

Cinvestav

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

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS

**Evaluación del efecto neuroprotector de la combinación de
laquinimod y una dieta rica en ácidos grasos en un modelo
murino de la enfermedad de Huntington**

T E S I S

Que presenta

M en C Quetzalli Denisse Angeles López

**Para obtener el grado de
DOCTORA EN CIENCIAS**

EN LA ESPECIALIDAD DE NEUROBIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

Directores de Tesis:

Dr. José Segovia Vila

Dra. Francisca Pérez Severiano

Ciudad de México

Julio, 2023

DEDICATORIA

A mi familia.

AGRADECIMIENTOS

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

A mis tutores: Dra. Francisca Pérez Severiano y Dr. José Segovia Vila por darme la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo.

A mis sinodales: Dra. María Eugenia del Carmen Mendoza Garrido, Dr. Benjamín Florán Garduño, Dra. Claudia González Espinosa y Dra. Ana María Estrada Sánchez por sus observaciones y sugerencias que ayudaron a enriquecer este trabajo.

A la M. en C. Argelia Sánchez Chinchillas del Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química UNAM, por el apoyo en la formulación de las dietas para los ratones.

A la Dra. Adriana Morales Martínez por todas sus enseñanzas y apoyo.

Al M. en C. Miguel Hernández Cerón del Departamento de Neuropsicofarmacología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía por el apoyo en el manejo del software Compusyn.

A las auxiliares de investigación: Paula Vergara Zubillaga y Araceli Navarrete Alonso, por el apoyo en el laboratorio.

A mis compañeros integrantes del Laboratorio 44 en CINVESTAV y del Laboratorio de Neurofarmacología Molecular y Nanotecnología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	7
ABSTRACT	8
1. Introducción.....	9
1.1 Excitotoxicidad.....	10
1.2 Procesos inflamatorios en la EH.....	11
1.2.1 Papel de las células gliales en la patogénesis de la EH.....	11
1.3 Vía de las kinureninas.....	13
1.4 Disfunción mitocondrial y estrés oxidante en EH.....	16
1.5 Modelos experimentales para el estudio de la EH.....	19
1.5.1 Modelo excitotóxico por inyección intraestriatal de AQ	19
1.6 Tratamientos para la EH	20
1.6.1 Laquinimod y sus sitios de acción.....	23
1.6.2 Ácidos grasos y su mecanismo de acción.....	24
1.7 Combinación de fármacos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.....	27
2. Justificación.....	29
3. Hipótesis.....	30
4. Objetivo general	30
5. Objetivos particulares	30
6. Materiales y métodos	31
6.1 Sujetos de experimentación.....	31
6.2 Diseño experimental para cumplir con el objetivo I.....	31
6.2.1 Diseño de la curva dosis de laquinimod y respuesta a los giros ipsilaterales en el modelo inducido por AQ.	32

6.2.2	Diseño de la curva dosis de % de aporte calórico (% AC) en la dieta y respuesta a los giros ipsilaterales en el modelo inducido por AQ.	32
6.3	Diseño experimental para cumplir con el objetivo II.....	33
6.4	Diseño experimental para cumplir con el objetivo III.....	34
6.5	Diseño experimental para cumplir con el objetivo IV	35
6.6	Diseño experimental para cumplir con el objetivo V	35
6.7	Modelo de la enfermedad de Huntington	35
6.7.1	Evaluación de conducta de giro	35
6.8	Pruebas conductuales	36
6.8.1	Campo abierto.....	36
6.8.2	Rotarod	36
6.9	Determinación de parámetros bioquímicos.....	37
6.10	Extracción de proteínas y Western blot	37
6.11	Tinción de Fluoro Jade B.....	38
6.12	Inmunofluorescencia.....	39
6.13	Evaluación del complejo II de la cadena respiratoria	39
6.13.1	Aislamiento de membranas enriquecidas con complejos mitocondriales	39
6.13.2	Actividad del complejo II de la cadena mitocondrial	40
6.14	Evaluación del daño oxidante	40
6.14.1	Cuantificación de la PL.....	41
6.14.2	Cuantificación de la formación de EROs.....	41
6.15	Análisis estadístico	41
7.	Resultados	43
7.1	Determinación de curvas dosis-respuesta.....	43

7.2 Determinación de la combinación de dosis adecuada de laquinimod y la dieta rica en ácidos grasos	46
7.3 Efecto neuroprotector de la administración del tratamiento en el modelo de AQ.....	50
7.4 Efecto del tratamiento en la actividad del complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial y el estrés oxidante en el modelo de AQ	57
7.5 Efecto del tratamiento en la activación de astrocitos y microglía en el estriado de ratones lesionados con AQ y en la presencia de IL-6 en el suero.....	59
8. Discusión.....	62
9. Resumen de resultados.....	65
10. Conclusión.....	65
11. Perspectivas.....	66
12. Referencias	67

RESUMEN

La Enfermedad de Huntington (EH) es un padecimiento hereditario neurodegenerativo progresivo que clínicamente se caracteriza por la presencia de movimientos involuntarios y síntomas psiquiátricos y conductuales, siendo una de las alteraciones presentes en esta enfermedad la disfunción energética y la neuroinflamación conduciendo a la pérdida neuronal en la corteza y el estriado de los pacientes. Actualmente existen tratamientos que tienen por objetivo contrarrestar los síntomas de la enfermedad, sin embargo, no existen tratamientos que puedan retrasar la aparición de síntomas o detener su progresión.

El laquinimod (Laq) actúa sobre el sistema nervioso central modulando la inflamación, promoviendo la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y disminuyendo la activación de los astrocitos. Por otra parte, se ha reportado que una dieta rica en ácidos grasos esenciales ejerce un efecto neuroprotector contra el daño neuronal en un modelo de la EH inducido por la administración intraestriatal de ácido quinolínico (AQ), un agonista del receptor a N-metil-D-aspartato (NMDA). El presente trabajo tuvo como objetivo determinar el efecto de la combinación de Laq y una dieta rica en ácidos grasos esenciales en un modelo de EH inducida por la administración intraestriatal de AQ. Los resultados obtenidos muestran que la terapia combinada (DE50 Laq + DE50 dieta rica en ácidos grasos) tiene un efecto neuroprotector sinérgico en los parámetros evaluados. Se encontró que el pretratamiento de la combinación evitó el daño neuronal evidenciado por la disminución de los giros ipsilaterales en los ratones lesionados con AQ, además en el análisis del tejido estriatal se encontró una reducción en el número de las células degeneradas y la expresión del BDNF se encontró aumentada. Por otro lado, al explorar el estado oxidante en el modelo inducido por AQ, posterior al pretratamiento combinado observamos una prevención significativa del daño oxidante y en el aspecto de modulación del sistema inmune, reportamos una disminución en la activación de los astrocitos. Este trabajo aporta evidencia del beneficio de una combinación de terapias que actúan por diferentes vías que se ven afectadas en la EH.

ABSTRACT

Huntington's disease (HD) is a progressive neurodegenerative inherited disorder that is clinically characterized by the presence of involuntary movements and psychiatric and behavioral symptoms. Some alterations in this disorder are energy dysfunction and neuroinflammation leading to neuron loss in the cortex and striatum of the patients. Currently, there are treatments aiming to counter the symptoms of the disease; however, no medication can delay the onset of symptoms or their progression.

Laquinimod (Laq) acts on the central nervous system modulating inflammation, promoting the expression of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF), and decreasing astrocytes activation. Additionally, an essential fatty acid-rich diet exerts a neuroprotective effect against the striatal administration of quinolinic acid (QA), an agonist of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor. The present work had the objective to determinate the effect of the combination of Laq and an essential fatty acid-rich diet in a HD model induced by the intraestriatal injection of QA. The results show that the combined therapy (ED_{50} Laq+ ED_{50} essential fatty acid-rich diet) has a neuroprotective synergic effect. The pre-treatment using the combination avoid the neuronal damage by the diminution of the rotatory behavior, and in addition avoid the loss in motor coordination in mice administrated wit QA, also the analysis of the striatal tissue shows the reduction of cells in neurodegeneration and the increased expression of BDNF. On the other hand, the analysis of oxidative stress induced by QA shows a significative prevention of the oxidative damage by the combined therapy, also have a beneficial effect in the astrocyte's activation. This work provides evidence of the benefit of a therapy combination that act by different pathways that are affected in HD.

1. Introducción

La enfermedad de Huntington (EH) es una enfermedad hereditaria, neurodegenerativa y progresiva. La mutación causante de esta enfermedad es la expansión del trinucleótido CAG (>36) en el gen que codifica para la proteína Huntingtina (HHT), produciendo así a la huntingtina mutada (mHTT). El trinucleótido CAG codifica para el aminoácido glutamina y en condiciones normales se repite entre 6 y 35 veces, cuando existen más de 36 repetidos en el gen se produce la mHTT; las personas que heredan el gen mutado presentarán los síntomas de esta enfermedad en una etapa temprana o tardía de su vida dependiendo del número de repetidos del trinucleótido (Tellone et al., 2019). Aquellas personas con más de 40 repetidos desarrollan la enfermedad en una etapa tardía de su vida, mientras que aquellos con 60 repetidos desarrollan una forma severa de EH (EH juvenil) con síntomas antes de los 20 años de edad, mientras que, las expansiones de 80 y hasta 100 repetidos de CAG ocasionan una forma infantil de esta enfermedad. Los individuos que padecen EH en una etapa tardía de su vida normalmente cursan con una triada característica de síntomas motores, cognitivos y psiquiátricos (Ghosh & Tabrizi, 2018). Los síntomas de la EH suelen aparecer entre los 35-40 años y los pacientes tienen una sobrevida promedio de 18 años (Bates et al., 2015).

La HTT tiene una expresión ubicua y su función fisiológica no se ha definido completamente, sin embargo, se sabe que controla el transporte de organelos, coordina la división celular y regula la cillogénesis y transcripción génica de factores como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Saudou & Humbert, 2016).

La mHTT, de igual forma, se expresa de manera ubicua y en los pacientes con EH se ha observado una pérdida selectiva de neuronas GABAérgicas espinosas medianas (MSN) en el putamen y globo pálido (Kim et al., 2021). Además, la estructura alterada de la mHTT modifica su interacción con otras proteínas dando como resultado una ganancia de función tóxica y pérdida de función en algunos procesos, lo que provoca fenómenos como excitotoxicidad, respuesta inmune alterada, desbalance en la vía de las kinureninas (VK), anomalías en la función mitocondrial y generación de estrés oxidante, entre otros procesos, lo que da lugar

a la degeneración neuronal (Frank, 2014; Sepers & Raymond, 2014; Szalardy et al., 2012).

1.1 Excitotoxicidad

Las MSN constituyen aproximadamente el 95% de la población total de neuronas en el estriado y reciben aferencias glutamatérgicas de la corteza, y dopaminérgicas del mesencéfalo. El glutamato además de ser el principal neurotransmisor excitador en el cerebro también está involucrado en la muerte neuronal a través de un mecanismo conocido como excitotoxicidad. La excitotoxicidad fue uno de los primeros mecanismos patogénicos descritos en la EH (Estrada Sánchez et al., 2008).

En condiciones fisiológicas normales, después de que el glutamato es liberado de las terminales sinápticas, puede activar a 3 distintos subtipos de receptores ionotrópicos postsinápticos: ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPA), kainato y N-metil-D-aspartato (NMDA) (Raymond, 2003).

Los receptores a NMDA (rNMDA), se localizan predominantemente en las espinas dendríticas, pero también se encuentran en regiones presinápticas y extra-sinápticas. La activación de rNMDA sinápticos es asociada con supervivencia neuronal, plasticidad sináptica, neurogénesis, aprendizaje y memoria. De forma contraria, la activación de rNMDA extra sinápticos promueve vías de muerte celular (Fão et al., 2022; Verma et al., 2022). La función alterada de los rNMDA ha sido relacionada con la EH a través del mecanismo previamente mencionado.

La excitotoxicidad es un fenómeno ocasionado por el aumento en la liberación de glutamato y sobre activación de los rNMDA extra sinápticos que a su vez ocasionan la disminución de BDNF (Jurcau, 2022). Además, se sabe que células gliales como los astrocitos y la microglía, así como el aumento de metabolitos de la vía de las kinureninas como el ácido quinolínico (AQ) y la 3-hidroxiquinurenina (3HK), contribuyen al desbalance en la homeostasis del calcio intracelular y la función mitocondrial favoreciendo la degeneración y la muerte neuronal (Kim et al., 2021).

1.2 Procesos inflamatorios en la EH

La neuroinflamación es un proceso benéfico para el tejido neuronal, ya que permite la eliminación de restos celulares y promover el proceso de reparación tisular, sin embargo, cuando este proceso se exagera o se desregula, los mediadores inflamatorios pueden actuar directamente sobre las neuronas, contribuyendo a la muerte y resultando así en un círculo continuo de neuroinflamación y neurodegeneración (Kaushik & Basu, 2013). Durante la neuroinflamación los niveles excesivos de mediadores como el factor de necrosis tumoral (TNF- α), interleucinas y quimiocinas pueden influir en la neurogénesis, la neurodegeneración y la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE) (Skaper, et al., 2014). La elevación del TNF- α es una característica común de las enfermedades neurodegenerativas y los inhibidores de TNF- α son fármacos potenciales para tratar la neurodegeneración (Zheng et al., 2014). El TNF- α actúa como un mediador importante de la neuroinflamación, mientras que varias citocinas y quimiocinas coestimulantes actúan para potenciar los efectos de TNF- α (Hensley et al., 2003). En la EH existe un incremento en la secreción de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α , interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10), interleucina 1 beta (IL-1 β) e interleucina 12 (IL-12), y de quimiocinas como la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (CCL2) tanto en estadios presintomáticos como en etapas tardías de la enfermedad, sugiriendo que la liberación de estas sustancias proinflamatorias no sólo es un proceso que sucede a consecuencia del establecimiento de la enfermedad, sino además es un proceso activo en su progresión (Jimenez-Sanchez et al., 2017).

1.2.1 Papel de las células gliales en la patogénesis de la EH

Los astrocitos son células abundantes en el sistema nervioso central (SNC), dan soporte a las neuronas, promueven la formación y el funcionamiento de las sinapsis y capturan el glutamato extracelular previniendo así la excitotoxicidad, entre otras funciones (Liddel et al., 2017). El funcionamiento anormal de estas células afecta varios circuitos neuronales y produce comportamientos anormales (Wilton & Stevens, 2020).

Los astrocitos responden a daños y enfermedades que afectan el SNC modificando su expresión génica, su estructura celular y su función. La respuesta a un daño o enfermedad causa la activación de los astrocitos que comúnmente se conoce como astrocitosis reactiva o astrogliosis (Sofroniew, 2015).

En el cerebro *post mortem* de pacientes con EH se han detectado agregados de mHTT en astrocitos así como la pérdida del transportador de glutamato 1 (GLT1) y del transportador de aminoácidos excitadores 2 (EAAT2) correlacionándose con un aumento de glutamato en la sinapsis y contribuyendo así a la generación de excitotoxicidad (Jurcau, 2022). Además, se ha observado el incremento en astrogliosis de acuerdo con la severidad de la enfermedad en tejidos humanos *post mortem*. En modelos murinos de la EH, los astrocitos en el estriado muestran cambios morfológicos previos a la manifestación de síntomas motores y cognitivos. Algunos de estos cambios son la reducción en el área de superficie del astrocito, así como en sus procesos (Jimenez-Sanchez et al., 2017; Wilton & Stevens, 2020).

La microglía son las células del sistema inmune residentes del SNC (Frost & Schafer, 2016). Cuando no existe ningún estímulo inflamatorio, la microglía se mantiene en un estado de “vigilancia” en el que presenta una morfología ramificada que le permite monitorear el área alrededor de sus cuerpos celulares, además, promueve el desarrollo y la función de las conexiones neuronales a través de la liberación de sustancias neuroactivas: (factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1)) y el BDNF, así como la remoción de los excesos de sinapsis.

Después de un estímulo inflamatorio proveniente de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) o citocinas, la microglía se vuelve “activa”, estado que le permite participar en la respuesta inflamatoria. Actualmente se ha postulado que la microglía activa puede adoptar dos estados M1 (clásica) y M2 (alternativa), siendo el primero el que promueve una respuesta inflamatoria innata y adaptativa en el cerebro liberando factores citotóxicos como óxido nítrico (NO), especies reactivas de oxígeno (ERO) y AQ induciendo neurotoxicidad, mientras que la microglía M2 libera mediadores anti-inflamatorios y neuroprotectores (S. Guo et al., 2022).

Durante la transición entre la microglía en estado de “vigilancia” a microglía “activa” ocurren una serie de cambios morfológicos, así como la transcripción de ciertos genes; su mal funcionamiento conduce a la alteración en el número de sinapsis, generando así cambios en los circuitos neuronales que inducen alteraciones en la conducta (Palpagama et al., 2019; Wilton & Stevens, 2020).

En el cerebro de pacientes con EH, así como en modelos murinos, la microglía adopta una forma ameboide y presenta una disminución en sus procesos primarios. Además, regula a la alta la expresión de citocinas pro-inflamatorias como son TNF- α , IL-6, IL-10, interleucina 1 beta (IL-1 β) e interleucina 12 (IL-12) en el estriado de modelos murinos de la enfermedad (Pido-Lopez et al., 2018). También, se ha observado la activación de la microglía en personas portadoras de la mutación en el gen de la HTT previo a la manifestación de síntomas (Politis et al., 2015; Tai et al., 2007).

