en la transmisión sináptica excitadora, sin embargo, no disminuye la progresión de la enfermedad (Beaumont et al., 2016).

Estudios previos del laboratorio han demostrado que la ausencia del receptor de hidrocarburos arilo incrementa los niveles de KYNA endógeno y éste a su vez tiene un efecto neuroprotector ante el daño excitotóxico ocasionado por la administración de QUIN en ratones nulos para este receptor (García-Lara et al., 2015)

3. JUSTIFICACIÓN

La EH presenta una secuencia de fenómenos fisiopatológicos que implica tanto alteraciones bioquímicas como conductuales y motrices. Entre los mecanismos moleculares asociados a este fenómeno, se encuentra un desbalance en los compuestos de la vía de las kinureninas y su participación en la regulación de la neurotransmisión. Con base en los antecedentes, la ausencia del receptor arilo en un modelo murino que sobreexpresa la htt mutada podría estar asociado a un efecto de neuroprotección debido al aumento en la disponibilidad de KYNA. Por lo cual es de importancia el análisis motriz y conductual de estos ratones para determinar los mecanismos implicados en el daño, lo que permitiría el desarrollo de estrategias terapéuticas en la enfermedad.

4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto que ejerce la ausencia del receptor de hidrocarburos arilo en un modelo murino transgénico de la enfermedad de Huntington (R6/1) en el perfil conductual del ratón.

5. OBJETIVOS PARTICULARES

- Desarrollar un ratón doble transgénico sin el receptor de hidrocarburos arilo que sobreexpresa a la huntingtina mutada.
- Evaluar conductualmente al ratón doble transgénico (R6/1^{+/+} Ahr^{-/-}) usando como controles a: 1) los ratones que sobreexpresan la huntingtina mutada y al receptor arilo (R6/1^{+/+} Ahr^{+/+}), 2) ratones que no presentan el receptor de hidrocarburos arilo ni tienen sobreexpresada la huntingtina (R6/1^{-/-} Ahr^{-/-}) y 3) ratones que no sobreexpresan la huntingtina pero si presentan el receptor de hidrocarburos arilo (R6/1^{-/-} Ahr^{+/+}).

6. MATERIAL Y MÉTODOS

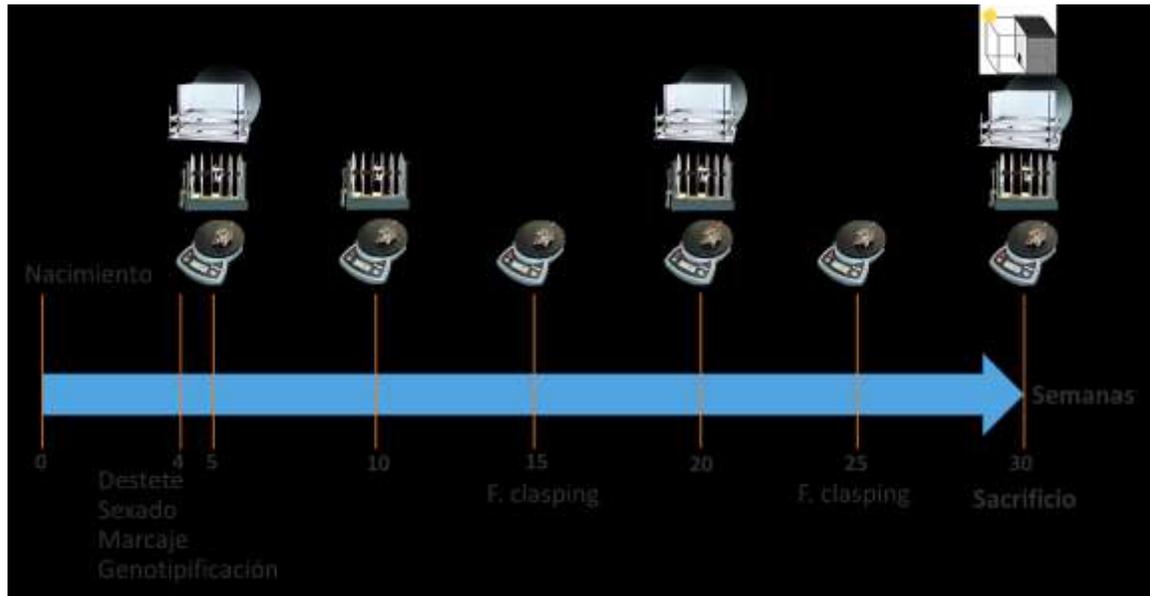


Figura 2. Diagrama general del diseño experimental.

6.1 Animales

Los ratones se mantuvieron en el cuarto de experimentación, el cual cuenta con sistema de filtración de aire, temperatura ambiental ($30 \pm 2^\circ\text{C}$) y humedad relativa ($50 \pm 10\%$) controladas así como ciclos de luz-oscuridad de 12:12 hrs., con libre acceso a comida y agua. El equipo y los animales se manipularon en campana de flujo laminar, lo que garantiza el adecuado control sanitario.

6.1.1 Ratones C57BL/6 nulos-Ahr

La generación de los ratones C57BL/6 nulos-Ahr se realizó por medio de la interrupción en el exón 1 del gen de Ahr (Fernandez-Salguero et al., 1995).

6.1.2 Ratones de la línea R6/1

Los ratones de la línea R6/1 de la cepa B6CBA (Mangiarini et al., 1996) provienen de los Laboratorios Jackson (Bar Harbor, ME, EUA) y fueron importados y donados por la Dra. Francisca Pérez Severiano del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”.

6.2 Reproducción de los ratones R6/1-Ahr-nulos

Para la obtención del ratón con la htt mutada que no exprese el receptor de hidrocarburos arilo, se llevó a cabo una primera cruce con un macho transgénico R6/1 y dos hembras Ahr^{+/-}; las crías resultantes de esta cruce (F1) fueron destetadas y se les realizó el análisis del genotipo. La segunda cruce se llevó a cabo con un macho R6/1 Ahr^{+/-} y con dos hembras R6/1 Ahr^{+/-}; las crías resultantes (F2) se utilizaron para mantener la colonia y fue hasta la F3 que fueron usados para realizar los experimentos. Debido a que la mutación de los ratones transgénicos sigue una herencia de tipo Mendeliana, los genotipos obtenidos dependen de la cruce parental.

6.3 Genotipificación

6.3.1 Extracción del ADN de ratones transgénicos

Al cumplir 4 semanas de edad, se tomó una biopsia de la cola de cada ratón, de aproximadamente 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. Se centrifugaron los tubos a 13000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente; se tomó el sobrenadante, se agregó a otro tubo con 500 µl de isopropanol y se mezcló 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. El exceso de alcohol se eliminó por decantación y se dejó secar al aire durante 5 minutos. Para disolver el ADN, se le adicionó el agua inyectable necesaria. Para evaluar la integridad del ADN extraído se realizó su corrimiento electroforético en un gel de agarosa al 1%.

6.3.2 Condiciones para la PCR

La identificación del genotipo se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) punto final. La amplificación del fragmento del gen de la htt mutada de humano se realizó con los oligonucleótidos (5' GCA GCA GCA

GCA GCA ACA GCC GCC ACC GCC) y (5' CGG CTG AGG CAG CAG CGG CTGT).

Los reactivos y las condiciones que se usaron en la PCR para la htt mutada y el receptor de hidrocarburos arilo se muestran en la tabla 1 y 2 respectivamente.

Tabla 1. Reactivos utilizados en la PCR de la htt mutada y el Ahr.

Huntingtina mutada		Receptor de hidrocarburos arilo	
	Volumen para 1 reacción (µl)		Volumen para 1 reacción (µl)
Buffer AM*	2.5	Buffer 10x	7.6
DMSO	2.5	-	-
MgCl₂ 25 Mm	0.825	Mg(OAc)₂ 25 mM	1.5
dNTP's 10 Mm	1.0	dNTP's 10 mM	2.0
Oligo F 25 Mm	1.0	Oligo F 50 µM	1.0
Oligo R 25 Mm	1.0	Oligo R 50 µM	1.0
Taq ADN pol	0.25	Taq ADN pol	0.3
H₂O Gibco	14.92	H₂O inyectable	10.6
ADN	1.0	ADN	1.0
Volumen Total	25	Volumen Total	25

*Tris-base 670mM, NH₄SO₄ 166 mM, MgCl₂ 20mM, albúmina de suero bovino 1.7 mg/ml, betamercapto etanol 10 mM, pH de 8.8.

Además, para la PCR de la htt mutada se realizaron dos reacciones independientes, una como control negativo con 1 µL de agua inyectable y otra

como control positivo con el ADN de un paciente con EH del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”.

Tabla 2. Condiciones en las que se realizaron la PCR de la htt mutada y el Ahr.

Huntingtina mutada			Receptor de hidrocarburos arilo		
Ciclos	Temperatura	Tiempo	Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	94°C	2 min	1	94°C	3 min
35	94°C	0.30 min	30	94°C	1 min
	65°C	0.30 min		60°C	1 min
	72°C	1.30 min		72°C	2.30 min
1	72°C	10 min	1	72°C	10 min

Los productos obtenidos por PCR se analizaron en geles de agarosa al 3% los cuales fueron teñidos con 2 µl de una solución de bromuro de etidio (10 mg/µl) y se observaron con luz UV. El amplicon de la htt mutada tiene un tamaño de 110 pares de bases.

6.4 Actividad motora y conducta

6.4.1 Evaluación de la actividad motora

La evaluación de la actividad motora de los ratones se llevó a cabo a las edades de 5, 20 y 30 semanas de edad. La actividad motora se registró por medio de un sistema automatizado (Electronic Motility Meter 40Fc; Motron Products, Stockholm, Sweden). Cada ratón fue introducido en una caja de acrílico transparente de 21 cm de ancho x 33 cm de largo x 29 cm de altura. La evaluación de la actividad motora se realizó una sola vez para cada ratón en una sesión de 5 minutos.