1.3 Vía de las kinureninas

La VK es la principal vía metabólica por la que se metaboliza el aminoácido triptófano (Figura 1), su principal metabolito es el cofactor nicotinamina-adenina-dinucleótido (NAD⁺) (Amaral et al., 2013). En esta vía, se producen metabolitos neuroactivos como el AQ, la 3-HK y el ácido kinurénico (KYNA).

El AQ es un metabolito neurotóxico que actúa como un agonista competitivo a los rNMDA; su potencial neurotóxico puede atribuirse a distintos mecanismos que incluyen la estimulación de los receptores previamente mencionados, 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, que serán explicados a continuación (Guillemin, 2012). La sobre estimulación de los rNMDA causa influxo de Ca²⁺ que promueve la activación de proteasas y endonucleasas causando la generación de ERO y NO y disminuye la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) causando disfunción mitocondrial y ocasionando muerte neuronal por peroxidación de lípidos y apoptosis. Además, estimula la proliferación

de astrocitos aumentando la liberación de citocinas y como inhibe la recaptura de glutamato incrementa la activación de los rNMDA (Addae & Stone, 2014).

El KYNA, por su parte, es un antagonista endógeno del receptor NMDA que actúa inhibiendo el sitio de unión a glicina del receptor. Además, también es antagonista a los receptores a AMPA, 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 $\alpha 7$ -nicotínicos de acetilcolina ($\alpha 7$ nAChR). Al respecto, está reportado que las terminales axonales glutamatérgicas en la neocorteza del humano y el estriado de la rata expresan $\alpha 7$ nAChR 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).

Adicionalmente, 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 (Jinghong 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 (Ver figura 1) (Sathyasaikumar et al., 2018).

En la EH se han observado alteraciones en las concentraciones de algunos metabolitos de la VK. La 3-HK y el AQ se encuentran elevados en el cerebro de pacientes en estadios tempranos de EH. También se ha observado la disminución cortical, estriatal y en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de KYNA, así como de las enzimas kinurenina aminotransferasas (KATs) (Beal et al., 1992; Beal et al., 1990; Guidetti et al., 2004; Jauch et al., 1995; Pearson & Reynolds, 1992).

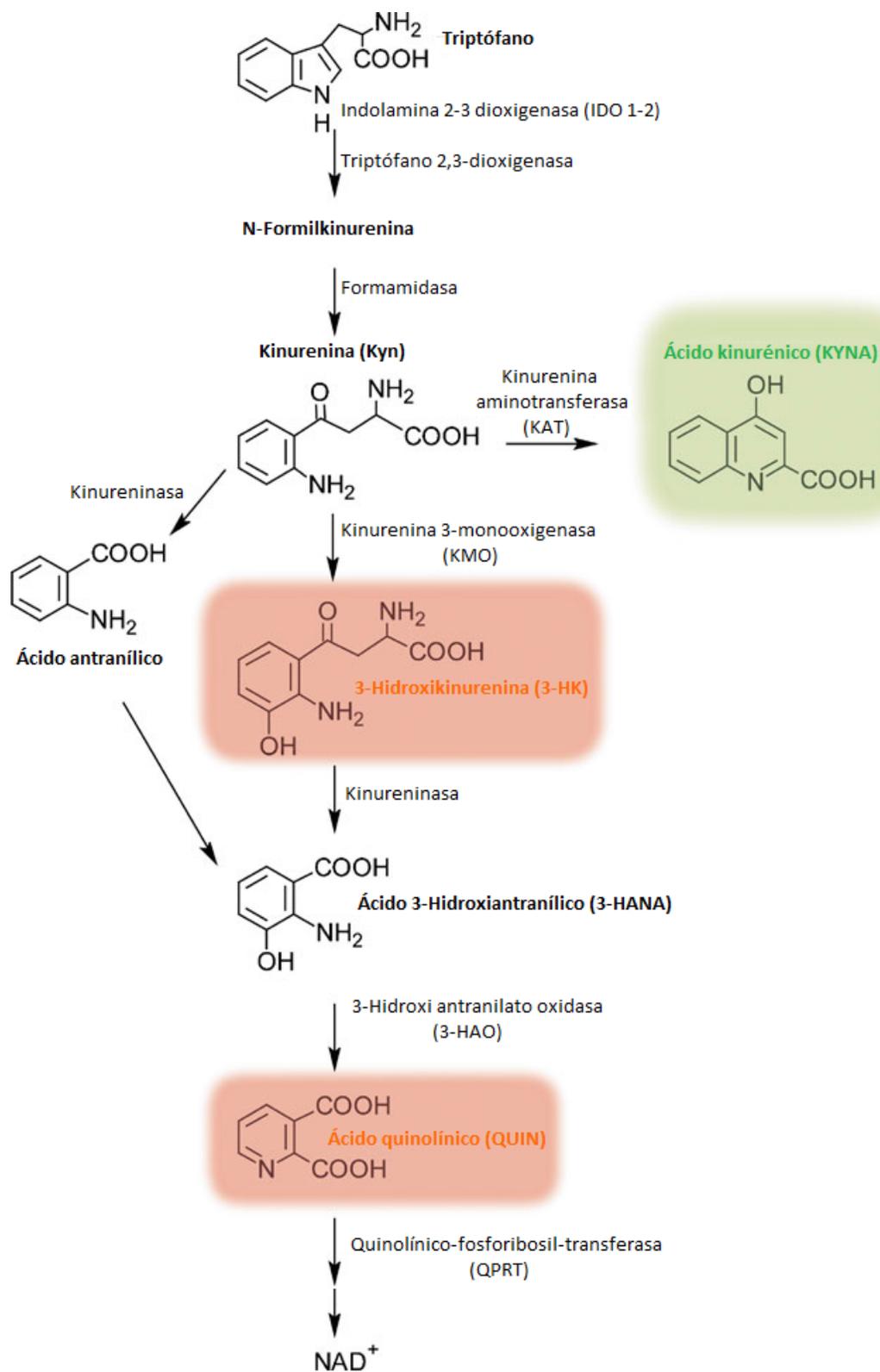


Figura 1. Vía de las kinureninas. Modificado de Amaral et al., 2013.

1.4 Disfunción mitocondrial y estrés oxidante en EH

La deficiencia bioenergética en pacientes con EH se ha evidenciado por la reducción en la captación de glucosa en la corteza y estriado previos a la muerte neuronal en el estriado y a la aparición de otros síntomas patológicos de la enfermedad (Gil & Rego, 2008). También se ha observado el incremento de lactato en la corteza de pacientes sintomáticos y presintomáticos, este incremento se ha relacionado con la deficiencia de los complejos mitocondriales II y III de la cadena mitocondrial limitando el ciclo del ácido cítrico y la oxidación del piruvato (originado en la glucólisis) que pasa a ser metabolizado a lactato promoviendo su acumulación (Jenkins et al., 1998), además de que los pacientes cursan con pérdida de peso y de musculatura independiente de su ingesta de alimentos (Djousse et al., 2002; Kirkwood et al., 2001; Sanberg et al., 1981).

Por lo anterior, la disfunción mitocondrial en la EH se ha descrito como un factor fisiopatológico en lugar de ser sólo un efecto causal (Saft et al., 2005) y que precede la aparición de síntomas motores (Panov et al., 2002). Algunos estudios en tejido cortical muestran morfología mitocondrial anormal (Goebel et al., 1978; Tellez-Nagel et al., 1974), deficiencia en la actividad del complejo II, III y IV de la cadena de transporte de electrones (Benchoua et al., 2006; Gil & Rego, 2008; Stahl & Swanson, 1974) además de actividad deficiente de enzimas esenciales para el ciclo de los ácidos tricarboxílicos como la aconitasa en la corteza y el estriado (Tabrizi et al., 2000). Aunado a lo anterior existe disminución en el ADN mitocondrial en la corteza cerebral en pacientes con EH, esta disminución también compromete la función de las mitocondrias presentes en esta región (Horton et al., 1995; Wang et al., 2021).

Periféricamente, se ha observado disminución de los complejos mitocondriales en el músculo esquelético (Turner et al., 2007), morfología mitocondrial anormal en linfocitos y alteración en el ADN mitocondrial en leucocitos (Liu et al., 2008).

La alteración en la función mitocondrial resulta en defectos en la producción de ATP y la regulación de Ca^{2+} (Quintanilla & Johnson, 2009), así como en el incremento en la producción de ERO (Elfawy & Das, 2019). Algunos estudios sugieren que la

mHTT puede interactuar con la membrana externa mitocondrial provocando anomalías en los niveles de Ca^{2+} intracelular que resultan en el colapso del potencial de membrana de las mitocondrias promoviendo la apertura del poro de transición de permeabilidad de la membrana interna mitocondrial liberando mediadores apoptóticos al citosol como el citocromo C (Mackay et al., 2018), además se ha descrito su interacción con la traslocasa de transporte interno 23 (TIM23), inhibiendo el transporte interno de la mitocondria (Yablonska et al., 2019). La mHTT también interfiere con el transporte axonal de organelos, lo que puede provocar la reducción del transporte de la mitocondria a la sinapsis (Choo et al., 2004). Además, la presencia de mHTT se asocia al decremento en la transcripción de genes mitocondriales que median la biogénesis de la mitocondria y la respiración mitocondrial, en particular la transcripción del coactivador del receptor gamma 1- α activado por el proliferador de peroxisomas (PGC1 α), involucrado en el metabolismo de la glucosa, β -oxidación de ácidos grasos y la inducción de la biogénesis mitocondrial (Lv et al., 2018) (ver figura 2).

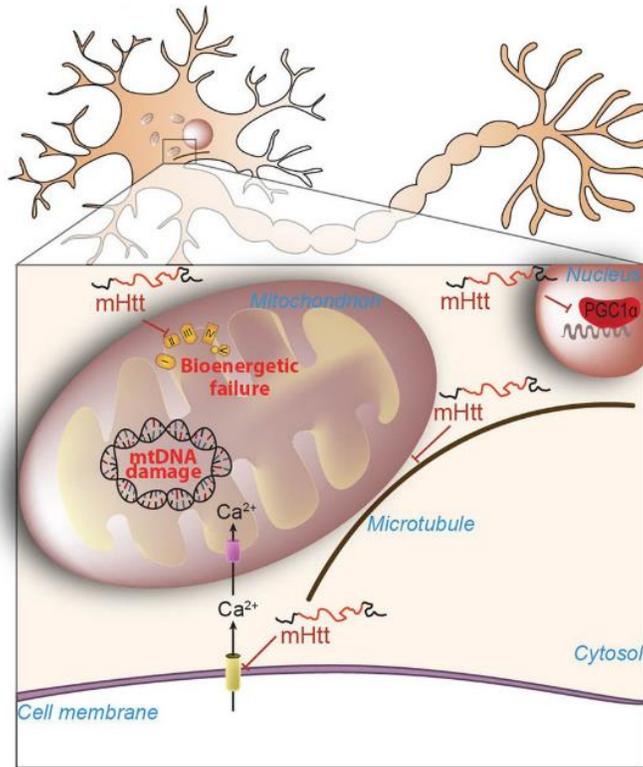


Figura 2. Disfunción mitocondrial en la EH. Franco-Iborra et al., 2018.

1.5 Modelos experimentales para el estudio de la EH

Los primeros modelos para el estudio de la EH se basaron en el uso de excitotoxinas administradas de forma intraestriatal como el ácido kaínico (KA) y el AQ, los cuales causan la muerte selectiva de las neuronas espinosas medianas por excitotoxicidad (Coyle & Schwarcz, 1976; McGeer & McGeer, 1976; Schwarcz et al., 1983; Beal et al., 1986). Posteriormente, fueron usados compuestos que alteran la función de la mitocondria como el ácido 3-nitropropiónico, inhibidor de la succinato deshidrogenasa que induce un daño patológico similar a las toxinas anteriormente mencionadas en el estriado de los ratones (Bogdanov et al., 1998). Debido a las limitaciones que los modelos anteriores presentaban en cuanto a estudios sobre la progresión de la enfermedad y a que no es posible replicar la neuropatología observada en los pacientes con EH, varios modelos genéticos fueron desarrollados.

Los primeros modelos transgénicos surgieron una vez que la mutación que ocasiona la enfermedad fue descubierta y se desarrollaron cultivos celulares y animales invertebrados como gusanos, moscas de la fruta, animales vertebrados como ratas (Van et al., 2005), cerdos y en monos (Chan et al., 2015) y ovejas (Jacobsen et al., 2010). Los modelos de la EH desarrollados en ratón tienen insertado en su genoma un fragmento o el gen completo de la HTT mutada, además, poseen su propia *htt* silvestre; los modelos *knock-in* tienen aumentado el número de repetidos CAG en el gen endógeno bajo el control del promotor murino (Pouladi et al., 2013).

1.5.1 Modelo excitotóxico por inyección intraestriatal de AQ

El AQ es un metabolito endógeno de la vía de las kinureninas y es un agonista a los receptores nNMDA. Este modelo es el más utilizado en roedores y primates no humanos. La inyección intraestriatal de AQ produce la despolarización de las neuronas por influjo de calcio intracelular que provoca la producción de radicales libres que a su vez producen la muerte selectiva de neuronas GABAérgicas y se presenta una disminución en los niveles de ATP en el estriado de las ratas (Bordelon et al., 2010); estos efectos son similares a los observados en los pacientes con EH. Además, mediante la inyección de apomorfina (agonista de receptores a dopamina D1 y D2), es posible inducir giros ipsilaterales a la lesión y cuantificar la conducta

rotatoria que presentan los ratones lesionados con AQ (Vazey et al., 2006). Así mismo, se ha descrito que en el modelo de AQ en rata, existe disfunción mitocondrial similar a la observada en pacientes con EH y otros modelos animales (Bordelon et al., 2010).

Debido a las características antes mencionadas, este modelo es útil para el estudio de compuestos con potenciales terapéuticos, previo al uso de modelos transgénicos.

1.6 Tratamientos para la EH

Hasta el momento no existe ningún tratamiento disponible para contrarrestar la enfermedad. Los tratamientos usados actualmente son sólo para tratar los síntomas motores, psiquiátricos y cognitivos y pueden categorizarse en medicamentos para tratar las alteraciones motoras, antipsicóticos, antidepresivos, estabilizadores del ánimo y terapias no farmacológicas (tabla 1) (Ferguson et al., 2022).

Tabla 1. Medicamentos usados actualmente para tratar los síntomas de la EH.

Medicamentos para tratar las alteraciones motoras	Antipsicóticos	Antidepresivos	Estabilizadores del ánimo
Tetrabazina	Olanzapina	Citalopram	Lamotrigina
Deutetrabenazina	Ridisperona	Fluoxetina	Carbamazepina
	Haloperidol y flufenazina	Sertralina	
	Aripiprazol		
	Clozapina		

Modificada de Ferguson et al., 2022 y Kim et al., 2021.

En los últimos años se han desarrollado tratamientos experimentales que actualmente se encuentran en fase de ensayos clínicos y que tienen como objetivo disminuir los niveles de la mHTT usando oligonucléotidos antisentido (ASO), ARN de interferencia (iARN), terapias basadas en el uso de células troncales, anticuerpos y terapias que tiene como objetivo contrarrestar la neuroinflamación observada en la EH. Además, algunos tratamientos que se encuentran en fase pre-clínica incluyen el uso de dedos de zinc (ZFP), nucleasas efectoras similar a un activador de la transcripción (TALEN) y terapias usando el sistema CRISPR/Cas9 (tabla 2) (Ferguson et al., 2022; Jimenez-Sanchez et al., 2017).

Tabla 2. Tratamientos en desarrollo para la EH

Terapia	Fase de desarrollo	Administración y mecanismo de acción	Promotor
ASO			
Tominersen	Fase 3	Intratecal-múltiples dosis/ unión a HTT silvestre y mHTT, induce su degradación.	Hoffmann-La Roche
WVE-120102/120101	Fase 1b/2a	Intratecal-múltiples dosis/ unión a SNPs específicos (rs362331 y rs362307).	Wave life Sciences
(CUG)7	Pre-clínica	Infusión intraventricular-múltiples dosis/ unión a repetidos CAG en ARNm.	BioMarin
TTX-3360	Pre-clínica	Infusión intraventricular-múltiples dosis/ unión a proteínas de la vía de reparación de los errores de emparejamiento.	Triplet Therapeutics
iARN			
AMT-130	Fase 1b/2a	Inyección intraestriatal-una dosis/ miARN que activa RISC y detiene la síntesis de mHTT y HTT silvestre.	UniQure
AAV.shHD2.1	Pre-clínica	Inyección intracraneal-una dosis/ shARN que reduce la expresión de mHTT.	Spark
VY-HTT01	Pre-clínica	Inyección intracraneal-una dosis/ miARN que promueve la degradación del ARNm de HTT.	Voyager
Dedos de Zinc			
TAK-686	Pre-clínica	Inyección intraestriatal-una dosis/ dirigido a repetidos CAG, reduce mHTT.	Takeda and Sangamo
ZF-KOX1	Pre-clínica	Inyección intraventricular-una dosis/ dirigido a repetidos CAG, reduce mHTT (compatible con ratón).	European Research Council
CRISPR/Cas9 (Sin nombre)	Preclínica	Líneas celulares-una dosis/ dirigido a repetidos CAG, reduce HTT.	Harvard University
Células troncales			

Cellavita HD	Fase 2/3	Infusión intravenosa-múltiples dosis/ terapia basada en células mesenquimales.	Azidus Brasil
Terapias con anticuerpos			
ANX005	Fase 3	Infusión intravenosa-múltiples dosis/ previene el inicio de la cascada del complemento por su unión a C1q.	Annexon, Inc
VX15/2503	Fase 2	Infusión intravenosa-múltiples dosis/ inhibe SEMA4D disminuyendo la activación de células gliales.	Vaccinex, Inc
Otras moléculas pequeñas			
Pridopidina	Fase 3	Oral-múltiples dosis/ se une a receptores a dopamina tipo 2 disminuyendo síntomas motores y activa al receptor sigma-1 incrementando BDNF.	Prilenia Therapeutics
Laquinimod	Fase 2	Oral-múltiples dosis/ Incremento de BDNF y disminución de activación de astrocitos y microglía.	Teva Pharmaceutical Industries Ltd
Fenofibrato	Fase 2	Oral-múltiples dosis/ regula a PGC-1 α , involucrado en la disfunción mitocondrial.	University of California, Irvine

SNPs: polimorfismos de nucleótido único; ARNm: ARN mensajero; miARN: micro ARN; RISC: complejo de silenciamiento inducido por ARN; shARN: ARN de horquilla corta; SEMA4D: semaforina 4D; PGC-1 α : coactivador del receptor gamma 1- α activado por el proliferador de peroxisomas. Modificada de Ferguson et al., 2022.

1.6.1 Laquinimod y sus sitios de acción

El laquinimod ($C_{19}H_{17}ClN_2O_3$) es un compuesto sintético desarrollado para el tratamiento de la esclerosis múltiple. En estudios clínicos, se ha administrado por vía oral, en dosis que van de 0.1 a 2.4 mg/día en estudios de fase I, mientras que en estudios clínicos de fase II las dosis usadas van de 0.1 a 0.6 mg/día, en administraciones diarias de 24 hasta 36 semanas; mientras que en estudios clínicos de fase III se ha usado una dosis de 0.6 mg/día hasta por 24 meses (Thöne & Linker, 2016). La seguridad y tolerancia a este medicamento se ha demostrado en todos los estudios clínicos.

Tabla 3. Uso de Laquinimod en diferentes modelos experimentales de enfermedades neurológicas.

Compuesto	Tiempo de administración	Vía de administración	Dosis	Modelo	Referencia
Laquinimod Veh: PBS	35 días	Subcutánea	16, 1.6, 0.16 mg/kg/día	Neuritis autoinmune (ratas Lewis)	(Zou et al., 2002)
Laquinimod Veh: H ₂ O	24 días	Subcutánea	16, 1.6, 0.16 mg/kg/día	Encefalitis autoinmune experimental (ratas Lewis)	(Brunmark et al., 2002)
Laquinimod Veh: H ₂ O	24 días	Subcutánea	16, 1.6, 0.16 mg/kg/día	Encefalitis autoinmune experimental (ratas Lewis)	(Yang, et al., 2004)
Laquinimod Veh: H ₂ O	Inicio a los 30-32 días de edad hasta ser sacrificados	Gavage 200 µL	0.5, 1.5, 5, 25 mg/kg	EH (R6/2)	(Ellrichmann et al., 2017)
Laquinimod Veh: H ₂ O	5 días/semana, comenzando a los 2 meses de edad por 6 meses	Gavage (4mL/kg)	1, 10 mg/kg	EH (YAC128)	(Garcia- Miralles et al., 2016)

El laquinimod actúa sobre el SNC modulando la inflamación mediante la reducción de la activación del factor nuclear- κ B (NF- κ B) en astrocitos, que resulta en la disminución de la secreción de factores pro-inflamatorios. Además, se ha demostrado que promueve la expresión de BDNF en modelos de enfermedades en

el SNC y reduce los niveles de IL-6 en suero (Figura 3) (Caron et al., 2018). Además, tiene gran homología estructural con el KYNA, por lo que se ha propuesto que varios de sus efectos neuroprotectores pueden deberse a la activación de las mismas vías que activa el KYNA. Este fármaco se ha usado en distintos modelos de enfermedades neurológicas disminuyendo los niveles de interleucinas proinflamatorias y aumentando los niveles de BDNF (Ellrichmann et al., 2017; Yang et al., 2004), algunos de ellos se resumen en la tabla 3.

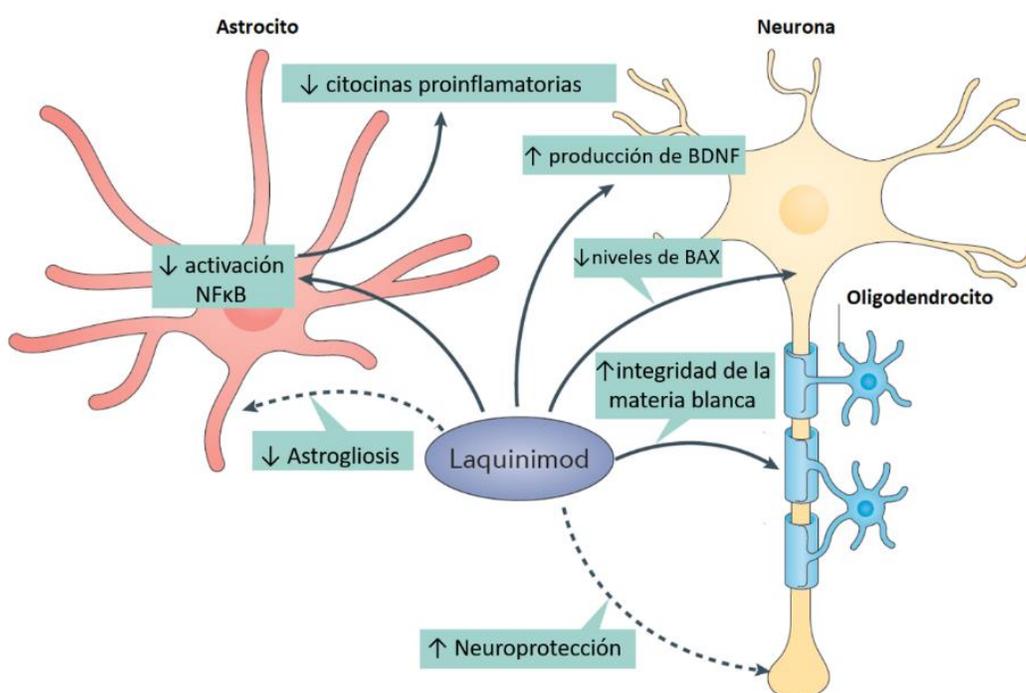


Figura 3. Sitios posibles de acción de laquinimod. Modificado de Caron et al., 2018.

1.6.2 Ácidos grasos y su mecanismo de acción

Los ácidos grasos se dividen (de acuerdo a la estructura de su cadena hidrocarbonada), en ácidos grasos saturados (SFAs), monosaturados (MUFAs) y poliinsaturados (PUFAs) (Kaur et al., 2014).

El ácido oleico es un MUFA contenido en el aceite de oliva (AO). El ácido oleico, provee fluidez a las membranas biológicas. Además otros componentes del AO han

mostrado tener efectos antioxidantes, anti-tumorigénico y anti-microbianos, así como modulación de la transcripción génica (Wani et al., 2018).

El mecanismo por el que actúan los ácidos grasos no está completamente descrito, sin embargo, se propone que, además de los efectos que tiene sobre la fluidez de las membranas biológicas, también puede activar receptores nucleares y algunos factores de transcripción, incluyendo los receptores activados por los proliferadores de peroxisomas (PPARs), el factor nuclear hepático 4 α , el elemento regulador de esteroides 1 y 2 y la proteína de unión al elemento regulador de carbohidratos/ factor X Max-like (ChREBP/MLX) (Morales-Martínez et al., 2020).

En la tabla 4 se muestran otros modelos de enfermedades neurodegenerativas en los que se ha administrado aceite de oliva, así como los parámetros que se han modificado después de su administración.

Tabla 4. Uso de ácidos grasos en diversas patologías

Compuesto	Modelo	Dosis	Resultado	Referencia
Aceite de oliva	Enfermedad de Huntington por 3-NP	10% AC/ 14 días	↓ PL, ↑ GSH ↑ Succinato deshidrogenasa	Tasset et al., 2011
Aceite de oliva virgen	Isquemia	0.25 or 0.5 mL/kg/30 días	↓ PL, ↓ PGE2 ↓ ON , ↑ GSH	González-Correa et al., 2007
Aceite de oliva virgen	Isquemia	0.25, 0.5, o 0.75 mL/kg/30 días	↓ Volumen de infarto, ↓ Permeabilidad de BHE	Mohagheghi et al., 2010
Aceite de oliva extra virgen	Esclerosis lateral amiotrófica, ratón SOD1G93A	Dieta enriquecida con 20% (w/w)/8 semanas	↑ Supervivencia, ↑ coordinación motora ↓ Autofagia ↓ Daño muscular	Oliván et al., 2014
Aceite de oliva	Enfermedad de Huntington por AQ en rata	15% peso/peso 20 días	Niveles normales GABA ↓ PL ↑ PPAR γ	Morales-Martínez et al., 2017

3-NP: ácido 3-nitropropiónico; AC: aporte calórico; PL: peroxidación de lípidos; ON: óxido nítrico; PGE2: prostaglandina E2; ON: óxido nítrico; GSH: glutatión reducido; BHE: barrera hematoencefálica; PPAR γ : receptor gamma activado por proliferadores de peroxisomas.

1.7 Combinación de fármacos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas

El uso de varios fármacos para tratar una enfermedad es una estrategia usada en padecimientos complejos como artritis, diabetes, enfermedades cardiacas, cáncer y en padecimientos neurodegenerativos (He et al., 2016; Jie Wang et al., 2020).

El uso de fármacos con distintos mecanismos de acción puede ser favorable en los siguientes aspectos: 1) incrementando la eficacia del efecto terapéutico, 2) disminuyendo las dosis usadas incrementando o manteniendo su eficacia evitando efectos tóxicos y 3) minimizando o disminuyendo el desarrollo de farmacorresistencia (Chou, 2006). Es por lo que en este estudio nos propusimos probar la combinación de fármacos que actúan por distintos mecanismos que se encuentran afectados en EH. El efecto conjunto de los fármacos propuestos, podría reducir o prevenir la sintomatología que conlleva a la EH.

La terapia combinada en padecimientos neurodegenerativos a incluido el uso de fármacos sintéticos, fármacos biológicos y productos naturales como podemos observar en la tabla 5, además, ha permitido visualizar la necesidad de la búsqueda de terapias que tengan como blanco procesos comunes afectados en diversas enfermedades neurodegenerativas.

Tabla 5. Combinaciones de fármacos usadas para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

Padecimiento	Terapia usada	Efecto	Referencia
Alzheimer (modelo transgénico)	OG (antioxidante para preservar alimentos). FA (antioxidante y antiinflamatorio).	↓ Neuroinflamación, estrés oxidante, sinaptotoxicidad. ↑ Función cognitiva.	Mori et al., 2017
EH (modelo transgénico R6/2)	Minocilina (inhibición de apoptosis y actividad inmune innata y adaptativa). CoQ ₁₀ (necesario para la producción de ATP).	↓ Atrofia neuronal, agregados de htt. ↑ Supervivencia de los ratones, función motora y conductual.	(Stack et al., 2006)
Encefalitis autoinmune experimental (ratas)	Epo (regulador de eritropoyesis). MPred (antiinflamatorio e inmunosupresor).	↑ Protección neuronal y axonal.	Diem et al., 2005

OG: galato de octilo; FA: ácido felúrico; Epo: eritropoyetina; Mped: metilprednisolona; Co Q₁₀: Coenzima Q₁₀

2. Justificación

El diagnóstico genético predictivo para la EH, brinda una oportunidad de administrar un tratamiento previo a la manifestación de los síntomas, por lo que, ante la inexistente cura para la enfermedad, la oportunidad de comprobar el efecto neuroprotector de un pretratamiento permitiría un retraso en el progreso de la misma.

Debido a que existe evidencia de que la inflamación y alteraciones en la mitocondria están involucradas en la patogénesis de la EH, es relevante proponer tratamientos con fármacos o compuestos que actúen en estas dos vías y puedan disminuir o retrasar el daño presente en esta patología.

3. Hipótesis

La modulación de la activación de los astrocitos por el laquinimod más la prevención del daño mitocondrial por una dieta enriquecida con ácidos grasos retrasarán el daño que se presenta en un modelo de la EH.

4. Objetivo general

Demostrar que la terapia combinada de laquinimod más una dieta enriquecida en ácidos grasos modificará la activación de los astrocitos y prevendrá el daño mitocondrial, en un modelo de excitotoxicidad inducido por ácido quinolínico.

5. Objetivos particulares

1. Determinar el E₂₅ y la DE₅₀ de laquinimod y de la dieta rica en ácidos grasos sobre los giros ipsilaterales en el modelo inducido por AQ.
2. Determinar la combinación adecuada de laquinimod y de la dieta rica en ácidos grasos para su administración como pretratamiento en el modelo de AQ.
3. Evaluar el efecto neuroprotector de la administración conjunta de una dieta rica en ácidos grasos y laquinimod en la conducta, niveles de GAD 67, BDNF y en la tinción de Fluoro Jade B en el modelo inducido con AQ.
4. Evaluar el complejo II de la cadena respiratoria y el daño oxidante después de la administración individual y conjunta de una dieta rica en ácidos grasos y laquinimod en el estriado en el modelo de AQ.
5. Evaluar la activación de astrocitos y microglía después de la administración individual y conjunta de una dieta rica en ácidos grasos y laquinimod en el estriado de ratones lesionados con AQ.

6. Materiales y métodos

6.1 Sujetos de experimentación

Se usaron ratones de la cepa C57BL/6 de 25-30 g de peso. Los ratones se mantuvieron en el cuarto de experimentación con un sistema de filtración de aire, temperatura ambiental de 24 ± 2 °C, humedad relativa de $50 \pm 10\%$, ciclos de luz oscuridad de 12:12 hrs y libre acceso a comida y agua. La manipulación de los sujetos de experimentación, así como las evaluaciones conductuales (conducta de giro, campo abierto y rotarod) se realizaron en una campana de flujo laminar.

Los animales que fueron utilizados en este protocolo se manipularon de acuerdo con la reglamentación específica para el uso y cuidado de animales, establecida por el comité del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía MVS y la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, que refiere las especificaciones técnicas para la reproducción, cuidado y uso de animales de laboratorio.

6.2 Diseño experimental para cumplir con el objetivo I

El laquinimod se ha usado en dosis que van desde 0.1 hasta 25 mg/kg de peso en diferentes modelos de enfermedades como neuritis autoinmune, encefalitis autoinmune y enfermedad de Huntington (Pitarokoili et al., 2014; Garcia-Miralles et al., 2016; Ellrichmann et al., 2017; Katsumoto et al., 2018). En el presente estudio se usó laquinimod MedChemExpress (MCE®) Cat# HY-13010 y las dosis administradas se calcularon en mg/kg de peso de los ratones.

Por su parte, los ácidos grasos se han empleado en el tratamiento de distintas enfermedades neurológicas en diferentes dosis, considerando el aporte calórico (AC) en la dieta, de acuerdo al peso corporal del modelo experimental empleado (González-Correa et al., 2007; Mohagheghi et al., 2010; Oliván et al., 2014; Tasset et al., 2011). En el presente estudio se utilizó aceite de oliva Filippo Berio® como fuente de enriquecimiento de la dieta de los ratones empleando como dosis el % de AC que el AO proporcionó a la dieta.

6.2.1 Diseño de la curva dosis de laquinimod y respuesta a los giros ipsilaterales en el modelo inducido por AQ.

Se realizó una curva dosis respuesta del efecto neuroprotector del laquinimod, tomando en cuenta cuatro dosis (0.1, 0.2, 0.6 y 1.6 mg/kg), empleando DMSO al 10 % como vehículo. El laquinimod a la dosis correspondiente, se administró durante 3 días de forma subcutánea (sc); en el último día de tratamiento éste se administró 2 hrs antes de la lesión con AQ. Fueron evaluados los giros ipsilaterales de cada ratón 3 días después de la lesión a la dosis respectiva de laquinimod.

La curva dosis-respuesta se construyó empleando las dosis en unidades logarítmicas y se realizó el cálculo del efecto 25 (E_{25}) y de la dosis efectiva 50 (DE_{50}).

6.2.2 Diseño de la curva dosis de % de aporte calórico (% AC) en la dieta y respuesta a los giros ipsilaterales en el modelo inducido por AQ.