6.4.2 Evaluación de la conducta de *feet clasping*

La conducta de *feet clasping* de los ratones R6/1 Ahr^{+/+}, R6/1 Ahr^{-/-} y de los controles se realizó a las 15 y 25 semanas de edad. La evaluación consistió

en sujetar a los ratones de la cola y observar si son capaces de sujetar sus patas traseras con las delanteras por al menos 5 segundos.

6.4.3 Test de Rotarod

La coordinación y equilibrio motor fueron evaluados mediante el rotarod. Los ratones fueron entrenados tres días consecutivos; cada día a 3 distintas velocidades (10, 20 y 30 rpm) por un máximo de 5 minutos. La prueba se realizó al cuarto día. El día de prueba los ratones fueron evaluados en una rampa de velocidad de 2 a 40 rpm en 5 minutos. La latencia de caerse del rotarod fue registrada. Esta prueba se realizó por duplicado; el promedio obtenido fue usado para el análisis estadístico.

6.4.4 Prueba de la Caja claro-oscuro (Light-dark box test).

Es un modelo basado en la aversión-ansiedad innata de los roedores a las áreas iluminadas. El aparato consiste en un compartimento negro y un compartimento claro conectados mediante una puerta. Se colocó a cada ratón individualmente en el compartimento claro y se registró el tiempo que permanece en cada compartimento, así como los cruces realizados entre los dos compartimentos durante 5 minutos. El inicio de la prueba en el compartimento claro se considera un ambiente más estresante (Hascoët & Bourin, 2009).

6.5 Análisis estadístico.

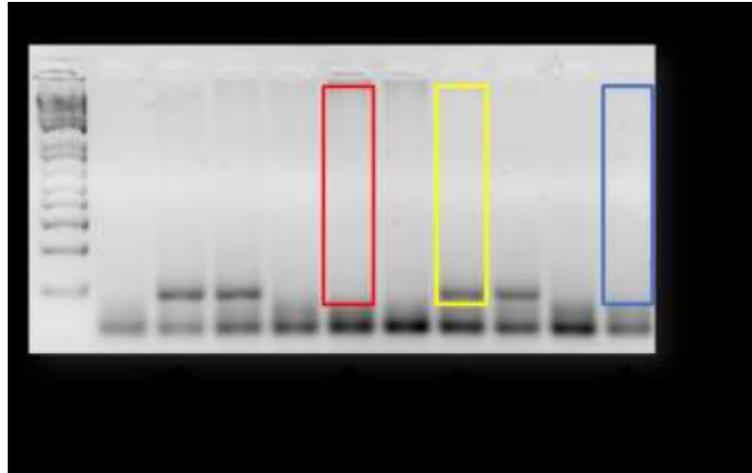
Los valores obtenidos de cada experimento fueron analizados mediante un ANOVA de dos factores.

7. RESULTADOS

7.1 Se desarrolló un ratón doble transgénico sin el receptor de hidrocarburos arilo que sobreexpresa a la huntingtina mutada (Genotipo: R6/1 Ahr -/-)

El genotipo de los ratones fue determinado mediante la técnica de PCR; en la figura 3 se observan geles representativos de la identificación del genotipo. En el inciso a) se muestra el corrimiento electroforético de los productos de PCR para la htt mutada y en el inciso b) observamos los productos de PCR para la determinación del Ahr. De izquierda a derecha podemos observar en ambos geles en un recuadro rojo a un ratón Wt Ahr -/-, en un recuadro amarillo observamos al ratón doble transgénico (R6/1 Ahr -/-) y en un recuadro azul observamos a un ratón Wt Ahr +/-, los ratones cuyos genotipos se encuentran en rojo y amarillo fueron usados para las pruebas motoras y conductuales, mientras que el del genotipo en azul fue usado como pie de cría para continuar la colonia.

a)



b)

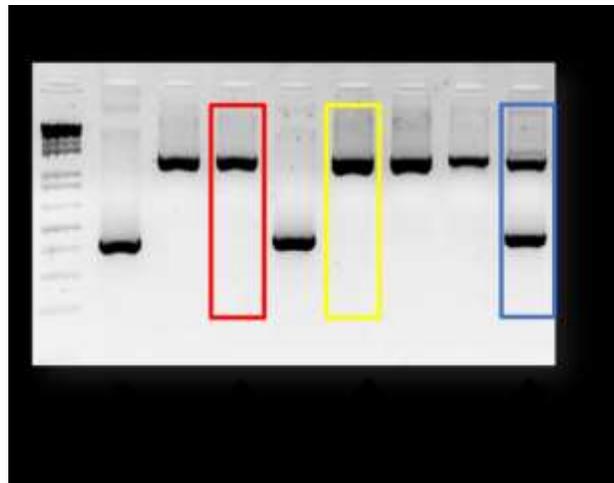


Figura 3. Imagen representativa de la identificación del genotipo. a) Se muestra un gel de agarosa representativo de los productos amplificados por PCR para la determinación del gen de la *htt* mutada. C-: control negativo de la reacción, C+: control positivo donde se observa la banda de 110 pares de bases (pb). Se muestra únicamente la banda del peso esperado en el ratón R6/1 y no se observa en el ratón silvestre. **b)** Gel de agarosa representativo de los productos amplificados por PCR para la determinación de la presencia o ausencia del gen de *Ahr*. La banda de mayor peso corresponde al gen *neo* con el que fue sustituido el gen *Ahr* y la banda de menor peso corresponde al gen *Ahr*. La banda de mayor peso se observa sólo en los ratones nulos para el *Ahr*. M= marcador de peso molecular.

7.2 El fenotipo del ratón R6/1 Ahr $-/-$ es diferente al del ratón R6/1 Ahr $+/+$

En la figura 4 se observa una imagen representativa de los genotipos en estudio, en el inciso a) y b) observamos a un ratón Wt Ahr $+/+$ y a un ratón Wt Ahr $-/-$, respectivamente, entre estos ratones no se observan diferencias en cuanto a su complexión y pelaje. En los incisos c) y d) se muestra un ratón R6/1 Ahr $+/+$ y R6/1 Ahr $-/-$, estos ratones presentan una complexión similar, sin embargo, el ratón R6/1 Ahr $+/+$ presenta la clásica curvatura en el dorso propia de la cepa R6/1, misma que se encuentra ausente en el ratón doble transgénico.

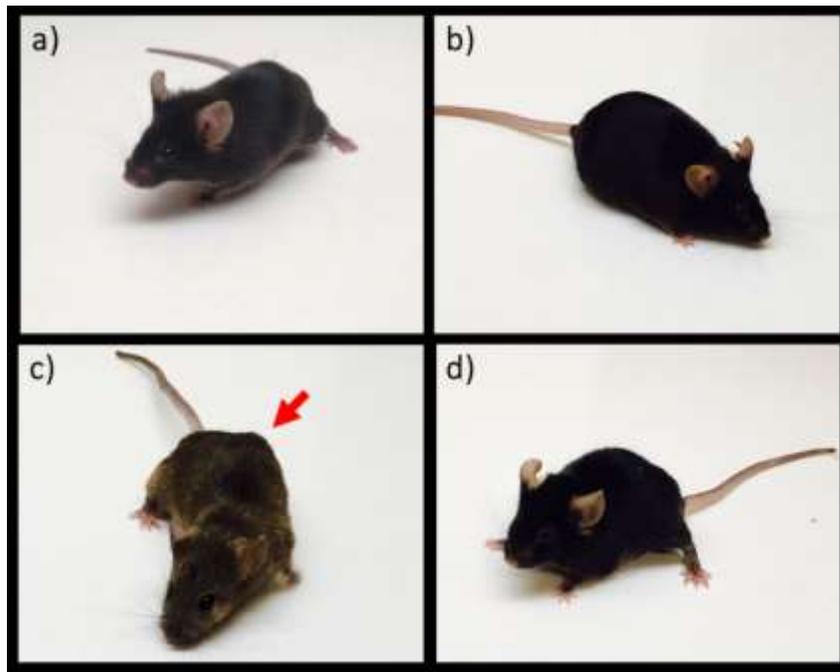


Figura 4. Imagen representativa del fenotipo de los animales obtenidos.
a) Se observa al ratón Wt Ahr $+/+$ con pelaje normal y peso corporal normal.
b) El ratón Wt Ahr $-/-$ presenta un aspecto muy similar al observado en el inciso a). **c)** Ratón R6/1 Ahr $+/+$ en el que se muestra la clásica curvatura del dorso (marcada con una flecha roja) y bajo peso corporal. **d)** El ratón R6/1 Ahr $-/-$ presenta un aspecto similar al del inciso c), sin embargo, no presenta la curvatura en el dorso característica del transgénico R6/1.

7.3 La ausencia del receptor Ahr en el R6/1 no disminuye la pérdida del peso corporal

En la figura 5 se encuentran graficados los pesos de los ratones de los cuatro genotipos de interés cada 5 semanas, desde la semana 5 hasta la 30. A las 5 semanas se observó que los ratones R6/1 Ahr +/+ tuvieron un peso promedio de 16.33 ± 1.02 , que resultó ser significativamente menor en comparación con el peso de los ratones Wt Ahr +/+ y Wt Ahr -/- que pesaron en promedio 21.15 ± 1.37 y 19.87 ± 1.14 , respectivamente, mientras que los ratones dobles transgénicos (R6/1 Ahr -/-), pesaron en promedio 18.67 ± 0.50 . A la semana 10 los ratones Wt Ahr +/+ y Wt Ahr -/- pesaron en promedio 26.01 ± 0.50 y 28.91 ± 1.28 , respectivamente, mientras que los ratones R6/1 Ahr +/+ pesaron en promedio 25.59 ± 1.01 y los ratones R6/1 Ahr -/- tuvieron un peso promedio de 24.78 ± 0.53 ; en esta semana no se observó diferencia significativa entre ninguno de los genotipos. En la semana 15 los ratones R6/1 Ahr +/+ tuvieron un peso promedio (24.20 ± 1.41) significativamente menor al de los ratones Wt Ahr +/+ (29.36 ± 0.80), mientras que los ratones Wt Ahr -/- y R6/1 Ahr +/+ tuvieron un peso promedio de 29.63 ± 0.73 y 26.10 ± 0.98 , respectivamente. A la semana 20 los ratones R6/1 Ahr +/+ presentaron un peso promedio de 24.79 ± 0.75 , que resultó ser significativamente menor al de los ratones Wt Ahr +/+ y Wt Ahr -/-, que presentaron un peso promedio de 30.18 ± 0.74 y 32.11 ± 1.06 , respectivamente, los ratones R6/1 Ahr -/- presentaron un peso promedio de 26.77 ± 1.47 . A las 25 semanas los ratones R6/1 Ahr +/+ y R6/1 Ahr -/- tuvieron un peso promedio de 24.61 ± 0.61 y 25.55 ± 0.21 , respectivamente, éstos valores fueron significativamente menores al peso promedio que tuvieron los ratones Wt Ahr +/+ (31.31 ± 0.57) y Wt Ahr -/- (32.55 ± 2.00). A las 30 semanas el peso promedio de los ratones R6/1 Ahr +/+ (23.32 ± 0.54) y R6/1 Ahr -/- (25.42 ± 1.53), fue significativamente menor al que tuvieron los ratones Wt Ahr +/+ (33.95 ± 0.99) y Wt Ahr -/- (36.15 ± 2.69).

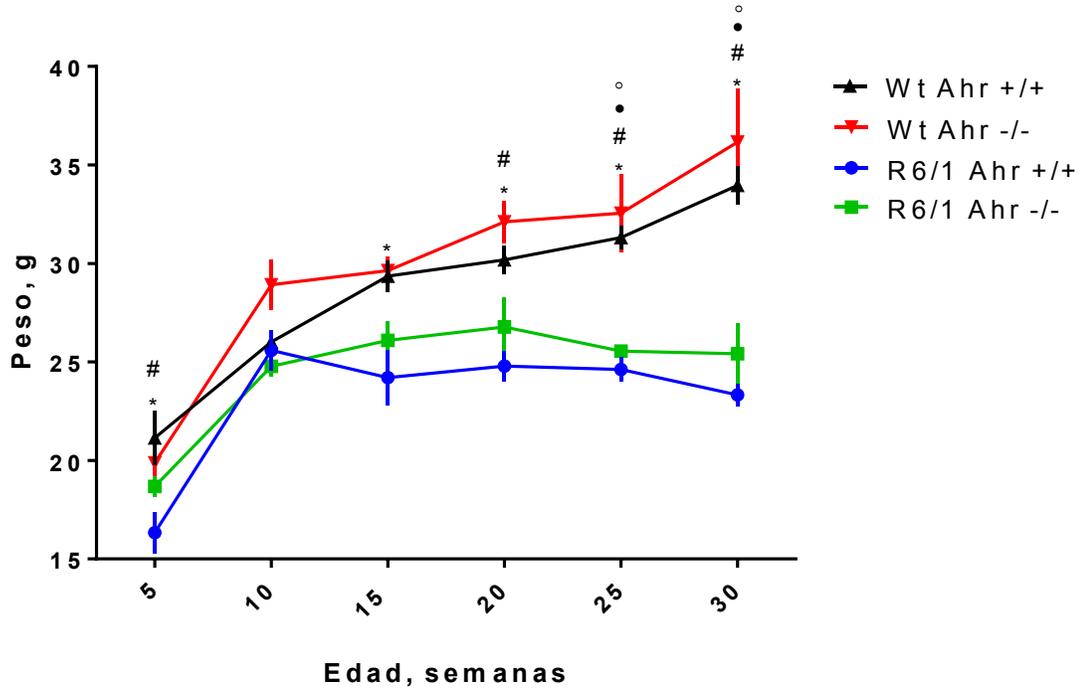


Figura 5. Peso corporal de ratones Wt Ahr +/+, Wt Ahr -/-. R6/1 Ahr +/+ y R6/1 Ahr -/- a las 5, 10, 15, 20, 25 y 30 semanas. Los ratones R6/1 Ahr +/+ muestran diferencias significativas en la semana 5 y posteriormente a partir de la semana 15 en comparación con los ratones Wt Ahr +/+. De la misma forma estos ratones muestran diferencias significativas a la semana 5 y a partir de la semana 20 respecto a los ratones Wt Ahr -/-. Los ratones R6/1 Ahr -/- muestran diferencias significativas a partir de la semana 25 en comparación con los ratones Wt Ahr +/+ y Wt Ahr -/-. Los datos se muestran con su promedio \pm SEM, ANOVA de dos factores, post-hoc Tukey; Wt Ahr +/+ n = 18; Wt Ahr -/- n = 9; R6/1 Ahr +/+ n = 18; R6/1 Ahr -/- n = 4, *P<0.05 Wt Ahr +/+ vs R6/1 Ahr +/+, # P<0.05 Wt Ahr -/- vs R6/1 Ahr +/+, ° P<0.05 Wt Ahr +/+ vs R6/1 Ahr -/-, ° P<0.05 Wt Ahr -/- vs R6/1 Ahr -/-.

7.4 Los animales R6/1 Ahr ^{-/-} no presentan *feet-clasping*

En la figura 6 a) se muestra la postura de *feet-clasping* característica de cepa R6/1, mientras que en el ratón R6/1 Ahr ^{-/-} (b) no se observó la presencia de ésta postura. Esta prueba fue realizada a las 15 y a las 25 semanas (tabla 3) en donde se observó que los ratones con genotipo R6/1 Ahr ^{+/+} fueron los únicos en mostrar esta postura en ambas edades.

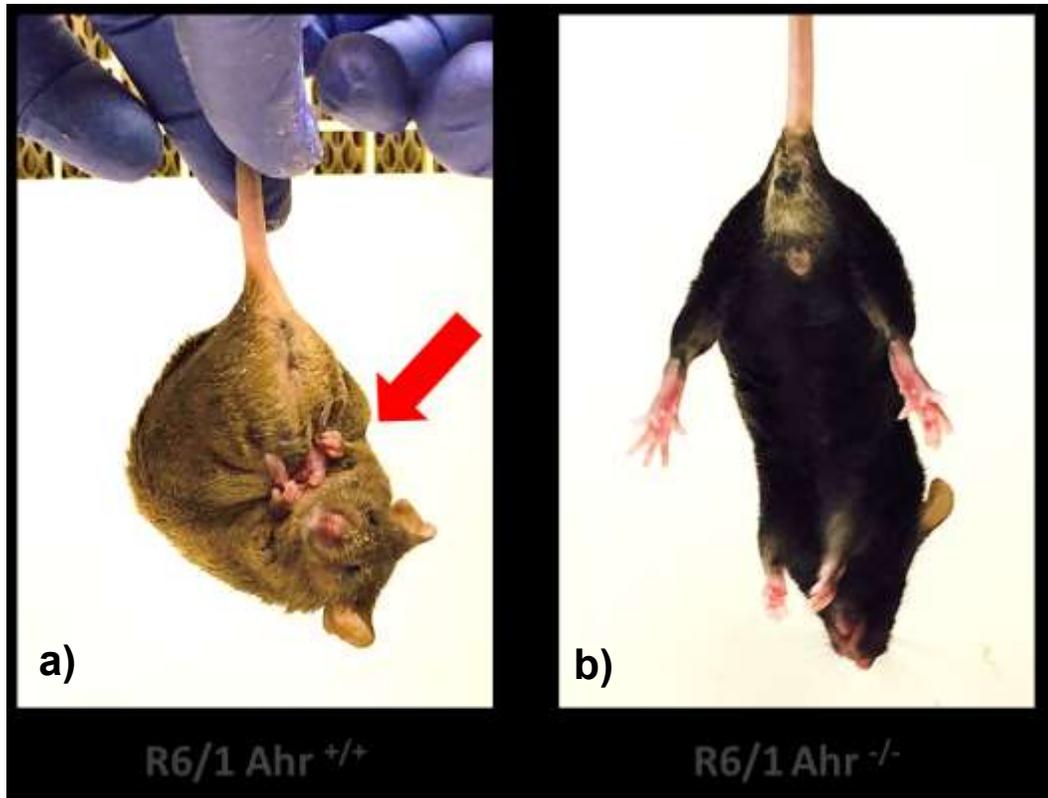


Figura 6. Postura de *feet-clasping*. a) Ratón macho transgénico R6/1 Ahr ^{+/+} de 15 semanas mostrando la postura característica de *feet-clasping*. b) En el ratón doble transgénico, R6/1 Ahr ^{-/-} observamos que la postura de *feet-clasping* está ausente.

Tabla 3. Postura de *feet-clasping* en ratones a las 15 y 25 semanas de edad.