Se realizó una curva dosis respuesta del efecto neuroprotector de la dieta enriquecida con ácidos grasos probando diferentes dosis (20, 40 y 80 % del AC). Los ratones no tratados recibieron un alimento regular (PicoLab® 5058. Mouse diet 20), mientras que a los ratones tratados se les formuló una dieta especial, en la que se realizó una variación en el AC, sustituida por los ácidos grasos contenidos en el AO (Filippo Berio®) usado, como se muestra en la tabla 6. Ambos grupos de ratones recibieron contenido calórico similar en la dieta de alimento regular o dieta especial preparada, y fueron alimentados durante 10 días. En el último día de tratamiento, los ratones fueron lesionados intraestriatalmente con AQ y tres días después, se cuantificó el número de giros ipsilaterales. De las gráficas obtenidas se determinó el E_{25} y la DE_{50} .

Tabla 6. Formulación de dietas conteniendo aceite de oliva* en diferentes porcentajes que fueron empleados para realizar la curva dosis-respuesta.

Ingrediente	20%		40%		80%	
	g	kcal	g	kcal	g	kcal
Caseinato de sodio*	25.9	88	25.9	88	25.9	88
Aceite de oliva%	10	90	20	180	40	360
Almidón#	27	108	18	72	0	0
Sacarosa#	20.3	81	13.5	54	0	0
Glucosa#	20.3	81	13.5	54	0	0
Vitaminas	4	0	4	0	4	0
Minerales	2	0	2	0	2	0
Celulosa	0	0	3.1	0	28.1	0
Total	109.5		100		100	
Contenido energético/100g		448		448		448

Aceite de oliva: Filippo Berio; * proteínas; % grasas; # carbohidratos. Contenido energético de la dieta control: 460 kcal/100g.

6.3 Diseño experimental para cumplir con el objetivo II

Se determinó la combinación de dosis adecuada de laquinimod y la dieta rica en ácidos grasos para usarla como pretratamiento en el modelo de lesión con AQ. Para ello se utilizó el software CompuSyn donde se obtuvo el índice de combinación (CI) y el índice de reducción de dosis (DRI) que se interpretaron de acuerdo con la información de la tabla 7.

Tabla 7. Descripción e interpretación del CI y DRI.

Rango de CI	Interpretación	DRI	Interpretación
<0.10	Sinergismo muy fuerte	=1	No reducción de dosis
0.10-0.30	Sinergismo fuerte	>1	Reducción favorable
0.30-0.70	Sinergismo	<1	Reducción no favorable
0.70-0.85	Sinergismo moderado		
0.85-0.90	Sinergismo leve		
0.90-1.10	Cercano a aditivo		

Modificado de Chou, 2006 y Zhang et al., 2016.

Para cumplir con este objetivo se realizaron 3 grupos: 1) con la combinación del E₂₅ de laquinimod y % de AC por los ácidos grasos, 2) se realizó con la combinación de las DE₅₀ de ambos tratamientos y 3) administrando el vehículo de ambos tratamientos, DMSO al 10% (solvente del laquinimod) y alimento regular. En los grupos 1 y 2, ambos tratamientos se administraron conjuntamente, el laquinimod fue administrado durante 3 días y la dieta rica en ácidos grasos durante 10 días (haciéndolos coincidir combinados a partir del día 7 de administración de la dieta), se usaron las dosis determinadas en el objetivo anterior siguiendo el esquema que se muestra en la tabla 8, el grupo 3 fue administrado con los vehículos de los tratamientos bajo el mismo esquema que los grupos 1 y 2.

Además, con el propósito de determinar que el tratamiento no altera parámetros bioquímicos, se realizó la determinación de glucosa, colesterol y triglicéridos en sangre en los 3 grupos experimentales al inicio y al final del tratamiento.

Tabla 8. Esquema de administración de tratamientos.

Fármaco	1) E ₂₅	2) DE ₅₀	3) Vehículos	Tiempo de tratamiento
Laquinimod	0.14 mg/kg de peso	0.28 mg/kg de peso	DMSO 10%	3 días
Dieta rica en ácidos grasos	24.9% de AC	38% de AC	Alimento regular	10 días

DMSO: dimetilsulfoxido

6.4 Diseño experimental para cumplir con el objetivo III

Una vez elegida la combinación de dosis, se realizaron 4 grupos. En los grupos 1 y 3 se llevó a cabo la administración de la dieta enriquecida con ácidos grasos y laquinimod de acuerdo con el objetivo anterior (II); y en los grupos 2 y 4 se realizó la administración de los vehículos para cada tratamiento. Después de concluir el esquema de administración de los tratamientos y sus vehículos, los grupos 1 y 2 fueron lesionados con AQ y los grupos 3 y 4 con solución salina (SS). Al tercer día posterior a la lesión con AQ o SS, se midió la conducta de giro y al cuarto día se realizaron las pruebas conductuales (rotarod y campo abierto), posterior a las

pruebas, se realizó el sacrificio de los ratones, que fueron divididos en dos grupos: uno para perfusión y la obtención de cortes cerebrales para inmunotinción (Fluoro Jade B) y el segundo grupo, en el que se realizará disección del estriado para la extracción de proteínas y la identificación de GAD67 y BDNF por Western blot.

6.5 Diseño experimental para cumplir con el objetivo IV

La actividad del complejo II de la cadena mitocondrial se evaluó por medio del kit MitoCheck® Complex II Activity Assay Kit de Cayman CHEMICAL.

Se formaron 4 grupos como se describió en el objetivo anterior y 4 hrs después de la lesión con AQ o SS, se realizó la extracción de membranas enriquecidas con complejos mitocondriales del estriado de los ratones en tratamiento.

En los 4 grupos independientes se realizó la disección del estriado de los ratones en tratamiento para la evaluación del daño oxidante mediante las técnicas fluorométricas de peroxidación de lípidos (PL) y formación de EROs dos hrs después de la lesión con AQ o SS.

6.6 Diseño experimental para cumplir con el objetivo V

La activación de astrocitos se determinó por inmunofluorescencia por el marcaje de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y por Western blot se determinó la molécula adaptadora de unión a calcio ionizado (Iba1) como marcador de microglía.

6.7 Modelo de la enfermedad de Huntington

Los ratones se mantuvieron bajo anestesia profunda durante todo el procedimiento mediante la inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico a una dosis de 40 mg/kg de peso. La inyección de 1 μ L de AQ Sigma Chemical Co. Cat# P63204 (30 nmol/ μ L o 1 μ L SS se realizó con ayuda de un equipo estereotáxico soelting Cat# 68037 en el cuerpo estriado del hemisferio derecho en las siguientes coordenadas: 0.6 mm anterior, -2.0 mm lateral a bregma y -2.7 mm ventral a la duramadre (Paxinos & Franklin, 2004).

6.7.1 Evaluación de conducta de giro

La conducta de giro se evaluó 3 días posteriores a la inyección de AQ en el estriado. Para poder evaluar esta conducta se administró de forma sc R-(-)-apomorfina (1

mg/kg, disuelto en ácido ascórbico al 1%) Sigma Chemical Co. Cat# PHR2621 y se colocaron a los ratones en cajas de policarbonato individuales (25x40x20 cm) deodorizadas con etanol y una cama delgada de aserrín y se contaron los giros ipsilaterales que realizó el ratón durante 60 minutos.

6.8 Pruebas conductuales

Las pruebas conductuales se realizaron al cuarto día posterior a la lesión con AQ o SS de la menos estresante a la más estresante debido a la influencia que puede tener el orden de las pruebas en el comportamiento de los animales (Saré et al., 2021). Primero se realizó la prueba de campo abierto, y posteriormente la prueba de rotarod, con una hr de espera entre cada prueba.

6.8.1 Campo abierto

La prueba de campo abierto se usa comúnmente para medir la conducta exploratoria y la actividad general tanto en ratones como en ratas. Esta se realiza en un área cerrada para evitar que los sujetos de experimentación escapen y puede tener una forma cuadrada, rectangular o circular. En esta prueba pueden determinarse una serie de parámetros que van desde el número de movimientos hasta la defecación del sujeto de experimentación (Gould et al., 2009).

En el presente estudio la prueba fue utilizada para evaluar la actividad motora espontánea. Esta fue registrada por medio de un sistema automatizado (Electronic Motility Meter 40Fc; Motron Products, Stockholm, Sweden), por lo que, los animales fueron colocados en una caja de acrílico transparente de 21x33x29 cm y se les permitió explorarla por 5 min, la caja fue deodorizada con etanol al 70% entre cada ratón. El número de movimientos horizontales y verticales fue cuantificado y usado para el análisis de la conducta motora espontánea de los ratones.

6.8.2 Rotarod

La prueba de rotarod evalúa la coordinación motora y el equilibrio del sujeto de experimentación, esta prueba es aplicada en ratas y ratones con lesiones inducidas en el SNC así como en sujetos de experimentación que reciben algún compuesto terapéutico experimental (Precious et al., 2018).

Esta prueba consiste en un rodillo giratorio en el que son colocados los ratones, y se registra el tiempo y la velocidad a la que caen del rodillo. Para llevar a cabo esta prueba se entrena a los ratones 3 días previos al día de la prueba. En las sesiones de entrenamiento, los ratones son colocados a 3 diferentes velocidades, 10, 20 y 30 rpm. El día de la prueba los ratones son colocados el rodillo giratorio en una rampa de velocidades de 2 a 40 rpm en 300 s (5 min).

6.9 Determinación de parámetros bioquímicos

La determinación de triglicéridos, glucosa y colesterol en sangre se realizó al inicio y al final del tratamiento de los esquemas de tratamiento de los objetivos II y III mediante el sistema Accutrend Plus (Roche Diagnostics) y el uso de tiras reactivas para la detección de cada parámetro, las determinaciones se realizaron de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

6.10 Extracción de proteínas y Western blot

La extracción de proteínas se realizó usando solución amortiguadora de lisis (Tris 1M, NaCl, NP 40 0.5%, Tritón 0.5%, EDTA 0.5M, NaF 100 Mm, Na₃VO₄ 100 Mm, PMSF 100 Mm) y un coctel de inhibidor de proteasas (Complete, Roche Diagnostics). El contenido de proteínas se determinó usando el método del ácido bicinconínico (Pierce, Rockford, IL). Se obtuvieron alícuotas de 50 µg de proteína que fueron separados en geles SDS-PAGE al 10 o 15%, dependiendo de la proteína a analizar, posteriormente se realizó la transferencia a membranas de polivinilideno (PVDF) (BioRad, Hercules, CA). Las membranas fueron bloqueadas durante una hr a temperatura ambiente con caseína/TBST (0.05% Tween-20, TBS) al 5% e incubadas con el anticuerpo primario correspondiente (β -actin 1:50000, Sigma-Aldrich Cat# A3854; BDNF 1:800, Abcam Cat# ab108319, GAD67 1:5000; Millipore Cat# MAB5406 e Iba1 1:500, Abcam Cat# ab153696) diluido en caseína/TBST al 5% toda una noche a 4°C. Las membranas incubadas con anticuerpos primarios contra BDNF, GAD67 e Iba1 fueron incubadas, posteriormente, con un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa anti-conejo (1:2000, Invitrogen Cat# 656120) IgG diluido en la misma solución del anticuerpo primario por una hr a temperatura ambiente. La detección de la quimioluminiscencia se realizó usando el sustrato ECL

(Perkin Elmer). Las imágenes de la luminiscencia fueron adquiridas con el equipo fusión solo-7s edge (Vilber Lourmat) y analizadas por densitometría utilizando el software ImageJ (NIH).

6.11 Tinción de Fluoro Jade B

Los animales fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital (80 mg/kg i.p.) y perfundidos intracardiamente con PBS 1X seguida de paraformaldehído (PFH)/PBS al 4%. Los cerebros fueron disecados y post-fijados en PFH/PBS al 4% a 4°C por 24 hrs y, posteriormente, fueron criopreservados en diferentes concentraciones de sacarosa/PBS: 10, 20 y 30%, durante 24 hrs por cada concentración a 4°C. Después, se realizaron cortes coronales de 30 µm en un vibratomo (Leica VT1000 S) que fueron colectados en PFH/PBS al 2% y almacenados a 4°C hasta su uso. Se realizaron cortes del cerebro de 3 animales por cada condición y se analizaron 3 cortes provenientes por cada ratón para realizar el gráfico correspondiente.

Los tejidos fueron montados en portaobjetos gelatinizados y permanecieron por 24 hrs a 4°C, después, se secaron a 50°C por 10 min. Posteriormente, los tejidos se sumergieron brevemente en una solución que contenía NaOH al 1% y etanol al 80%, luego en una solución de etanol al 70% por 2 min seguido de 2 min en agua destilada, después, se colocaron en una solución de permanganato de potasio al 0.06% por 10 min y se lavaron dos veces en agua destilada por 2 min; luego fueron transferidos a la solución de Fluoro Jade B (Millipore, Cat# AG310) al 0.0004% y 0.1% de ácido acético durante 20 min en oscuridad y rápidamente se sumergieron en agua destilada por 1 min. Las laminillas se secaron por 5-10 min a 50°C en la oscuridad, luego se realizó el aclaramiento en xilol por 5 s seguido del montaje con medio Entellan (Sigma-Aldrich, Cat# 107961).

Las imágenes fueron obtenidas usando un microscopio de fluorescencia (Olympus Bx51) con un objetivo 20x usando el filtro FITC 488nm. Todos los cortes fueron capturados usando el mismo tiempo de exposición y amplificación y el número de neuronas Fluoro Jade B positivas fueron contabilizadas con el software ImageJ.

6.12 Inmunofluorescencia

Secciones de tejidos obtenidos anteriormente fueron usados para la detección de GFAP por inmunofluorescencia. Los cortes fueron incubados en flotación libre en PBS/TritonX-100 al 0.2% por 30 min y bloqueados durante 1 hr en PBS/BSA al 1%. Después, los tejidos fueron incubados toda la noche con el anticuerpo primario anti-proteína ácida fibrilar glial (GFAP 1:1000, Dako Cat# Z0334) diluido en PBS/BSA 0.1%/Triton X-100 0.02% a 4°C. Posteriormente los tejidos se lavaron en PBS/Triton X-100 0.02% y fueron incubados una hr a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario FITC anti-conejo IgG (1:300, Jackson ImmunoResearch Cat# 111-095-003) diluido en la misma solución del anticuerpo primario. Los núcleos fueron marcados usando 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; Vector Laboratories).

Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio confocal (Leica TCS-SPE), usando el objetivo 63x con aceite de inmersión. Las imágenes con doble marcaje fueron obtenidas con un láser de argón para la detección de FITC con un rango de excitación/emisión de 490nm/520nm y un láser ultravioleta (UV) para ver DAPI con un rango de excitación/emisión de 358 nm/460 nm. La identificación del estriado se realizó usando al cuerpo calloso y a los ventrículos como referencias. La presencia de gliosis reactiva fue evaluada por el conteo de células GFAP positivas en el estriado. También se realizó el conteo del número de núcleos por campo para determinar el porcentaje de astrocitos GFAP positivos con respecto al total de núcleos por campo. Las imágenes fueron analizadas con los softwares Leica LAS AF lite e ImageJ.

6.13 Evaluación del complejo II de la cadena respiratoria

6.13.1 Aislamiento de membranas enriquecidas con complejos mitocondriales

Cuatro horas posteriores a la lesión estereotáxica con AQ o SS, se realizó el sacrificio de los ratones por decapitación y la disección del estriado lesionado. Inmediatamente, el tejido disecado se homogenizó en medio I (manitol 220 mM, sacarosa 70 mM, MOPs 2 mM, EGTA 1 mM) con ayuda de un homogeneizador vidrio-vidrio. Del homogenado obtenido se aislaron por centrifugación diferencial las membranas enriquecidas con complejos mitocondriales de acuerdo al siguiente

protocolo (Hinkle, 2005) (todo el proceso fue realizado a 4°C): el homogenado se centrifugó en un tubo de polipropileno a 2500 rpm por 10 min, posteriormente el sobrenadante se colocó en un tubo nuevo y se desechó el sedimento; el sobrenadante se centrifugó a 7500 rpm por 10 minutos, el sobrenadante resultante se desechó y al sedimento se le agregaron 200 µL de medio I para resuspenderlo. Una vez resuspendido, se agregaron 2 mL de medio II (manitol 220 mM, sacarosa 70 mM, MOPS 2 mM) y 1.25 mg de albúmina. La mezcla anterior se centrifugó a 7500 rpm por 10 min y se desechó el sobrenadante, el sedimento se resuspendió en 250 µL de medio I y se agregaron 2 mL de medio II, la mezcla se centrifugó a 9000 rpm por 10 min. Finalmente, el sobrenadante fue desechado y las membranas enriquecidas con complejos mitocondriales fueron resuspendidas en 250 µL de medio II.

Una vez obtenidas las membranas enriquecidas con complejos mitocondriales, se cuantificaron las proteínas totales con el método mencionado en el apartado 6.10 e inmediatamente se midió la actividad del complejo II de la cadena mitocondrial.

6.13.2 Actividad del complejo II de la cadena mitocondrial

La actividad del complejo II de la cadena mitocondrial fue determinada con el uso del MitoCheck® Complex II Activity Assay Kit, un método enzimático colorimétrico (Cayman Cat# 700940), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

6.14 Evaluación del daño oxidante

El daño oxidante fue evaluado mediante la determinación de la PL y la producción de EROs. Para la determinación de los parámetros anteriores se realizó el sacrificio de los ratones por decapitación 2 hrs posteriores a la lesión con AQ o SS, se extrajo el cerebro y se realizó la disección del estriado en el hemisferio lesionado. El tejido obtenido fue homogeneizado en SS utilizando un sistema teflón-vidrio y posteriormente se realizó la cuantificación de la peroxidación de lípidos y la formación de EROs, así como la determinación de las proteínas totales como se menciona en el apartado 6.10.