Genotipo	<i>Feet-clasping</i>	
	15 semanas	25 semanas
Wt Ahr +/+	X	X
Wt Ahr -/-	X	X
R6/1 Ahr +/+	✓	✓
R6/1 Ahr -/-	X	X

7.5 Los ratones R6/1 Ahr ^{-/-} no presentan deterioro en su coordinación motriz a las 30 semanas

La coordinación motora de los ratones de los cuatro genotipos fue evaluada mediante el test del rotarod a las 5, 10, 20 y 30 semanas. En cada edad se determinó la latencia de caída que presentó cada ratón. A las 5 semanas el promedio de la latencia de caída de los ratones Wt Ahr +/+ fue de 249.90±18.34, de los ratones Wt Ahr -/- fue de 295.71±3.16, mientras que los ratones R6/1 Ahr +/+ y R6 Ahr -/- tuvieron un promedio de 286.44±5.52 y 289.25±10.75, respectivamente; a esta edad no se observó ninguna diferencia significativa en la coordinación motora entre genotipos. A las 10 semanas los ratones Wt Ahr +/+ presentaron un promedio en la latencia de caída del rotarod de 197.60±16.47, mientras que los ratones Wt Ahr -/- tuvieron un promedio de latencia de caída de 262.600±12.160, los ratones R6/1 Ahr +/+ y R6/1 Ahr -/-, por su parte, tuvieron un promedio de 214.09±15.63 y 265.88±7.86, respectivamente. A esta edad tampoco existieron diferencias significativas entre los genotipos. A las 20 semanas el promedio de latencia de caída de los genotipos Wt Ahr +/+ (138.60±19.38), Wt Ahr -/- (202.50±7.50), R6/1 Ahr +/+ (117.35±29.22) y R6/1 Ahr -/- (229.50±37.51) no tuvieron diferencias significativas entre los genotipos. A la semana 30 el promedio de latencia de caída de los ratones R6/1 Ahr +/+ fue de 45.81±11.55, que resultó

significativamente menor al promedio de latencia de caída de los genotipos Wt Ahr +/+ (155.04±17.19), Wt Ahr -/- (200.37±25.52) y R6/1 Ahr -/- (152.37±443) (figura 7).

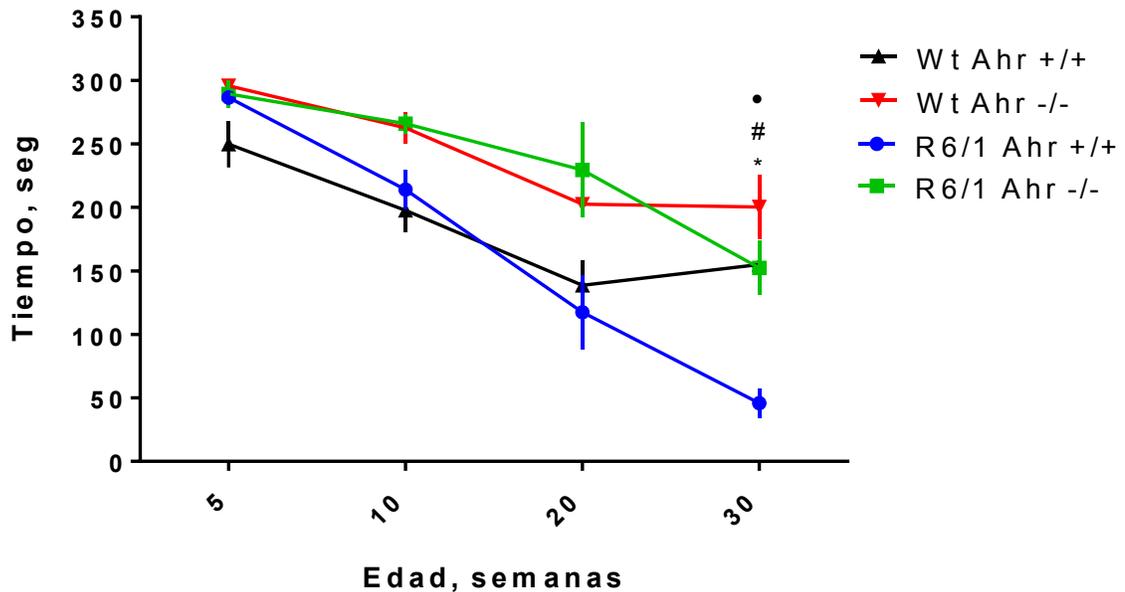


Figura 7. Coordinación motora. A las 30 semanas se observa una diferencia significativa en la latencia de caída de los ratones R6/1 Ahr +/+ comparados con los ratones Wt Ahr +/+, Wt Ahr -/- y R6/1 Ahr -/-. Los datos se muestran con su promedio ± SEM, ANOVA de dos factores, post-hoc Tukey; Wt Ahr +/+ n = 18; Wt Ahr -/- n = 9; R6/1 Ahr +/+ n = 18; R6/1 Ahr -/- n = 4, *P<0.05 Wt Ahr +/+ vs R6/1 Ahr +/+, # P<0.05 Wt Ahr -/- vs R6/1 Ahr +/+, •P<0.05 R6/1 Ahr -/- vs R6/1 Ahr +/+.

7.6 Los ratones R6/1 Ahr ^{-/-} no presentan deterioro en su conducta ambulatoria a las 30 semanas

La actividad espontánea fue determinada por un sistema automatizado en una caja de acrílico de 21 cm de ancho x 33 cm de largo y 29 cm de altura, los resultados se muestran en la figura 8.

La actividad ambulatoria se determinó por el número de movimientos horizontales. A las 5 semanas el promedio de movimientos de los ratones Wt Ahr +/+ fue de 69.60 ± 5.29 , el de los ratones Wt Ahr -/- fue de 37.66 ± 6.06 , los ratones R6/1 Ahr +/+ tuvieron un promedio de movimientos de 51.37 ± 5.00 y el promedio de movimientos de los ratones R6/1 Ahr -/- fue de 53.33 ± 16.49 , a esta edad no existió diferencia significativa en el número de movimientos entre genotipos. A las 20 semanas tampoco existieron diferencias significativas en el número de movimientos que presentaron los cuatro genotipos de estudio, los ratones Wt Ahr +/+ tuvieron un promedio de movimientos de 53.35 ± 4.65 , los ratones Wt Ahr -/- de 23.80 ± 4.76 , los ratones R6/1 Ahr +/+ de 24.20 ± 4.86 y los ratones R6/1 Ahr -/- de 44.00 ± 10.00 . En la semana 30 se observaron diferencias significativas entre los ratones Wt Ahr +/+ y R6/1 Ahr +/+, con un promedio de movimientos de 69.16 ± 9.69 y 17.16 ± 5.94 , respectivamente, además el número de movimientos de los ratones R6/1 Ahr +/+ fue significativamente menor en comparación con los ratones R6/1 Ahr -/- que tuvieron un promedio de movimientos de 95.75 ± 75.17 ; los ratones Wt Ahr +/+, por su parte, tuvieron un promedio de movimientos de 69.16 ± 9.69 (a).

La actividad exploratoria fue determinada por el número de movimientos verticales de cada ratón. A las 5 semanas los promedios de movimientos de los ratones fueron de 33.25 ± 10.61 , 31.33 ± 4.37 , 25.00 ± 3.76 y 35.33 ± 12.81 para los genotipos Wt Ahr +/+, Wt Ahr -/-, R6/1 Ahr +/+ y R6/1 Ahr -/-, respectivamente, entre los que no se observaron diferencias significativas. En la semana 20 los ratones R6/1 Ahr +/+ tuvieron un promedio de movimientos de 6.200 ± 0.940 que resultó significativamente menor a los movimientos de los ratones Wt Ahr +/+ que tuvieron un promedio de movimientos de 23.70 ± 2.46 ;

los ratones Wt Ahr -/- y R6/1 Ahr -/- tuvieron un promedio de movimientos de 9.80 ± 3.65 y 24.66 ± 3.84 , respectivamente, entre los que no existieron diferencias significativas ni con los demás genotipos. A las 30 semanas, los ratones R6/1 Ahr +/+ presentaron un promedio de movimientos de 4.35 ± 1.38 , que fueron significativamente menores a los movimientos de los ratones Wt Ahr +/+, cuyo promedio de movimientos fue de 25.42 ± 4.29 . El promedio de movimientos de los genotipos Wt Ahr -/- y R6/1 Ahr -/- fue de 17.20 ± 4.66 y 7.75 ± 2.65 , respectivamente, entre los que no se observaron diferencias significativas ni con los demás genotipos (8b).