6.14.1 Cuantificación de la peroxidación de lípidos (PL)

En un tubo de vidrio se colocó 1 mL del tejido homogeneizado y 4 mL de una mezcla de cloroformo-metanol (2:1, v:v) y se mezcló con ayuda del vórtex. La mezcla se incubó a 4°C durante 30 min en oscuridad permitiendo la separación de dos fases (fase acuosa= fase superior y fase orgánica= fase inferior), posteriormente se aspiró la fase acuosa con la ayuda de una bomba de vacío. Finalmente, se colocaron 2 mL de la fase orgánica y 200 µL de metanol en una celda de cuarzo y se realizó la lectura en un espectrofotómetro de fluorescencia una longitud de onda de excitación/emisión de 370 nm/430 nm. Los resultados se reportaron como unidades relativas de fluorescencia por mg de proteína.

6.14.2 Cuantificación de la formación de EROs

Para la cuantificación de EROs se usaron 5 µL del homogenado usado para la cuantificación de la PL, y se mezclaron con 145 µL de una solución amortiguadora (TRIS-HEPES 18:1) (TRIS pH 7.4: solución HEPES con NaCl 120 mM, KCl 2.5 mM, NaH₂PO₄ 1.2 mM, MgCl₂ 0.1 mM, NaHCO₃ 5 mM, glucosa 6.0 mM, CaCl₂ 1.0 mM, HEPES 10.0 mM) y 50 µL de solución de diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCF-DA 50 µM) en una microplaca de 96 pozos. La fluorescencia de cada muestra fue determinada en el lector de placas FLx800 (Biotek Instruments, Inc.), en el que se mantuvo la microplaca a 37°C por una hora en agitación constante, usando longitudes de onda de excitación/emisión de 488 nm/525 nm. Los valores obtenidos fueron calculados a partir de la interpolación en una curva de calibración de diclorofluoresceína de 2 a 50 mg. Los resultados se expresaron como nmol de DCF/mg de proteína/min.

6.15 Análisis estadístico

El análisis de datos para la obtención de la DE₂₅ y la DE₅₀ para ambos fármacos, así como el cálculo de la CI y DRI para cada combinación se realizó con el programa CompuSyn, (Combosyn, Inc.).

La normalidad del resto de los datos fue evaluada por la prueba de Shapiro-Wilk y la significancia estadística fue determinada mediante las siguientes pruebas estadísticas: Kruskal Wallis seguido de la prueba de Dunn para los datos del

consumo de alimento; Kruskal Wallis seguido de Mann Whitney para los giros ipsilaterales del tratamiento seleccionado (combinación de DE₅₀); ANOVA de una vía seguida de Tukey para los datos obtenidos de: giros ipsilaterales de las combinaciones de dosis, la tinción de Fluoro Jade B, campo abierto, rotarod, PL, EROs, conteo de células positivas a GFAP y determinación de la expresión de GAD67 y BDNF; prueba de t para muestras no pareadas para la determinación de la actividad del complejo II de la cadena mitocondrial y ANOVA de dos vías seguida de Sidak para los datos del peso de los ratones y para los datos de las pruebas bioquímicas: glucosa, colesterol y triglicéridos en sangre. Los resultados se expresan con la media \pm el error estándar o con la mediana, de acuerdo con el caso, $P < 0.05$ fue considerada como estadísticamente significativa. Todos los análisis se realizaron con el programa estadístico GraphPad Prism v.8.

7. Resultados

7.1 Determinación de curvas dosis-respuesta

El número giros ipsilaterales fue evaluado para la construcción de las curvas dosis-respuesta para cada tratamiento. En las figuras 4 y 5 se muestra la curva dosis-respuesta del laquinimod y de la dieta rica en ácidos grasos respectivamente, en ambos casos se realizó el pretratamiento con laquinimod (por 3 días) a diferentes dosis (0.1, 0.2, 0.6 y 1.6 mg/kg de peso) o con la dieta rica en ácidos grasos (por 10 días) en distintos % de AC (20, 40 y 80) por parte de los ácidos grasos contenidos en el AO; el último día de tratamiento se realizó la lesión con AQ y tres días posteriores se evaluaron los giros ipsilaterales inducidos por la administración de apomorfina.

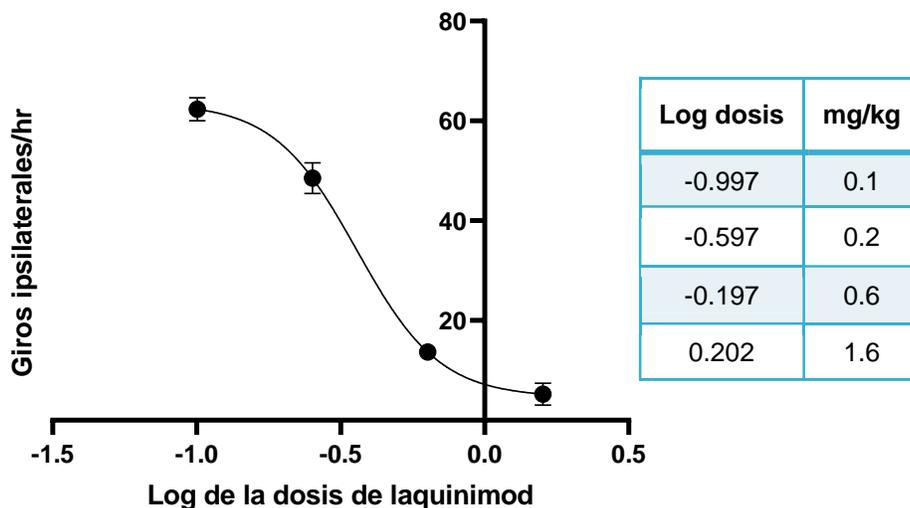


Figura 4. Curva dosis-respuesta de laquinimod donde se evaluó el número de giros ipsilaterales inducidos por apomorfina, tres días después del pretratamiento con laquinimod. Los datos se muestran con su promedio \pm SEM. DE_{50} = 0.28 mg/kg. E_{25} = 0.14 mg/kg. n = 3-4 por grupo.

En ambos casos fue posible observar la disminución de los giros ipsilaterales con el aumento de la dosis y empleando el programa Compusyn determinamos el E_{25} y DE_{50} . Para el laquinimod fueron: E_{25} = 0.14 mg/kg y DE_{50} = 0.28 mg/kg; y para el % AC por los ácidos grasos del AO fueron: E_{25} = 24.9% AC y DE_{50} = 38% AC.

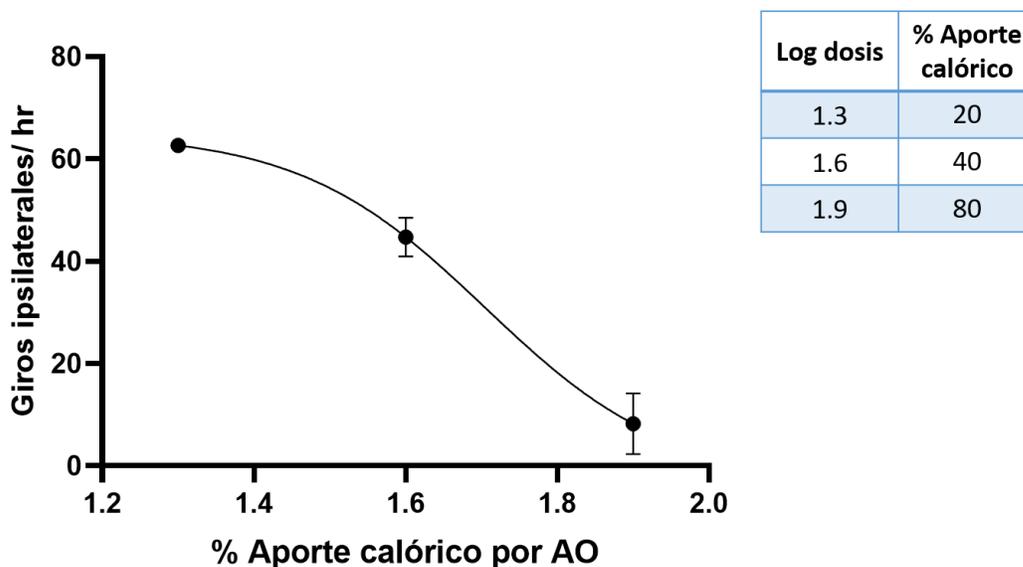


Figura 5. Curva dosis-respuesta del % AC por el aceite de oliva en la dieta donde fue evaluado el número de giros ipsilaterales inducidos por apomorfina (1 mg/kg s.c.) diez días después del pretratamiento con la dieta enriquecida con ácidos grasos. Los datos se muestran con su promedio \pm SEM. DE50= 38% AC. E25= 24.9% AC. n = 3-4 por grupo. % AC: porcentaje de aporte calórico; AO: aceite de oliva.

La determinación de parámetros como el consumo de alimento y el peso de los ratones se realizó al inicio y al final de la dieta para corroborar que la variación en la dieta y la consistencia de los pellets hechos en el laboratorio no indujeran cambios en los mismos. El análisis de estos parámetros mostró que no provocan ni el aumento ni la disminución en la ingesta de alimento de los ratones o en su peso.

En la figura 6 podemos observar que la dieta no tuvo ninguna influencia en el consumo de alimento de los ratones. Mostrando una media de 4.3 g con la dieta control y una mediana de 4.4, 4.5 y 4.3 g con las dietas de 20, 40 y 80% AC, respectivamente.

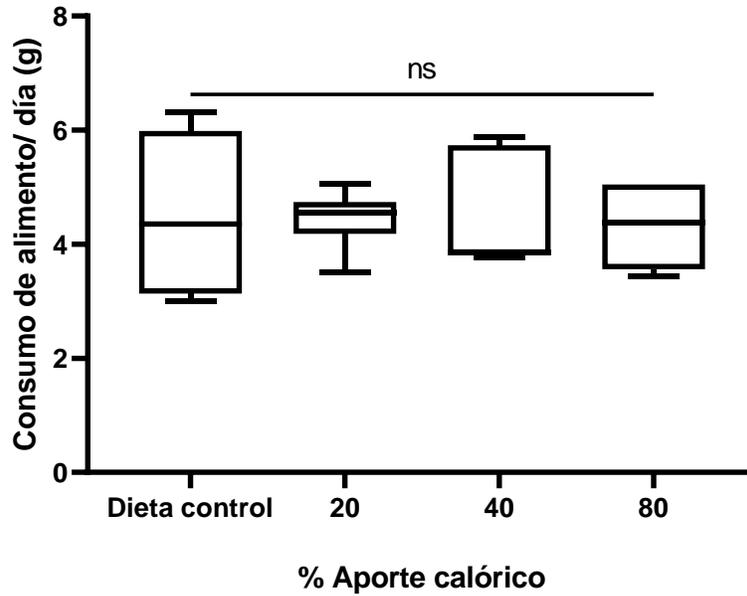


Figura 6. Consumo de alimento de los ratones bajo tratamiento con los diferentes % AC en la dieta. Se muestra la mediana de los datos, prueba de Kruskal-Wallis seguido de la prueba de Dunn; n=5-6 por grupo; ns: no significativo.

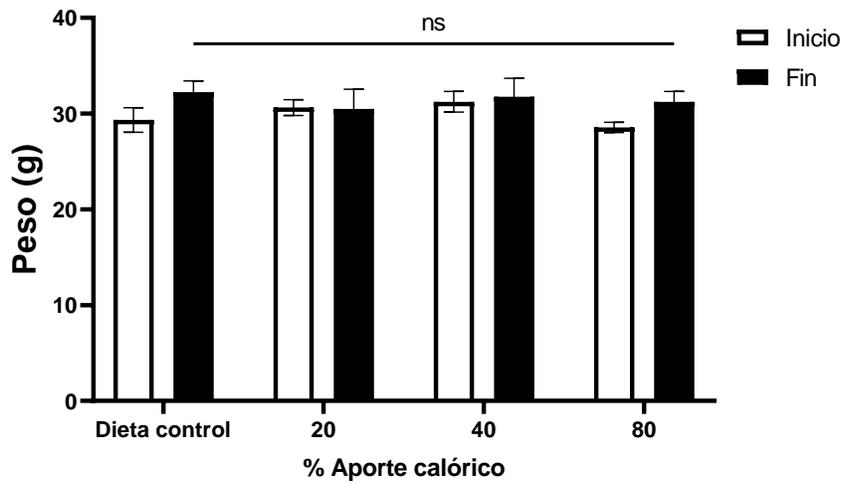


Figura 7. Evaluación del peso de los ratones bajo tratamiento con los diferentes % AC. Los datos se muestran con su promedio \pm SEM; ANOVA de dos vías, seguido de Sidak; n=3 por grupo; ns: no significativo.

El peso de los ratones tampoco tuvo cambios con la dieta (Figura 7). Al final del tratamiento, el promedio del peso de los ratones alimentados con dieta control fue de 32.2 ± 1.2 g y en los ratones con las dietas de 20, 40 y 80 % AC fue de 30.5 ± 2 , 31.8 ± 1.9 y 31.2 ± 1 , respectivamente.

7.2 Determinación de la combinación de dosis adecuada de laquinimod y la dieta rica en ácidos grasos

La determinación de la combinación de dosis adecuada se realizó empleando el software Compusyn. Las combinaciones que fueron evaluadas fueron el E₂₅ del laquinimod y de la dieta rica en ácidos grasos, así como sus DE₅₀.

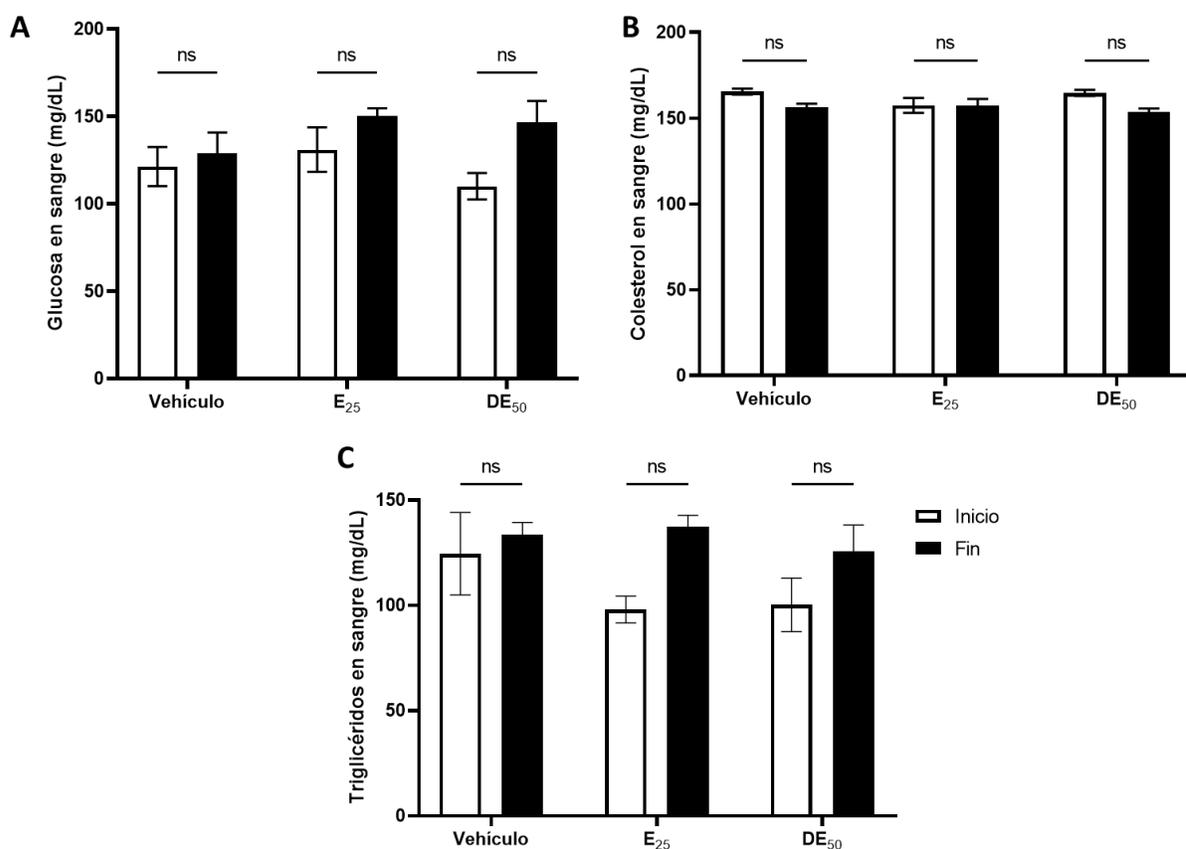


Figura 8. Determinación de glucosa (A), colesterol (B) y triglicéridos (C) al inicio y al final del tratamiento con dieta control y con las diferentes combinaciones de tratamiento. Los datos se muestran con su promedio \pm SEM; ANOVA de dos vías, seguido de Sidak; n=4 por grupo; ns: no significativo.