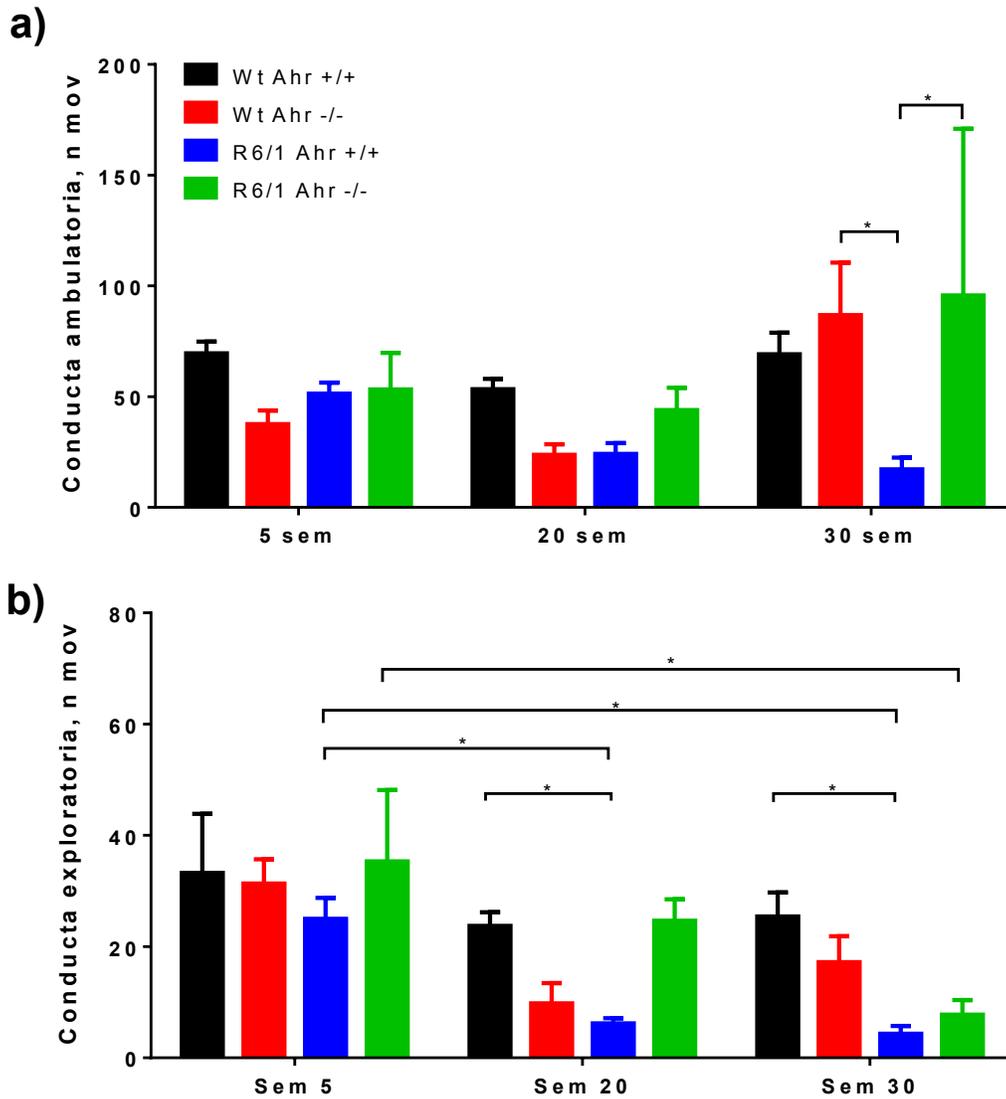
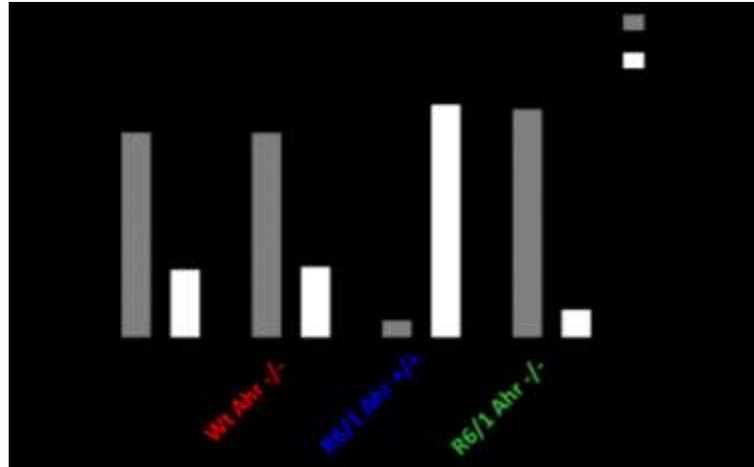


Figura 8. Actividad motora. La conducta ambulatoria de los ratones R6 Ahr +/+ es significativamente menor a la conducta de los ratones Wt Ahr +/+ y R6/1 Ahr -/- (a). Los ratones R6/1 Ahr +/+ y R6/1 Ahr -/- disminuyen significativamente su conducta exploratoria de la semana 5 a la 30; a la semana 20 y 30 se observa diferencia significativa en los ratones R6/1 Ahr +/+ y los Wt Ahr +/+ (b). Los datos se muestran con su promedio \pm SEM, ANOVA de dos factores, post-hoc Tukey; Wt Ahr +/+ n = 18; Wt Ahr -/- n = 5; R6/1 Ahr +/+ n = 8; R6/1 Ahr -/- n = 4, *P<0.05.

7.7 La conducta de ansiedad en el ratón R6/1 Ahr^{-/-} es normal

La prueba de la caja claro-oscuro se usó para determinar la ansiedad en los ratones de los cuatro genotipos de estudio a las 30 semanas de edad (figura 9). Los ratones R6/1 Ahr^{+/+} pasaron un promedio de 21.30 ± 3.17 segundos en el lado oscuro, que resultó ser significativamente menor al tiempo que pasaron los demás genotipos en este lado, cuyos promedios fueron de 226.09 ± 6.23 , 226.00 ± 11.91 y 251.66 ± 10.52 segundos para los genotipos Wt Ahr^{+/+}, Wt Ahr^{-/-} y R6/1 Ahr^{-/-}, respectivamente (figura 9a). En cuanto al número de cruces que realizaron los ratones entre el lado oscuro y el lado claro, se observó que los ratones R6/1 Ahr^{+/+} presentaron un promedio de 4.07 ± 0.916 cruces entre un lado y otro, valor que fue significativamente menor a los cruces realizados por los ratones Wt Ahr^{+/+} y Wt Ahr^{-/-} cuyos promedios fueron de 13.08 ± 1.54 y 11.00 ± 1.51 cruces, respectivamente (figura 9b). Los ratones R6/1 Ahr^{-/-} tuvieron un promedio de 6.33 ± 2.02 cruces y no fueron significativamente diferentes comparados con los demás genotipos.

a)



b)

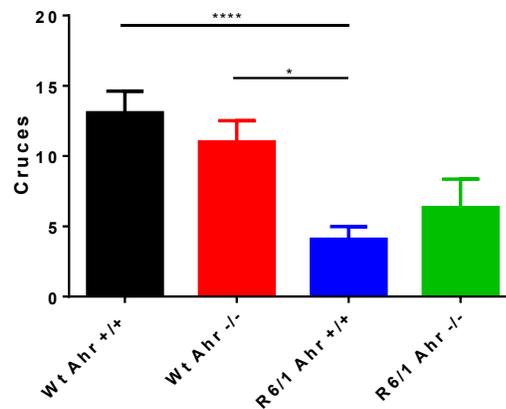


Figura 9. Prueba de ansiedad de la caja luz-oscuridad. a) Los ratones R6/1 Ahr +/+ pasan más tiempo en el lugar con luz de forma significativa en comparación con los ratones Wt Ahr +/+, Wt Ahr -/- y R6/1 Ahr -/- a las 30 semanas. b) El número de cruces realizados por los ratones R6/1 Ahr +/+ entre el lado con luz y el de oscuridad, es significativamente menos al número de cruces que realizan los ratones Wt Ahr +/+ y Wt Ahr -/-. Los datos se muestran con su promedio \pm SEM, ANOVA de dos factores, post-hoc Tukey; Wt Ahr +/+ n = 12; Wt Ahr -/- n = 5; R6/1 Ahr +/+ n = 10; R6/1 Ahr -/- n = 4, ****P<0.0001 (a). Los datos se muestran con su promedio \pm SEM, ANOVA de un factor, post-hoc Tukey; Wt Ahr +/+ n = 12; Wt Ahr -/- n = 5; R6/1 Ahr +/+ n = 10; R6/1 Ahr -/- n = 4, *P<0.05, ****P<0.0001 (b).

8. DISCUSIÓN

La EH es un trastorno neurodegenerativo hereditario ocasionado por la expansión de repetidos del triplete CAG en el gen *IT15*, que codifica para la proteína htt. Los pacientes con esta enfermedad manifiestan síntomas motores, psiquiátricos y déficit cognitivo, principalmente (Ross et al., 2014). Además, estos pacientes cursan con pérdida de peso corporal de forma progresiva (Djousse et al., 2002). Existen modelos transgénicos en ratones para el estudio de la EH, que presentan algunos de los síntomas antes mencionados y recrean la progresión de la EH de inicio temprano, como el modelo R6/2 o de inicio tardío, como el modelo R6/1. En este estudio se empleó el modelo transgénico R6/1 que posee 116 repetidos del triplete CAG en el exón 1 del gen de la htt (Mangiarini et al., 1996). En la figura 3 se muestra la identificación del genotipo de los ratones por PCR punto final. El ratón R6/1 Ahr +/+ fue usado como control de un modelo transgénico de la EH y mostró la característica curvatura en el dorso a las 30 semanas de edad de la cepa antes mencionada (figura 4c), misma que no fue observada en el ratón Wt Ahr +/+ (4a), asimismo mostró una disminución en la ganancia de peso y la presencia de la postura de *feet-clasping* a partir de la semana 15 (figura 5 y 6), como anteriormente había sido reportado por Mangiarini et al. en 1996, estas características resultan propias de la cepa R6/1, y no fueron observadas en el ratón con genotipo Wt Ahr +/+. La coordinación motora del ratón R6/1 Ahr +/+ se vió disminuida en la prueba del rotarod (figura 7) entre la semana 10 y 20, comparada con la coordinación motora de los ratones silvestres, esto concuerda con lo reportado por Hansson y colaboradores en 2001, donde ellos también reportan que el déficit motor ocurre con la aparición de la postura de *feet-clasping* y los agregados intranucleares de htt, sin embargo, los últimos no fueron evaluados en este estudio. La disminución en la conducta ambulatoria y exploratoria de los ratones R6/1 Ahr +/+, evaluada por la prueba de campo abierto (figura 8), se observó desde la semana 20, aún no se sabe si este efecto es ocasionado por la disminución en la locomoción o la disfunción cognitiva de los ratones R6/1, sin embargo es propio de la cepa y

corresponde a lo reportado por Naver y colaboradores en 2003. Los ratones R6/1 Ahr +/+, además, mostraron disminuir su conducta de ansiedad en la caja de luz-oscuridad, así como el número de cruces entre un lado y otro, en comparación con los ratones Wt Ahr +/+ (figura 9), ésto también fue reportado por Naver y colaboradores en 2003 y refleja el déficit cognitivo presente en los ratones R6/1 Ahr +/+.

Por otra parte, García-Lara et al. reportaron en 2015 que los ratones con ausencia del Ahr (Wt Ahr -/-) presentan mayores niveles de KYNA (metabolito neuroprotector y antioxidante), en la corteza y estriado, comparados con ratones silvestres, por lo tanto en este estudio se usó a este ratón y se realizó una cruce con el ratón R6/1, para generar a un ratón doble transgénico con sobre expresión de la htt mutada y ausencia del receptor Ahr y evaluar su perfil conductual y motor.

El ratón doble transgénico generado (R6/1 Ahr -/-), presentó un fenotipo diferente al del ratón R6/1 Ahr +/+ (figura 4c), sin embargo, disminuyó la ganancia en su peso corporal a partir de la semana 20 de forma similar al ratón R6/1 Ahr +/+ (figura 5), algunos autores han atribuido éste efecto en los ratones R6/1 Ahr +/+ y en los pacientes con EH, al aumento en su gasto energético que ocasiona la pérdida de masa muscular (Goodman et al., 2008); otros autores también han relacionado de forma indirecta la pérdida de peso observada en pacientes y modelos de EH con el número de repetidos de CAG (Gilbert, 2009). Por lo anterior, nosotros planteamos que la ausencia del arilo no tuvo efecto en el peso de los animales debido a que en la EH existe la desregulación de varias vías metabólicas y el Ahr no tiene influencia en todas ellas. En cuanto a la postura de *feet-clasping*, ésta sólo estuvo presente en los ratones con genotipo R6/1 Ahr +/+ a partir de la semana 15 y estuvo ausente en los demás genotipos (Wt Ahr +/+, Wt Ahr -/- y R6/1 Ahr -/-) hasta la semana 25 (figura 6, tabla 3). La postura de *feet-clasping* ha sido relacionada con la presencia de repetidos CAG y con el daño neurológico presente en enfermedades como la EH (Naver et al., 2003), es por esto que la ausencia de

ésta postura en el ratón doble transgénico generado nos indica la disminución en el daño neurológico en éstos ratones, sin embargo esto debe ser corroborado mediante estudios donde pueda comprobarse la disminución en la pérdida neuronal. Los ratones dobles transgénicos, además, mostraron una coordinación motora similar a la de los ratones Wt Ahr $-/-$, la cual a su vez es diferente a la de los ratones Wt Ahr $+/+$ como anteriormente había sido reportado por García-Lara y colaboradores en 2015 (figura 7). En cuanto a la conducta ambulatoria y exploratoria determinada por la prueba de campo abierto, se observó que los ratones R6/1 Ahr $-/-$ no presentan deterioro en su conducta ambulatoria a lo largo de su desarrollo, sin embargo su conducta exploratoria disminuyó significativamente con el paso de las semanas (figura 8). La disminución en el deterioro motor observado en los ratones dobles transgénicos (figura 7) y de su conducta ambulatoria (figura 8), se plantea que fue ocasionado por la disponibilidad de KYNA debido a la ausencia de Ahr en este ratón, lo que permite a este metabolito modular a los receptores NMDA y $\alpha 7nAChR$ y así disminuir los efectos excitotóxicos observados en EH. Referente a la disminución en la conducta de ansiedad que presentan los ratones R6/1 Ahr $+/+$, se observó que los ratones dobles transgénicos no presentan esta disminución y además se comportan de manera similar a los ratones Wt Ahr $+/+$, lo cual refleja una disminución en el déficit cognitivo presente en los ratones R6/1 Ahr $+/+$.

9. CONCLUSIONES

El modelo transgénico de la EH usado en este trabajo (R6/1 Ahr +/+), mostró todas las características fenotípicas, motoras y conductuales ya reportadas y, además, mostró tener la ventaja de recrear el progreso de la EH de inicio tardío. Respecto al ratón doble transgénico generado en éste estudio (R6/1 Ahr -/-), éste muestra disminución en el deterioro motor y conductual respecto al ratón R6/1 Ahr +/+, el cual es atribuido al efecto del aumento en la disponibilidad de KYNA en el ratón doble transgénico. Este trabajo da evidencia de que la ausencia del Ahr evita el deterioro motor y conductual presente en un modelo transgénico de la EH.

10. PERSPECTIVAS

- Caracterizar bioquímicamente la vía de las kinureninas en el ratón doble transgénico.
- Determinar la expresión de enzimas de la vía de las kinureninas.
- Evaluar el estrés oxidante en los ratones R6/1 Ahr ^{-/-} y R6/1 Ahr ^{+/+}
- Observar las inclusiones de mhtt en el ratón R6/1 Ahr ^{-/-} y compararlos con el ratón R6/1 Ahr ^{+/+}
- Realizar una curva de sobrevida en los ratones R6/1 Ahr ^{-/-} y compararlos con el ratón R6/1 Ahr ^{+/+}
- Evaluar electrofisiológicamente a los ratones R6/1 Ahr ^{-/-} y R6/1 Ahr ^{+/+}
- Administrar una molécula que ocupe farmacológicamente al Ahr en los ratones R6/1.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Amaral, M., Outeiro, T. F., Scrutton, N. S., & Giorgini, F. (2013). The causative role and therapeutic potential of the kynurenine pathway in neurodegenerative disease. *Journal of Molecular Medicine*, 91(6), 705–713. <http://doi.org/10.1007/s00109-013-1046-9>
- Andrew, S., Goldberg, Y., Kremer, B., Telenius, H., Theilmann, J., & Adam, S. (1993). The relationship between trinucleotide (CAG) repeat length and clinical features of Huntington's disease. *Nat Genet*, (4), 398–403.
- Arenas, J., Campos, Y., Ribacoba, R., Martín, M. a, Rubio, J. C., Ablanedo, P., & Cabello, a. (1998). Complex I defect in muscle from patients with Huntington's disease. *Annals of Neurology*, 43(3), 397–400. <http://doi.org/10.1002/ana.410430321>
- Barban, L., & Paris, J. (1984). Purkinje Cell Density in Huntington ' s Disease. *Experimental Neurology*, 86, 78–86.
- Beal, M. F., Kowall, N. W., Ellison, D. W., Mazurek, M. F., Swartz, K. J., & Martin, J. B. (1986). Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. *Nature*, 321, 168–171. <http://doi.org/10.1038/321168a0>
- Beal, M., Matson, W., Swartz, K., Gamache, P., & Bird, E. (1990). Kynurenine pathway measurements in Huntington's disease striatum: evidence for reduced formation of kynurenic acid. *J Neurochem*, (55), 1327–1339.
- Beaumont, V., Mrzljak, L., Dijkman, U., Freije, R., Heins, M., Rassoulpour, A., Muñoz-Sanjuan, I. (2016). The novel KMO inhibitor CHDI-340246 leads to a restoration of electrophysiological alterations in mouse models of Huntington's disease. *Experimental Neurology*, 282, 99–118. <http://doi.org/10.1016/j.expneurol.2016.05.005>
- Bogdanov, M. B., Andreassen, O. A., Dedeoglu, A., Ferrante, R. J., & Beal, M. F. (2001). Increased oxidative damage to DNA in a transgenic mouse

- model of Huntington's disease. *Journal of Neurochemistry*, 79(6), 1246–9. <http://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00689.x>
- Bogdanov, M. B., Ferrante, R. J., Kuemmerle, S., Klivenyi, P., & Beal, M. F. (1998). Increased vulnerability to 3-nitropropionic acid in an animal model of Huntington's disease. *J Neurochem*, 71(6), 2642–2644.
- Browne, S. E. (2008). Mitochondria and Huntington's disease pathogenesis: Insight from genetic and chemical models. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1147, 358–382. <http://doi.org/10.1196/annals.1427.018>
- Browne, S. E., Bowling, A. C., MacGarvey, U., Baik, M. J., Berger, S. C., Muqit, M. M., Beal, M. F. (1997). Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: Selective vulnerability of the basal ganglia. *Annals of Neurology*, 41(5), 646–53. <http://doi.org/10.1002/ana.410410514>
- Browne, S. E., Ferrante, R. J., & Beal, M. F. (1999). Oxidative stress in Huntington's disease. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, 9(1), 147–63. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9989457>
- Brustovetsky, N., LaFrance, R., Purl, K. J., Brustovetsky, T., Keene, C. D., Low, W. C., & Dubinsky, J. M. (2005). Age-dependent changes in the calcium sensitivity of striatal mitochondria in mouse models of Huntington's disease. *Journal of Neurochemistry*, 93(6), 1361–1370. <http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03036.x>
- Budworth, H., & McMurray, C. T. (2013). Trinucleotide Repeat Protocols. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1010, 3–17. <http://doi.org/10.1007/978-1-62703-411-1>
- Campesan, S., Green, E. W., Breda, C., Sathyasaikumar, K. V., Muchowski, P. J., Schwarcz, R., Giorgini, F. (2011). The kynurenine pathway modulates neurodegeneration in a drosophila model of Huntington's disease. *Current Biology*, 21(11), 961–966. <http://doi.org/10.1016/j.cub.2011.04.028>

- Chang, R., Liu, X., Li, S., & Li, X.-J. (2015). Transgenic animal models for study of the pathogenesis of Huntington's disease and therapy. *Drug Design, Development and Therapy*, (9), 2179–2188. <http://doi.org/10.2147/DDDT.S58470>
- Coyle, J., & Schwarcz, R. (1976). Lesion of striatal neurones with kainic acid provides a model for Huntington's chorea. *Nature*, 262, 774–776.
- Davies, S. W., Turmaine, M., Cozens, B. A., DiFiglia, M., Sharp, A. H., Ross, C. A., Bates, G. P. (1997). Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell*, 90(3), 537–548. [http://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80513-9](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80513-9)
- DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K. O., Davies, S. W., Bates, G. P., Vonsattel, J. P., Kleinschmidt, J. A. (1997). Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science (New York, N.Y.)*, 277(5334), 1990–3. <http://doi.org/10.1126/science.277.5334.1990>
- DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K., Schwarz, C., Meloni, A., Young, C., Reeves, S. a. (1995). Huntingtin is a cytoplasmic protein associated with vesicles in human and rat brain neurons. *Neuron*, 14(5), 1075–81. [http://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90346-1](http://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90346-1)
- DiNatale, B. C., Murray, I. A., Schroeder, J. C., Flaveny, C. A., Lahoti, T. S., Laurenzana, E. M., Perdew, G. H. (2010). Kynurenic acid is a potent endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand that synergistically induces interleukin-6 in the presence of inflammatory signaling. *Toxicological Sciences*, 115(1), 89–97. <http://doi.org/10.1093/toxsci/kfq024>
- Djousse, L., Knowlton, B., Cupples, L. a, Marder, K., Shoulson, I., & Myers, R. H. (2002). Weight loss in early stage of Huntington's disease. *Neurology*, 59, 1325–1330. <http://doi.org/10.1212/01.WNL.0000031791.10922.CF>
- Fernandez-Salguero, P., Pineau, T., Hilbert, D. M., McPhail, T., Lee, S. S.,