En la figura 8 se muestran los parámetros bioquímicos evaluados para cada grupo, en donde podemos observar que ninguna de las combinaciones tuvo influencia sobre los valores de glucosa, colesterol y triglicéridos al finalizar el tratamiento. El promedio de los valores de glucosa en sangre al final del tratamiento fue de 129 ± 11.7 mg/dL para los ratones tratados con los vehículos y para las combinaciones del E_{25} y las DE_{50} fue de 150.2 ± 4.5 y 146.5 ± 12.4 mg/dL, respectivamente. En cuanto a los valores de colesterol total al finalizar el tratamiento, el promedio de estos fue de 156.2 ± 2.2 mg/dL para el grupo que recibió los vehículos y 157.5 ± 3.7 y 153.7 ± 1.9 mg/dL para los grupos que recibieron las dosis del E_{25} y DE_{50} , respectivamente. Los valores de triglicéridos en sangre fueron en promedio de 133.5 ± 5.9 mg/dL para los ratones que recibieron los vehículos de las combinaciones y de 137.5 ± 5.2 y 125.7 ± 12.4 mg/dL para los grupos que recibieron las combinaciones de las dosis del E_{25} y DE_{50} , respectivamente.

El número de giros ipsilaterales, evaluados 3 días posteriores a la lesión con AQ también fue cuantificado en los grupos descritos anteriormente (Figura 9), donde podemos observar diferencias estadísticamente significativas entre el número de giros ipsilaterales que presentaron los ratones administrados con los vehículos de los tratamientos y ambas combinaciones. Los ratones administrados con los vehículos tuvieron un promedio de 87.2 ± 12.6 giros ipsilaterales por hr, mientras que el grupo con la combinación de dosis del E_{25} tuvo un promedio de 34 ± 4.6 giros ipsilaterales por hr y el grupo con la combinación de DE_{50} presentó un promedio de 4.2 ± 1.6 giros ipsilaterales por hr. La diferencia en los giros ipsilaterales podemos observarla en el efecto de cada combinación (tabla 8). La combinación de las dosis del E_{25} tuvo un efecto de 0.61 (61% en la reducción de giros ipsilaterales) y la combinación de DE_{50} de 0.95 (95% en la reducción de giros ipsilaterales).

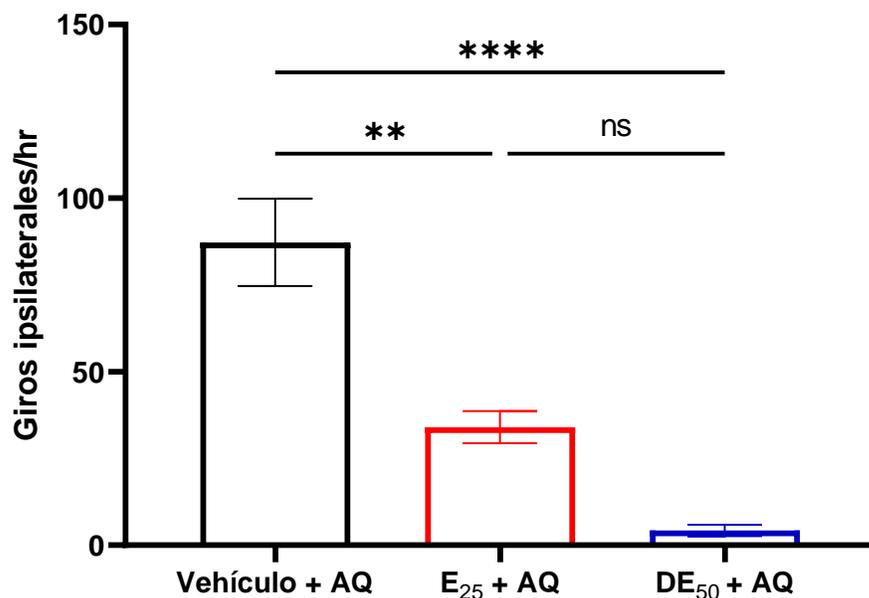


Figura 9. Efecto de las combinaciones de las E₂₅ y DE₅₀ de laquinimod y la dieta rica en ácidos grasos en los giros ipsilaterales inducidos en los ratones lesionados con AQ. Se muestra el promedio \pm SEM; ANOVA de una vía, seguido de Tukey; n=4 por grupo; **p=0.0024; ****p<0.0001.

Además, en la tabla 9 es posible observar el CI de cada combinación. La CI de la combinación de dosis del E₂₅ fue de 0.91 lo que significa, de acuerdo con la información de la tabla 6, que tenemos un efecto cercano al aditivo al realizar la combinación de los tratamientos, en cambio, el CI de la combinación de DE₅₀ fue de 0.46 indicando un efecto sinérgico al combinar nuestros tratamientos a esas dosis. Estos resultados se muestran también gráficamente en la figura 10, donde se presenta el isoblograma de las combinaciones de fármacos.

Tabla 9. Índice de combinación de dosis, determinado con el programa Compusyn.

Combinación	Dosis laquinimod (mg/kg)	Dosis % AC	Efecto	CI
E ₂₅	0.14	24.9	0.61	0.91
DE ₅₀	0-28	38.4	0.95	0.46

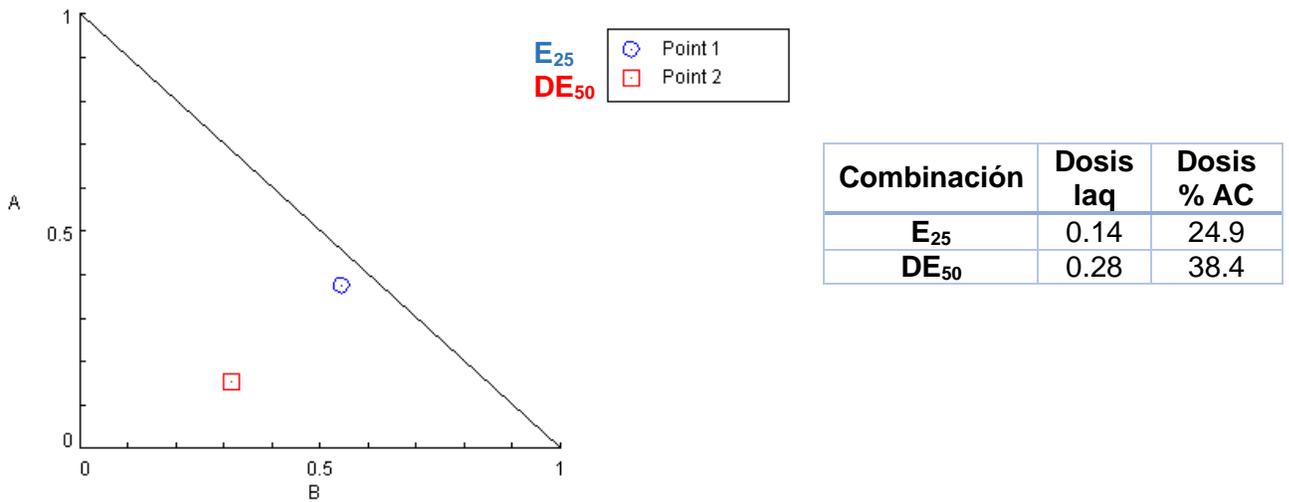


Figura 10. Isoblograma de las combinaciones de tratamientos. El círculo azul representa la combinación de E₂₅ y el cuadrado rojo representa la combinación de DE₅₀.

Respecto al DRI podemos notar en la tabla 10 (4 primeras columnas) los datos referentes a las dosis usadas en cada combinación y el efecto obtenido; en las siguientes columnas se muestra la dosis individual necesaria para obtener el efecto logrado con cada combinación: 0.37 y 1.83 mg/kg de laquinimod y 45.72 y 121.53% AC para obtener el efecto de la combinación dosis del E₂₅ y DE₅₀. Además, podemos observar que el DRI del laquinimod y del % AC fue mayor usando las DE₅₀, (6.53 y 3.16, respectivamente) indicando el número de veces que se disminuye la dosis de cada fármaco usando la combinación.

Tabla 10. Índice de reducción de dosis determinado con el programa Compusyn.

Combinación	Dosis laq	Dosis % AC	Efecto	Dosis laq (individual)	Dosis % AC (individual)	DRI Laq	DRI % AC
E ₂₅	0.14	24.9	0.61	0.37	45.72	2.67	1.84
DE ₅₀	0.28	38.4	0.95	1.83	121.53	6.53	3.16

Tomando en cuenta los parámetros de CI y DRI se eligió la combinación de las dosis DE₅₀, que fueron usada para cumplir los siguientes objetivos. Para simplificar la forma de nombrar a las dosis combinadas de Laquinimod y % AC de los ácidos grasos, a dicha combinación se le nombrará “el Tratamiento” y se nombrará como “Vehículos” a la combinación de DMSO al 10% y alimento regular, que son los vehículos para el laquinimod y la dieta enriquecida con ácidos grasos respectivamente, desde esta sección del escrito en adelante.

7.3 Efecto neuroprotector de la administración del tratamiento en el modelo de AQ

Al igual que en el objetivo anterior, se realizó la determinación de parámetros bioquímicos como la glucosa, el colesterol y los triglicéridos para asegurar que el tratamiento no tuviera influencia sobre éstos. En la figura 11 podemos observar las gráficas con las determinaciones de los parámetros bioquímicos ya mencionados al inicio y al final del tratamiento en los que no existen diferencias estadísticamente significativas al inicio y al final del tratamiento. Al final del tratamiento los valores de glucosa del grupo administrado con vehículos fue en promedio 161.7 ± 9.8 mg/dL, mientras que el promedio de los tratamientos fue de 171.4 ± 8.7 mg/dL (Figura 11A). El promedio de los valores de colesterol en el grupo administrado con vehículos fue de 153.2 ± 1.1 mg/dL y el del grupo con tratamiento 155.7 ± 0.6 mg/dL (Figura 11B). En cuanto a los valores de triglicéridos al final de tratamiento, el grupo administrado con vehículos tuvo un promedio de 149.7 ± 9.9 mg/dL, mientras que el grupo con tratamiento presentó un promedio de 151.2 ± 5.6 mg/dL (Figura 11C).

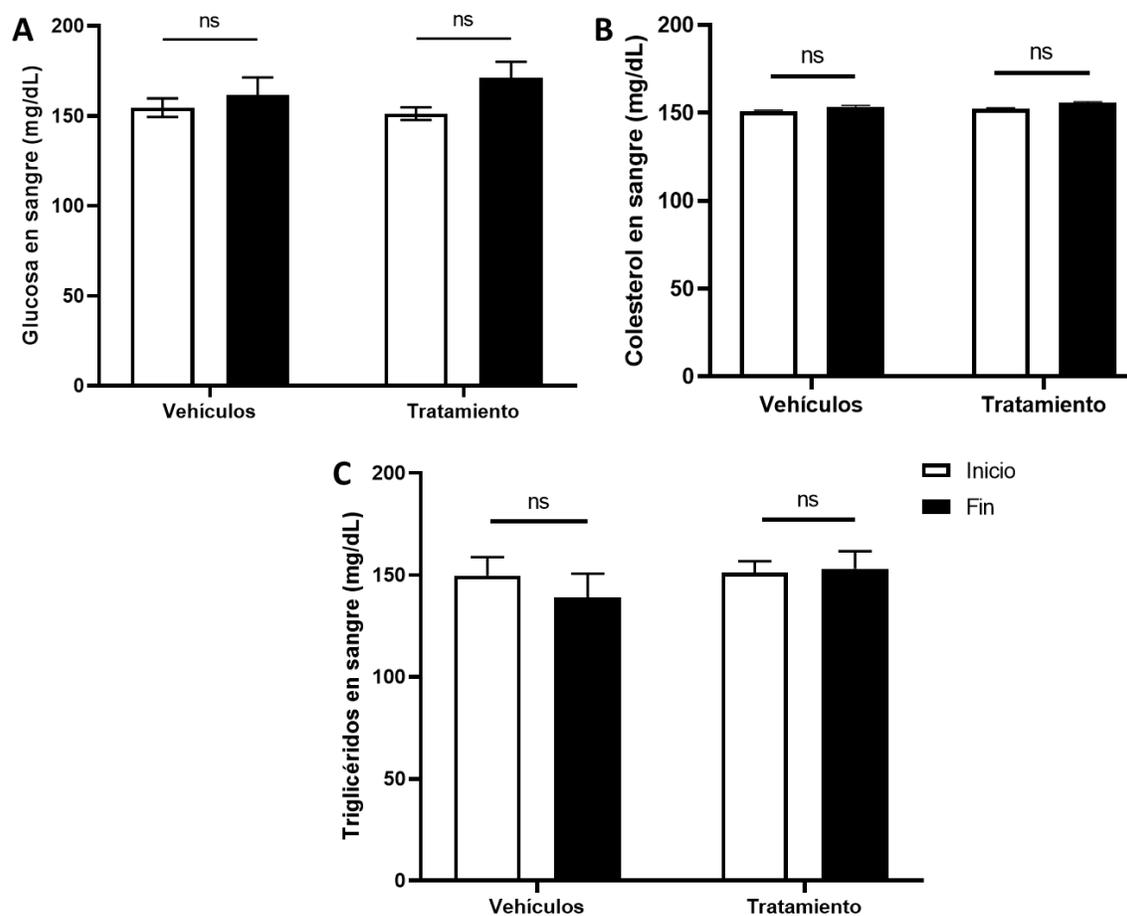


Figura 11. Determinación de glucosa (A), colesterol (B) y triglicéridos (C) al inicio y al final de la administración de los vehículos y el tratamiento. Se muestra el promedio \pm SEM de $n=9-12$ por grupo; ANOVA de dos vías, *post-hoc* Sidak; ns: no significativo.

Las evaluaciones conductuales, en conjunto, mostraron mejoría en la coordinación motora y la conducta ambulatoria de los ratones en tratamiento y lesionados con AQ en comparación con aquellos que recibieron vehículos y también fueron lesionados con AQ.

En la figura 12 podemos observar los resultados de la evaluación de campo abierto, que como se mencionó anteriormente, es un indicativo de la conducta motora espontánea en los ratones. Los ratones lesionados con AQ que recibieron vehículos tuvieron un promedio de 421.6 ± 17.3 movimientos horizontales en 5 min que fue significativamente menor que los movimientos horizontales que presentaron los ratones lesionados con SS, administrados con vehículos (734 ± 44.9) o tratamiento

(716.4±49.3) y principalmente con los ratones lesionados con AQ que recibieron el tratamiento que presentaron un promedio de 852±38.6 movimientos horizontales (Figura 12A).

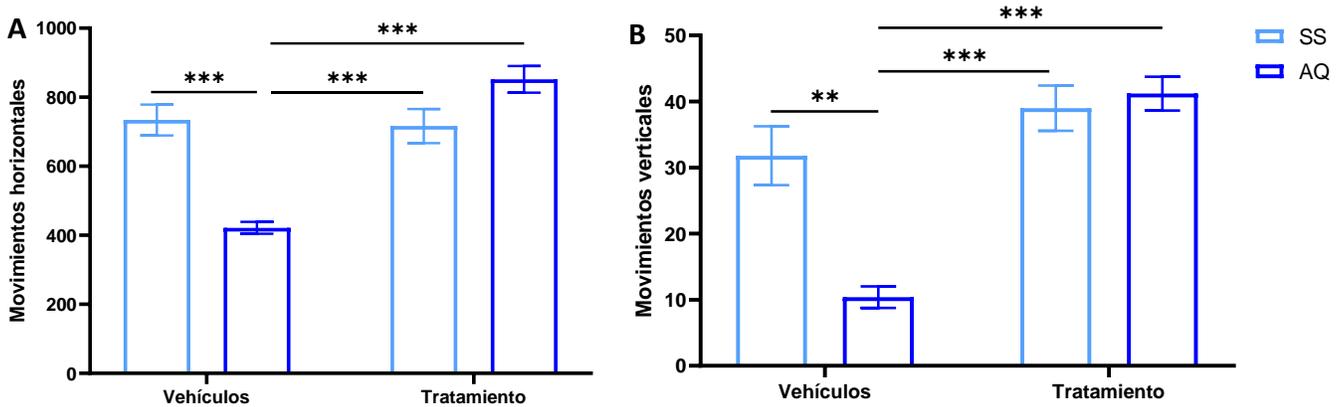


Figura 12. Conducta motora espontánea evaluada con la prueba de campo abierto. A) Movimientos horizontales, B) movimientos verticales. Se muestra el promedio ± SEM de n=5 por grupo; ANOVA de una vía, *post-hoc* Tukey; **P<0.01, ***P<0.001.

Al analizar los movimientos verticales, también resultó significativamente menor el promedio de los movimientos verticales en el grupo de animales que recibieron los vehículos y la lesión con AQ comparado con los demás grupos, con un promedio de 10.4±1.61 movimientos verticales, mientras que el promedio de movimientos verticales de los grupos que recibieron la lesión con SS fue de 31.8±4.4 movimientos para los que recibieron vehículos y 39±3.4 movimientos para los que recibieron el tratamiento, mientras que el grupo que recibió la lesión con AQ y el tratamiento presentó un promedio de 41.2±2.6 movimientos verticales (Figura 12B).

La coordinación motora fue evaluada por la prueba de rotarod, donde se registró el tiempo al que caían del rodillo giratorio (Figura 13A) así como la velocidad a la que se registraba su caída (Figura 13B). En ambos casos se observó que el grupo que recibió vehículos y fue lesionado con AQ presentó valores significativamente menores en el tiempo en el que se registraba su caída, así como en la velocidad del rotarod a la que caían, 36.5±5.7 s y 6.3±0.8 rpm, respectivamente. Los grupos que fueron lesionados con SS cayeron del rodillo giratorio a los 81.4±2.8 s (vehículos) y 103.9±11.2 s (tratamiento) mientras que el grupo que recibió el tratamiento y fue

lesionado con AQ cayó del rodillo a los 110.2 ± 16.2 s en promedio. En cuanto a la velocidad de rotación a la que cayeron del rodillo, se registró un promedio de 12.2 ± 0.3 , 15.3 ± 1.6 y 16 ± 2.1 rpm para los grupos Vehículos+SS, Tratamiento+SS y Tratamiento+AQ, respectivamente.

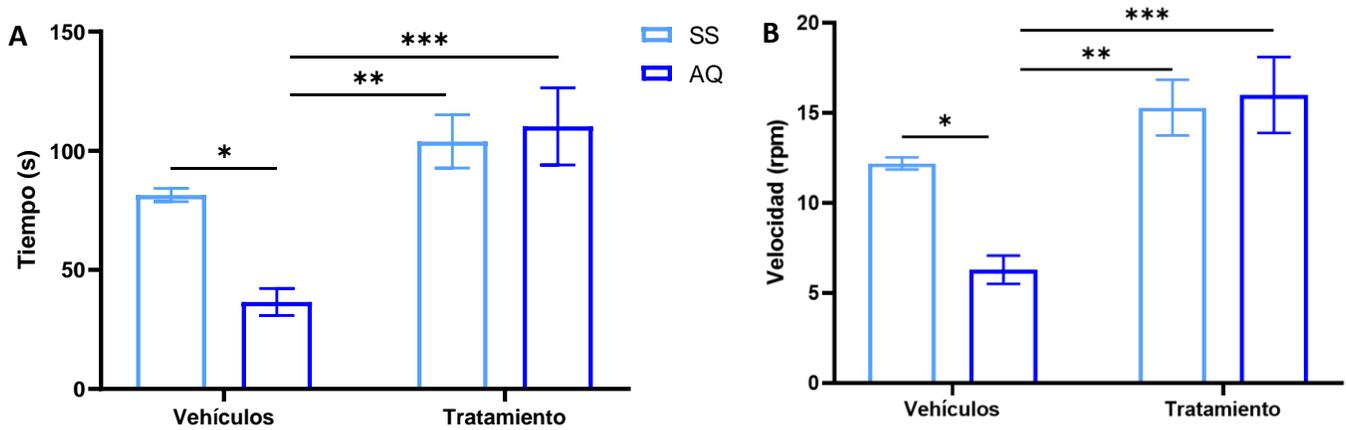


Figura 13. Coordinación motora evaluada con la prueba de rotarod. A) Latencia de caída, B) velocidad a la que se registra su caída. Se muestra el promedio \pm SEM de \pm SEM de $n=5$ por grupo; ANOVA de una vía, *post-hoc* Tukey; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

El efecto neuroprotector del tratamiento en el daño neuronal inducido por la lesión con AQ fue evaluado mediante la determinación de los giros ipsilaterales, así como la expresión de la proteína GAD67 por WB y el número de células positivas a Fluoro Jade B por tinción.

El grupo de vehículos+AQ (mediana=75) tuvo significativamente más giros ipsilaterales comparado con los grupos de vehículos+SS (mediana=1) y tratamiento+SS (mediana=1), mientras que el grupo tratamiento+AQ no presentó diferencias estadísticamente significativas con ningún grupo (Figura 14).

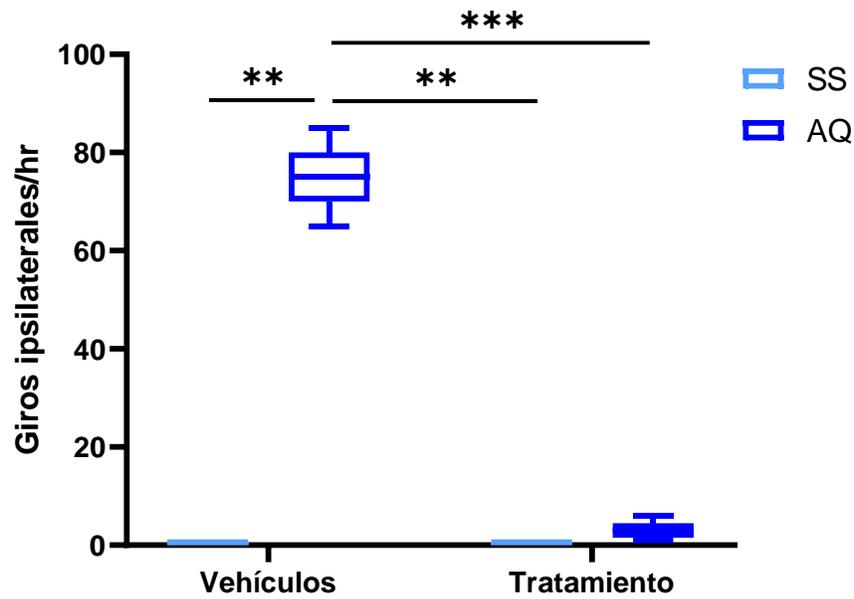


Figura 14. Giros ipsilaterales en ratones administrados con los vehículos y con el tratamiento, lesionados con AQ y SS. Se muestra la mediana de los datos, prueba de Kruskal-Wallis seguido de Mann Whitney; n=3 por grupo; **P<0.01, ***P<0.001.

La expresión de GAD67 en el hemisferio lesionado fue significativamente menor en el grupo vehículos+AQ comparado con el grupo que recibió vehículos y fue lesionado con SS, mientras que el grupo que recibió el tratamiento y fue lesionado con AQ presentó una expresión significativamente mayor de GAD67 (Figura 15). La expresión de GAD67 es usado como indicador de la síntesis de GABA demostrando que el tratamiento logra prevenir la disminución en los niveles de expresión de esta proteína en ratones lesionados con AQ.

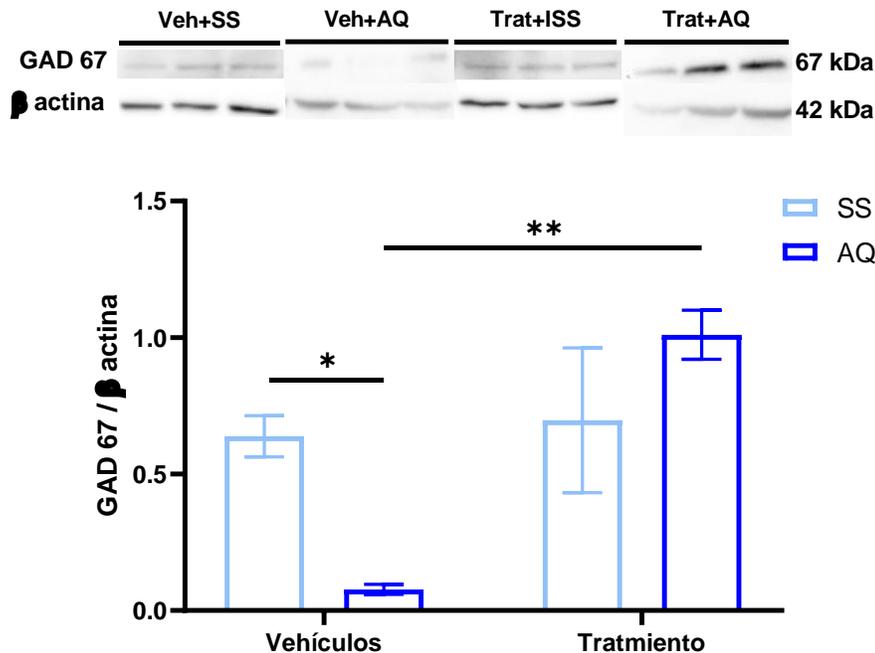


Figura 15.

Expresión de GAD67 por Western blot. A) Blots representativos de la expresión de GAD67 en el hemisferio lesionado con AQ o SS. B) Densitometría que muestra la relación de GAD67/ β actina en unidades arbitrarias. Se muestra el promedio \pm SEM de $n=3$ por grupo; ANOVA de una vía seguida de Tukey; * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

La tinción de fluoro jade B, por su parte, nos ayuda a identificar a las neuronas que se encuentran en degeneración, siendo un indicativo del daño neuronal ocasionado por la lesión con AQ. En La figura 16 podemos apreciar que en el estriado el grupo vehículos+AQ presenta un mayor marcaje de células Fluoro Jade B positivas (Figura 16C), lo que también se ve reflejado en la cuantificación (Figura 16E) mostrando un número promedio de células marcadas de 86.6 ± 20.1 , número de células que fue estadísticamente mayor al promedio de células marcadas que presentaron los grupos lesionados sólo con solución salina: vehículos+SS (4.8 ± 0.4 células) y tratamiento+SS (6.1 ± 1.8 células), y el grupo tratamiento+AQ (12.4 ± 1.4 células), indicando que el tratamiento previene la neurodegeneración ocasionada por el AQ.

La expresión de BDNF fue determinada por Western blot. En el grupo vehículos+AQ podemos observar la disminución significativa de expresión de BDNF comparada con los grupos que recibieron el tratamiento, con un promedio de 0.08 ± 0.02

unidades arbitrarias, mientras que el grupo con tratamiento y lesionado con AQ tuvo un promedio de 0.72 ± 0.09 unidades arbitrarias (Figura 17).

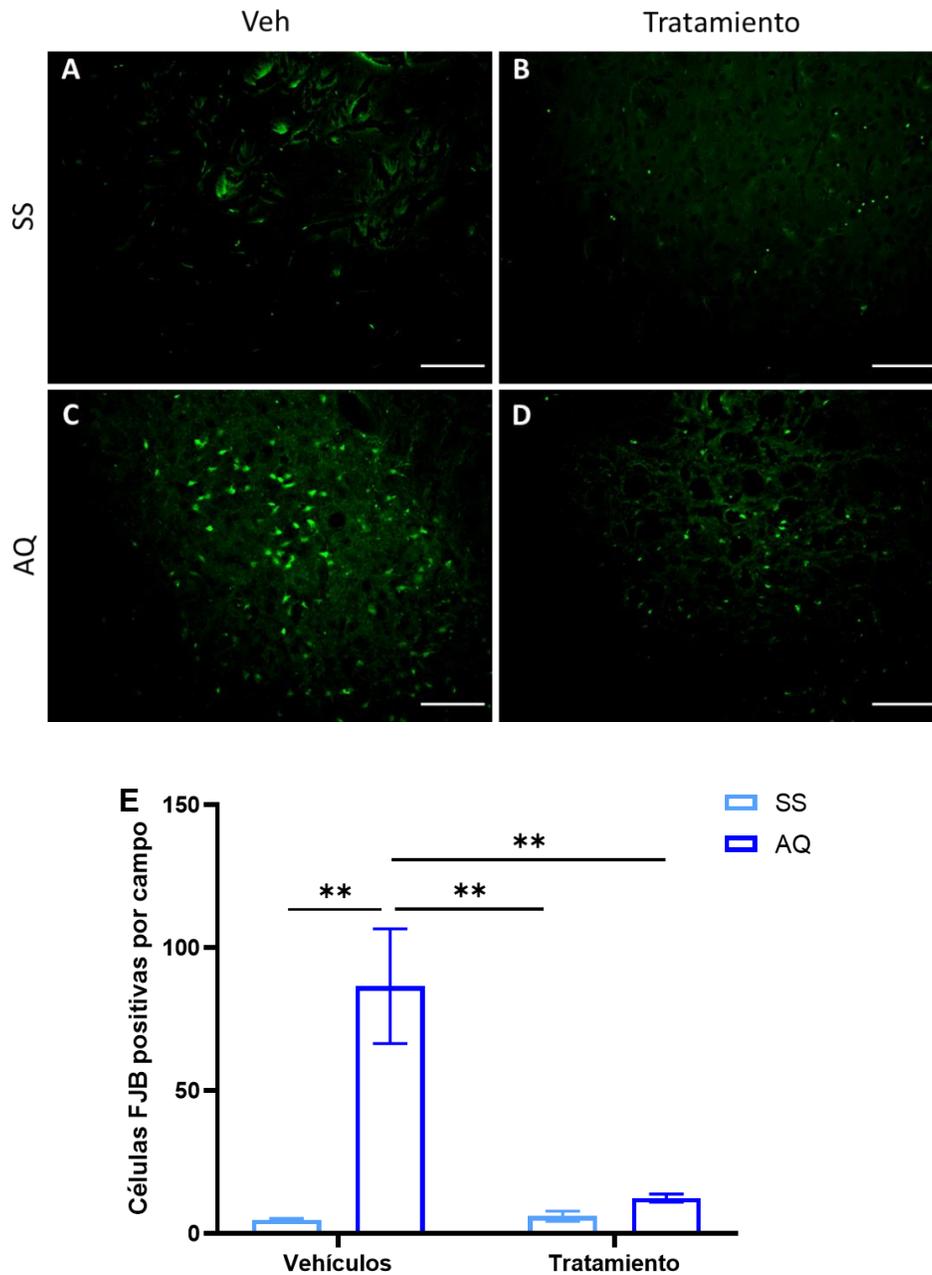


Figura 16. Tinción con Fluoro Jade B. A-D) Microfotografías de neuronas en degeneración en el estriado lesionado con AQ o SS. A) Vehículos+SS, B) Tratamiento+SS, C) Vehículos+AQ, D) Tratamiento+AQ. E) Cuantificación del número de células Fluoro Jade B positivas por campo. Se muestra el promedio \pm SEM de $n=3$ por grupo; ANOVA de una vía, *post-hoc* Tukey; ** $P < 0.01$.

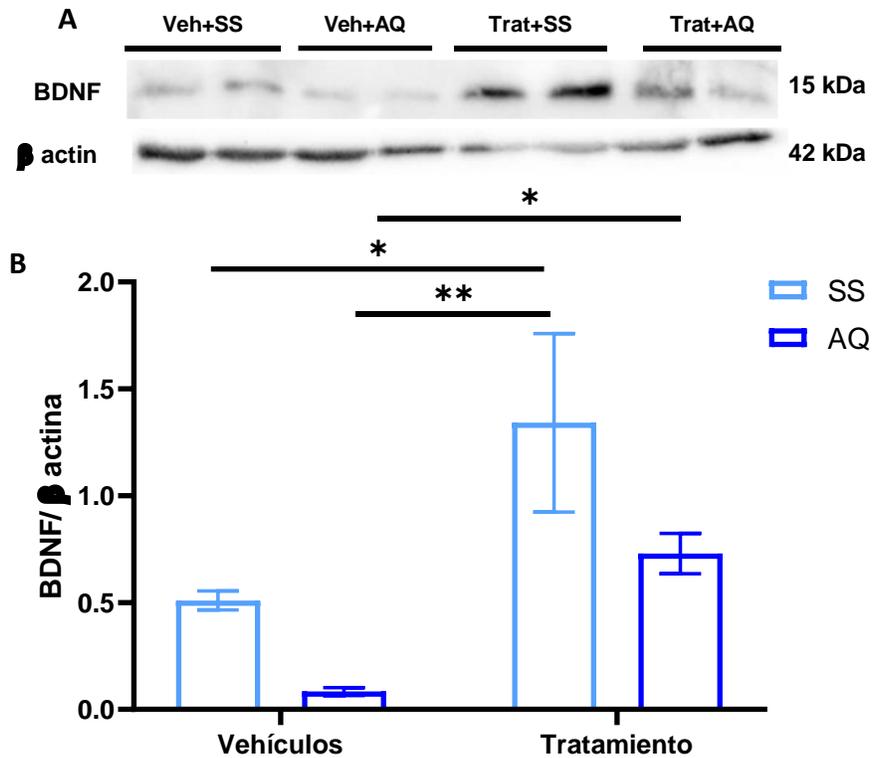


Figura 17. Expresión de BDNF por Western blot. A) Blots representativos de la expresión de BDNF en los diferentes grupos experimentales. B) Densitometría que muestra la relación de BDNF/ β actina en unidades arbitrarias. Se muestra el promedio \pm SEM de $n=3-5$ por grupo; ANOVA de una vía seguida de Tukey; * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

7.4 Efecto del tratamiento en la actividad del complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial y el estrés oxidante en el modelo de AQ

La actividad del complejo II de la cadena mitocondrial fue determinada por el uso del kit MitoCheck® Complex II Activity Assay Kit con el que pudimos determinar una disminución estadísticamente significativa en la actividad porcentual del complejo II que presentó el grupo de vehículos+AQ en relación con su control (vehículos+SS) con un promedio de $74.2 \pm 4.4\%$, comparada con los ratones del grupo con el tratamiento+AQ/tratamiento+SS que tuvieron un promedio de $96.8 \pm 3.5\%$ (Figura 18).

La disminución de la actividad del complejo II mitocondrial en el grupo vehículos+AQ puede relacionarse el aumento de PL y EROs que también fue detectado en este grupo.