- Kimura, S., Gonzalez, F. J. (1995). Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. *Science (New York, N.Y.)*, 268(5211), 722–726. <http://doi.org/10.1126/science.7732381>
- Flint Beal, M., Matson, W. R., Storey, E., Milbury, P., Ryan, E. A., Ogawa, T., & Bird, E. D. (1992). Kynurenic acid concentrations are reduced in Huntington's disease cerebral cortex. *Journal of the Neurological Sciences*, 108(1), 80–87. [http://doi.org/10.1016/0022-510X\(92\)90191-M](http://doi.org/10.1016/0022-510X(92)90191-M)
- García-Lara, L., Pérez-Severiano, F., González-Esquivel, D., Elizondo, G., & Segovia, J. (2015). Absence of aryl hydrocarbon receptors increases endogenous kynurenic acid levels and protects mouse brain against excitotoxic insult and oxidative stress. *Journal of Neuroscience Research*, 93(9), 1423–1433. <http://doi.org/10.1002/jnr.23595>
- Gilbert, G. J. (2009). Weight loss in Huntington disease increases with higher CAG repeat number. *Neurology*, 73(7), 572. <http://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181af0cf4>
- Giorgini, F., Guidetti, P., Nguyen, Q., Bennett, S. C., & Muchowski, P. J. (2005). A genomic screen in yeast implicates kynurenine 3-monooxygenase as a therapeutic target for Huntington disease. *Nature Genetics*, 37(5), 526–31. <http://doi.org/10.1038/ng1542>
- Goldberg, Y. P., Kalchman, M. A., Metzler, M., Nasir, J., Zeisler, J., Graham, R., Hayden, M. R. (1996). Absence of disease phenotype and intergenerational stability of the CAG repeat in transgenic mice expressing the human Huntington disease transcript. *Human Molecular Genetics*, 5(2), 177–185. <http://doi.org/10.1093/hmg/5.2.177>
- Goodman, A. O. G., Murgatroyd, P. R., Medina-Gomez, G., Wood, N. I., Finer, N., Vidal-Puig, A. J., Barker, R. A. (2008). The metabolic profile of early Huntington's disease- a combined human and transgenic mouse study. *Experimental Neurology*, 210(2), 691–698.

<http://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.12.026>

- Graveland, G. A., Williams, R. S., & DiFiglia, M. (1985). Evidence for degenerative and regenerative changes in neostriatal spiny neurons in Huntington's disease. *Science (New York, N.Y.)*, 227(4688), 770–3. <http://doi.org/10.1126/science.3155875>
- Grimbergen, Y. M. A., Knol, M. J., Bloem, B. R., Kremer, B. P. H., Roos, R. A. C., & Munneke, M. (2008). Falls and gait disturbances in Huntington's disease. *Movement Disorders*, 23(7), 970–976. <http://doi.org/10.1002/mds.22003>
- Gu, M., Gash, M., & Mann, V. M. (1996). Mitochondrial Defect in Huntington's Disease Caudate Nucleus. *Annals of Neurology*, 385–389. <http://doi.org/10.1002/ana.410390317>
- Gu, X., Greiner, E. R., Mishra, R., Kodali, R., Osmand, A., Finkbeiner, S., Yang, X. W. (2009). Serines 13 and 16 Are Critical Determinants of Full-Length Human Mutant Huntingtin Induced Disease Pathogenesis in HD Mice. *Neuron*, 64(6), 828–840. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.11.020>
- Guidetti, P., Bates, G. P., Graham, R. K., Hayden, M. R., Leavitt, B. R., MacDonald, M. E., Schwarcz, R. (2006). Elevated brain 3-hydroxykynurenine and quinolinate levels in Huntington disease mice. *Neurobiology of Disease*, 23(1), 190–197. <http://doi.org/10.1016/j.nbd.2006.02.011>
- Guidetti, P., Hemachandra Reddy, P., Tagle, D. A., & Schwarcz, R. (2000). Early kynurenergic impairment in Huntington's Disease and in a transgenic animal model. *Neuroscience Letters*, 283(3), 233–235. [http://doi.org/10.1016/S0304-3940\(00\)00956-3](http://doi.org/10.1016/S0304-3940(00)00956-3)
- Guidetti, P., Luthi-Carter, R. E., Augood, S. J., & Schwarcz, R. (2004). Neostriatal and cortical quinolinate levels are increased in early grade Huntington's disease. *Neurobiology of Disease*, 17(3), 455–461.

<http://doi.org/10.1016/j.nbd.2004.07.006>

Guillemin, G. J. (2012). Quinolinic acid, the inescapable neurotoxin. *FEBS Journal*, 279(8), 1356–1365. <http://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08485.x>

Gusella, J. F., Wexler, N. S., Conneally, P. M., Naylor, S. L., Anderson, M. a, Tanzi, R. E., ... Sakaguchi, a Y. (1983). A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature*, 306(5940), 234–238. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Hansson, O., Guatteo, E., Mercuri, N. B., Bernardi, G., Li, X. J., Castilho, R. F., & Brundin, P. (2001). Resistance to NMDA toxicity correlates with appearance of nuclear inclusions, behavioural deficits and changes in calcium homeostasis in mice transgenic for exon 1 of the huntington gene. *European Journal of Neuroscience*, 14(9), 1492–1504. <http://doi.org/10.1046/j.0953-816X.2001.01767.x>

Harris, C. a, Miranda, a F., Tanguay, J. J., Boegman, R. J., Beninger, R. J., & Jhamandas, K. (1998). Modulation of striatal quinolinate neurotoxicity by elevation of endogenous brain kynurenic acid. *British Journal of Pharmacology*, 124(2), 391–9. <http://doi.org/10.1038/sj.bjp.0701834>

Hascoët, M., & Bourin, M. (2009). The mouse light-dark box test. *Neuromethods*, 42, 197–223. <http://doi.org/10.1007/978-1-60761-303-9-11>

Heinsen, H., Rüb, U., Bauer, M., Ulmar, G., Bethke, B., Schüler, M., Schmitz, C. (1999). Nerve cell loss in the thalamic mediodorsal nucleus in Huntington's disease. *Acta Neuropathologica*, 97(6), 613–622. <http://doi.org/10.1007/s004010051037>

Heyes, M., Saito, K., Crowley, J., & Davis, E. (1992). Quinolinic acid and kynurenine pathway metabolism in inflammatory and noninflammatory neurological disease. *Brain*, (115), 1249/1273.

- Hodgson, J. G., Agopyan, N., Gutekunst, C. A., Leavitt, B. R., Lepiane, F., Singaraja, R., Hayden, M. R. (1999). A YAC mouse model for Huntington's disease with full-length mutant huntingtin, cytoplasmic toxicity, and selective striatal neurodegeneration. *Neuron*, 23(1), 181–192. [http://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80764-3](http://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80764-3)
- Jauch, D., Urbaiiska, E. M., Guidetti, P., Bird, E. D., Vonsattel, J. G., Whetsell, W., & Schwartz, R. (1995). Dysfunction of brain kynurenic acid metabolism in Huntington's disease: focus on kynurenine aminotransferases. *J Neurol Sci*, 130, 39–47.
- Kehoe, P., Krawczak, M., Harper, P. S., Owen, M. J., & Jones, A. L. (1999). Age of onset in Huntington disease: sex specific influence of apolipoprotein E genotype and normal CAG repeat length. *Journal of Medical Genetics*, 36(2), 108–11. <http://doi.org/10.1136/jmg.36.2.108>
- Kremer, B., Goldberg, P., Andrew, S., Theilmann, J., Telenius, H., Zeisler, J., Hayden, M. (1994). A worldwide study of the Huntington's disease mutation. *The New England Journal of Medicine*, 330(20), 1401–1406.
- Lee, J. M., Ramos, E. M., Lee, J. H., Gillis, T., Mysore, J. S., Hayden, M. R., Gusella, J. F. (2012). CAG repeat expansion in Huntington disease determines age at onset in a fully dominant fashion. *Neurology*, 78(10), 690–695. <http://doi.org/10.1212/WNL.0b013e318249f683>
- Lin, C. H., Juan, S. H., Wang, C. Y., Sun, Y. Y., Chou, C. M., Chang, S. F., Lee, Y. H. (2008). Neuronal activity enhances aryl hydrocarbon receptor-mediated gene expression and dioxin neurotoxicity in cortical neurons. *Journal of Neurochemistry*, 104(5), 1415–1429. <http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.05098.x>
- Lugo-Huitrón, R., Blanco-Ayala, T., Ugalde-Muñiz, P., Carrillo-Mora, P., Pedraza-Chaverrí, J., Silva-Adaya, D., La Cruz, V. P. De. (2011). On the antioxidant properties of kynurenic acid: Free radical scavenging activity and inhibition of oxidative stress. *Neurotoxicology and Teratology*, 33(5),

538–547. <http://doi.org/10.1016/j.ntt.2011.07.002>

Macdonald, V., Halliday, G. M., Trent, R. J., & McCusker, E. A. (1997). Significant loss of pyramidal neurons in the angular gyrus of patients with Huntington's disease. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, *23*, 492–495. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2990.1997.tb01326.x>

Mangiarini, L., Sathasivam, K., Seller, M., Cozens, B., Harper, A., Hetherington, C., Bates, G. P. (1996). Exon I of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell*, *87*(3), 493–506. [http://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81369-0](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81369-0)

Marchi, M., Risso, F., Viola, C., Cavazzani, P., & Raiteri, M. (2002). Direct evidence that release-stimulating $\alpha 7^*$ nicotinic cholinergic receptors are localized on human and rat brain glutamatergic axon terminals. *Journal of Neurochemistry*, *80*(6), 1071–1078. <http://doi.org/10.1046/j.0022-3042.2002.00805.x>

McGeer, E., & McGeer, P. (1976). Duplication of biochemical changes of Huntington's chorea by intrastriatal injections of glutamic and kainic acids. *Nature*, *262*, 774–776.

Menalled, L. B., Sison, J. D., Dragatsis, I., Zeitlin, S., & Chesselet, M. F. (2003). Time course of early motor and neuropathological anomalies in a knock-in mouse model of Huntington's disease with 140 CAG repeats. *Journal of Comparative Neurology*, *465*(1), 11–26. <http://doi.org/10.1002/cne.10776>

Mukai, H., Isagawa, T., Goyama, E., Tanaka, S., Bence, N. F., Tamura, A., Kopito, R. R. (2005). Formation of morphologically similar globular aggregates from diverse aggregation-prone proteins in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(31), 10887–92. <http://doi.org/10.1073/pnas.0409283102>

Naver, B., Stub, C., Møller, M., Fenger, K., Hansen, A. K., Hasholt, L., & Sørensen, S. A. (2003). Molecular and behavioral analysis of the R6/1

- Huntington's disease transgenic mouse. *Neuroscience*, 122(4), 1049–1057. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2003.08.053>
- Opitz, C. A., Litzenburger, U. M., Sahm, F., Ott, M., Tritschler, I., Trump, S., Platten, M. (2011). An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature*, 478(7368), 197–203. <http://doi.org/nature10491> [pii]r10.1038/nature10491
- Panov, a V, Gutekunst, C. a, Leavitt, B. R., Hayden, M. R., Burke, J. R., Strittmatter, W. J., & Greenamyre, J. T. (2002). Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines. *Nat Neurosci*, 5(8), 731–736. <http://doi.org/10.1038/nn884>
- Pearson, S. J., & Reynolds, G. P. (1992). Increased brain concentrations of a neurotoxin, 3-hydroxykynurenine, in Huntington's disease. *Neuroscience Letters*, 144(1–2), 199–201. [http://doi.org/10.1016/0304-3940\(92\)90749-W](http://doi.org/10.1016/0304-3940(92)90749-W)
- Pérez-Severiano, F., Ríos, C., & Segovia, J. (2000). Striatal oxidative damage parallels the expression of a neurological phenotype in mice transgenic for the mutation of Huntington's disease. *Brain Research*, 862(1–2), 234–237. [http://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)02082-5](http://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02082-5)
- Perkins, M. N., & Stone, T. W. (1982). An iontophoretic investigation of the actions of convulsant kynurenines and their interaction with the endogenous excitant quinolinic acid. *Brain Research*, 247(1), 184–187. [http://doi.org/10.1016/0006-8993\(82\)91048-4](http://doi.org/10.1016/0006-8993(82)91048-4)
- Petersen, S. L., Curran, M. A., Marconi, S. A., Carpenter, C. D., Lubbers, L. S., & McAbee, M. D. (2000). Distribution of mRNAs encoding the arylhydrocarbon receptor, arylhydrocarbon receptor nuclear translocator, and arylhydrocarbon receptor nuclear translocator-2 in the rat brain and brainstem. *Journal of Comparative Neurology*, 427(3), 428–439. [http://doi.org/10.1002/1096-9861\(20001120\)427:3<428::AID-](http://doi.org/10.1002/1096-9861(20001120)427:3<428::AID-)

CNE9>3.0.CO;2-P

- Polidori, M. C., Mecocci, P., Browne, S. E., Senin, U., & Beal, M. F. (1999). Oxidative damage to mitochondrial DNA in Huntington's disease parietal cortex. *Neuroscience Letters*, 272(1), 53–56. [http://doi.org/10.1016/S0304-3940\(99\)00578-9](http://doi.org/10.1016/S0304-3940(99)00578-9)
- Powers, B. E., Lin, T. M., Vanka, A., Peterson, R. E., Juraska, J. M., & Schantz, S. L. (2005). Tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure alters radial arm maze performance and hippocampal morphology in female AhR +/- mice. *Genes, Brain and Behavior*, 4(1), 51–59. <http://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2004.00098.x>
- Pringsheim, T., Wiltshire, K., Day, L., Dykeman, J., Steeves, T., & Jette, N. (2012). The incidence and prevalence of Huntington's disease: A systematic review and meta-analysis. *Movement Disorders*, 27(9), 1083–1091. <http://doi.org/10.1002/mds.25075>
- Ross, C. a, Aylward, E. H., Wild, E. J., Langbehn, D. R., Long, J. D., Warner, J. H., Tabrizi, S. J. (2014). Huntington disease: natural history, biomarkers and prospects for therapeutics. *Nature Reviews. Neurology*, 10(4), 204–16. <http://doi.org/10.1038/nrneurol.2014.24>
- Rubinsztein, D. (2003). The molecular pathology of Huntington's disease. *Current Medicinal Chemistry*, 3, 329–340.
- Rubinsztein, D., Barton, D., Davison, B., & Ferguson-Smith, M. (1993). Analysis of the huntingtin gene reveals a trinucleotide-length polymorphism in the region of the gene that contains two CCG-rich stretches and a correlation between decreased age of onset of Huntington's disease and CAG repeat number. *Hum Mol Genet*, (2), 1713–1715.
- Santamaría, A., Ríos, C., Solís-Hernández, F., Ordaz-Moreno, J., González-Reynoso, L., Altagracia, M., & Kravzov, J. (1996). Systemic DL-kynurenine and probenecid pretreatment attenuates quinolinic acid-induced

- neurotoxicity in rats. *Neuropharmacology*, 35(1), 23–28.
[http://doi.org/10.1016/0028-3908\(95\)00145-X](http://doi.org/10.1016/0028-3908(95)00145-X)
- Sathyasaikumar, K., Stachowski, E., Amori, L., Guidetti, P., & Paul, J. (2010). Dysfunctional Kynurenine Pathway Metabolism in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *J Neurochem*, 113(6), 1416–1425.
<http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06675.x>.DYSFUNCTIONAL
- Schilling, G., Becher, M. W., Sharp, A. H., Jinnah, H. A., Duan, K., Kotzuc, J. A., Borchelt, D. R. (1999). Intranuclear inclusions and neuritic aggregates in transgenic mice expressing a mutant N-terminal fragment of huntingtin. *Human Molecular Genetics*, 8(3), 397–407.
<http://doi.org/10.1093/hmg/8.3.397>
- Schwarcz, R., Whetsell, W., & Mangano, R. (1983). Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain. *Science*, 219(4582), 316–318.
- Spargo, E., Everall, I. P., & Lantos, P. L. (1993). Neuronal loss in the hippocampus in Huntington's disease: a comparison with HIV infection. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 56(5), 487–91.
<http://doi.org/10.1136/jnnp.56.5.487>
- Stone, T. W., & Darlington, L. G. (2002). Endogenous kynurenines as targets for drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov*, 1(August), 609–620. <http://doi.org/10.1038/nrd870>
- Trottier, Y., Devys, D., Imbert, G., Saudou, F., An, I., Lutz, Y., Mandel, J. (1995). Cellular localization of the Huntington's disease protein and discrimination of the normal and mutated form. *Nature Genetics*, 10, 196–201. <http://doi.org/10.1038/nbt0289-147>
- Vonsattel, J.-P., Myers, R. H., Stevens, T. J., Ferrante, R. J., Bird, E. D., & Richardson, E. P. (1985). Neuropathological Classification of Huntington's Disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 44(6), 559–577. <http://doi.org/10.1097/00005072-198511000-00003>

- Wang, J., Simonavicius, N., Wu, X., Swaminath, G., Reagan, J., Tian, H., & Ling, L. (2006). Kynurenic acid as a ligand for orphan G protein-coupled receptor GPR35. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(31), 22021–22028. <http://doi.org/10.1074/jbc.M603503200>
- Winn, P., Stone, T. W., Latimer, M., Hastings, M. H., & Clark, A. J. M. (1991). A comparison of excitotoxic lesions of the basal forebrain by kainate, quinolinate, ibotenate, N-methyl-D-aspartate or quisqualate, and the effects on toxicity of 2-amino-5-phosphonovaleric acid and kynurenic acid in the rat. *British Journal of Pharmacology*, *102*(4), 904–908. <http://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1991.tb12274.x>
- Zádori, D., Nyiri, G., Szonyi, A., Szatmári, I., Fülöp, F., Toldi, J., Klivényi, P. (2011). Neuroprotective effects of a novel kynurenic acid analogue in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)*, *118*(6), 865–875. <http://doi.org/10.1007/s00702-010-0573-6>
- Zuccato, C., & Cattaneo, E. (2007). Role of brain-derived neurotrophic factor in Huntington's disease. *Progress in Neurobiology*, *81*(5–6), 294–330. <http://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2007.01.003>
- Zuccato, C., Tartari, M., Crotti, A., Goffredo, D., Valenza, M., Conti, L., Cattaneo, E. (2003). Huntingtin interacts with REST/NRSF to modulate the transcription of NRSE-controlled neuronal genes. *Nature Genetics*, *35*(1), 76–83. <http://doi.org/10.1038/ng1219>
- Zwilling, D., Huang, S. Y., Sathyaikumar, K. V., Notarangelo, F. M., Guidetti, P., Wu, H. Q., Muchowski, P. J. (2011). Kynurenine 3-monooxygenase inhibition in blood ameliorates neurodegeneration. *Cell*, *145*(6), 863–874. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2011.05.020>

JURADO DE APROBACIÓN DE TESIS

Director de tesis:

Dr. José Víctor Segovia Vila

Asesores:

Dra. Francisca Pérez Severiano

Dr. Benjamín Florán Garduño