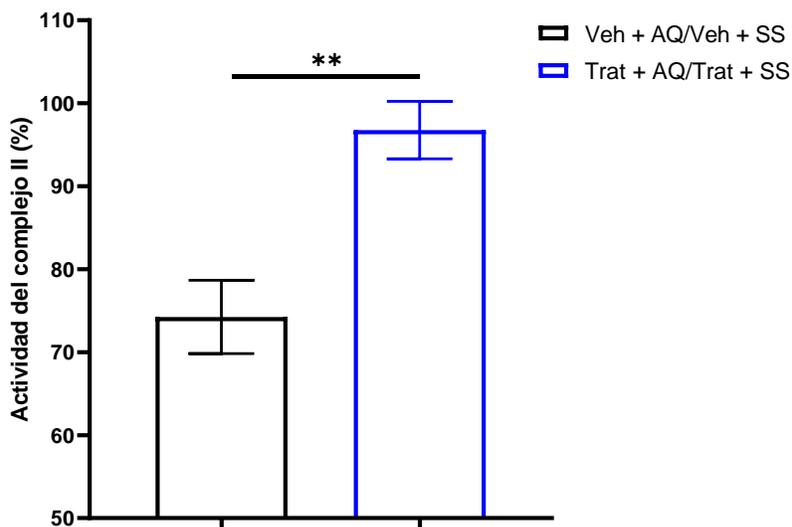


Figura 18. Actividad del complejo II mitocondrial. Se muestra el promedio \pm SEM de $n = 4$ por grupo; t-student no pareada; $**P = 0.0071$.

Los valores promedio de PL para el grupo vehículos+AQ fueron de 5.8 ± 1.2 unidades relativas de fluorescencia (URF), significativamente mayores que los presentados por los grupos lesionados con SS: vehículos+SS (0.9 ± 0.42 URF) y tratamientos+SS (1.5 ± 0.5 URF); de igual forma, los ratones lesionados con AQ que fueron administrados con el tratamiento mostraron niveles significativamente menores (0.9 ± 0.3 URF), que aquellos que sólo recibieron los vehículos (Figura 19A).

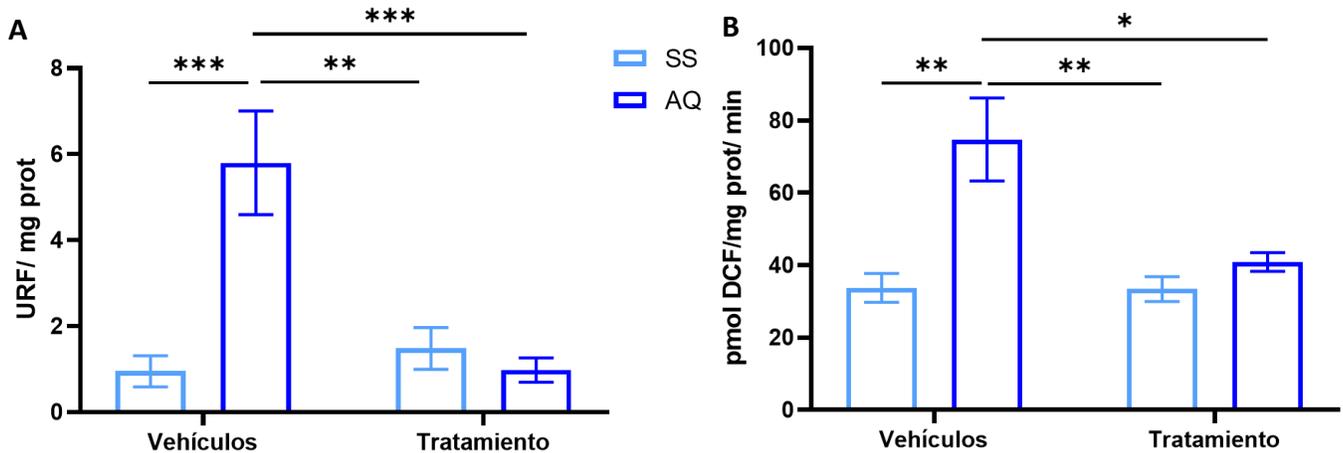


Figura 19. Evaluación del estrés oxidante. A) Cuantificación de PL; B) Cuantificación de la formación de ERO. Se muestra el promedio \pm SEM de: A) $n = 3-4$ por grupo, B) $n = 4-5$ por grupo; ANOVA de una vía, *post-hoc* Tukey; * $P < 0.05$.

La formación de EROs en el grupo vehículos+AQ también fue significativamente mayor que la que presentaron los demás grupos, con un promedio de 74.7 ± 11.5 pmol DCF, mientras que los grupos lesionados con SS tuvieron un promedio de: 33.7 ± 4.0 (vehículos) y 33.4 ± 3.4 pmoles DCF (tratamiento), al igual que el grupo lesionado con AQ que recibió el tratamiento y tuvo un promedio de 40.8 ± 2.6 pmoles DCF (Figura 19B).

Los parámetros anteriores nos muestran el efecto protector del tratamiento en la actividad del complejo II y el estrés oxidante generado por la lesión con AQ.

7.5 Efecto del tratamiento en la activación de astrocitos y microglía en el estriado de ratones lesionados con AQ y en la presencia de IL-6 en el suero.

La activación de los astrocitos fue evaluada por inmunofluorescencia con el marcaje con GFAP, la cantidad de células GFAP⁺ fue relacionada con el número de núcleos contabilizados por campo para la obtención del % de células GFAP⁺. En la figura 20 podemos observar que la imagen correspondiente al grupo vehículos+AQ presenta mayor número de células GFAP⁺ (Figura 20D-F) comparada con el resto de los grupos. Lo anterior podemos corroborarlo al observar la gráfica (Figura 20M) donde

se observa que el grupo lesionado con AQ y tratado con los vehículos, presenta un mayor % de células por campo GFAP⁺ (65.3 ± 20.1) comparado con los grupos lesionados con SS: vehículos (4.8 ± 0.4) y tratamiento (6.1 ± 1.8), así como con el grupo lesionado con AQ que recibió el tratamiento que tuvo un promedio de 12.4 ± 1.4 % de células GFAP⁺ mostrando que el tratamiento previene la activación de los astrocitos producida por la lesión con AQ.

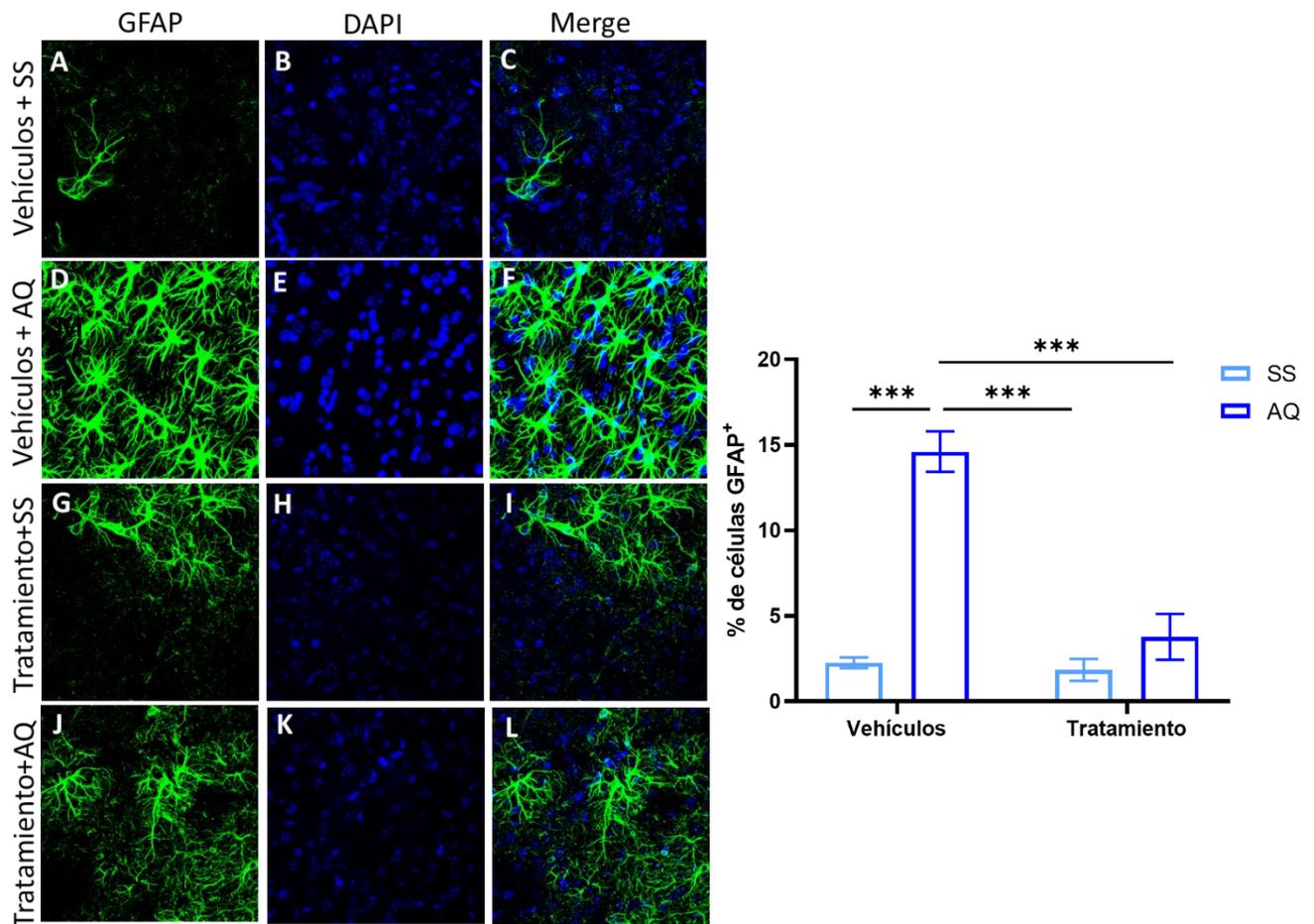


Figura 20. Activación de astrocitos. A-L) Microfotografías representativas de la presencia de astrocitos reactivos marcados con GFAP (columna izquierda), DAPI para marcar núcleos (columna media) y Merge (columna derecha), se observan todos los grupos evaluados: A-C) vehículos+SS, D-F) vehículos+AQ, G-I) tratamiento+SS y J-L) tratamiento+AQ. M) Conteo de células GFAP⁺. Se muestra el promedio \pm SEM de $n = 3$ por grupo; ANOVA de una vía, *post-hoc* Tukey; *** $P < 0.001$.

La activación de la microglía, fue evaluada mediante la expresión de Iba1 por WB (Figura 21), donde podemos observar que existe una mayor expresión de la proteína en el grupo lesionado con AQ que recibió los vehículos (Figura 21A) comparado con los grupos lesionados con SS. El grupo tratamiento+AQ también presenta mayor expresión de Iba1, sin embargo, al realizar la densitometría, podemos observar que la expresión de Iba1 es significativamente mayor sólo en el grupo vehículos+AQ (0.9 ± 0.1 unidades arbitrarias) comparado con los grupos lesionados con SS: vehículos (0.4 ± 0.2 unidades arbitrarias) y tratamiento (0.2 ± 0.08 unidades arbitrarias). El grupo lesionado con AQ y que estuvo bajo tratamiento (0.6 ± 0.1 unidades arbitrarias), no presentó diferencias estadísticamente significativas con ningún grupo (Figura 21B).

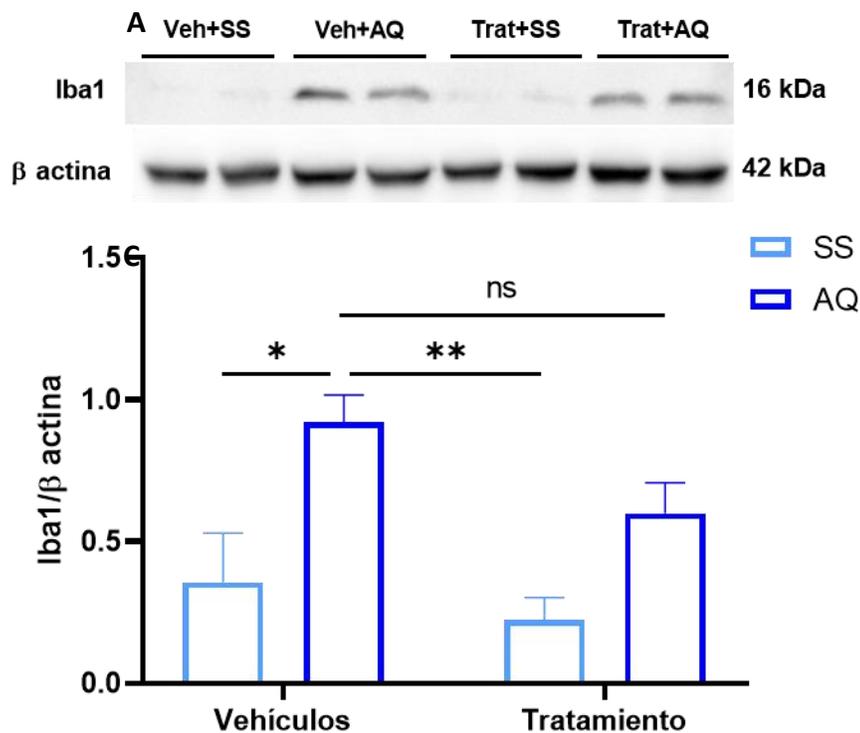


Figura 21. Activación de microglía con y sin lesión de AQ y pretratado con vehículos o tratamiento combinado. A) Blots representativos de la expresión de Iba1 de todos los grupos evaluados: B) Densitometría que muestra la relación de Iba1/ β actina en unidades arbitrarias. Se muestra el promedio \pm SEM de $n = 4$ por grupo; ANOVA de una vía, seguida de Tukey; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ns: no significativo.

8. Discusión

En la actualidad, no existe algún tratamiento que pueda detener o retrasar el curso de la EH o detenerla, los fármacos usados por los pacientes están enfocados en tratar los síntomas motores, psiquiátricos y cognitivos. Sin embargo, en los últimos años se han buscado y desarrollado tratamientos enfocados en la etiología de la enfermedad y en procesos afectados en el curso de ésta (Ferguson et al., 2022). En este estudio se comprobó el efecto neuroprotector de la combinación de un inmunomodulador (laquinimod) y una dieta rica en ácidos grasos (enriquecida con aceite de oliva) en un modelo neuroquímico de la EH. Los resultados obtenidos evidencian la importancia de usar compuestos que tengan efecto en diferentes procesos alterados en la EH, así como la importancia de la determinación de parámetros farmacológicos, como el índice de combinación y el índice de reducción de dosis, en la elección de la combinación de dosis adecuada que garantice el máximo efecto de cada compuesto.

Además, la combinación de dosis seleccionada de cada fármaco (denominado “el tratamiento”), mostró un efecto positivo en los parámetros evaluados de daño neuronal (Figuras 14-17), pruebas motoras (Figuras 12,13), actividad del complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial (Figura 18), daño oxidante (Figura 19) y activación de astrocitos y microglía (Figuras 20 y 21) en el modelo neuroquímico de la EH.

Respecto a la combinación de compuestos, se ha demostrado que la combinación de fármacos con diferentes mecanismo de acción resulta benéfico al tratar diferentes tipos de cáncer (Mejía-Rodríguez et al., 2023; Zhang et al., 2016), ya que es posible aumentar la eficacia del efecto terapéutico y disminuir las dosis de los compuestos usados manteniendo su efecto sin llegar a dosis tóxicas (Chou, 2006). En este estudio, la combinación de las DE_{50} de laquinimod y una dieta en ácidos grasos contenida en el aceite de oliva fue seleccionada debido a que su CI (índice de combinación) indicó la obtención de un efecto sinérgico, al inhibir en un 95% los giros ipsilaterales en el modelo neuroquímico de la EH (Figura 9), además su DRI nos indicó la reducción favorable de la dosis (tabla 8 y 9).

En el modelo neuroquímico de la EH, los giros ipsilaterales son un indicativo de la muerte de las neuronas GABAérgicas ocasionada por la lesión con AQ, mientras que la baja expresión de GAD67 evidencia indirectamente la disminución de GABA, al ser la enzima limitante para su síntesis (Hsu et al., 2018), la disminución de GAD67 también ha sido evidenciada en otros modelos de la EH al determinar los niveles de ARNm en corteza y estriado (Gourfinkel-An et al., 2003). En este estudio, es posible observar que al administrar el tratamiento se obtuvo la disminución de los giros ipsilaterales (Figura 14), así como la prevención de la disminución de los niveles de GAD67 (Figura 15); esto podemos atribuirlo al aumento en la expresión de BDNF que observamos al administrar el tratamiento (Figura 17), que corresponde con lo reportado en estudios en otros modelos de EH así como en otras enfermedades neurológicas donde también se ha demostrado que el laquinimod aumenta la expresión de BDNF (Ellrichmann et al., 2017; Thöne et al., 2012). Posiblemente el BDNF al unirse a su receptor TrkB, regula tanto la transcripción de GAD67 como de GAD65 promoviendo la supervivencia de las neuronas GABAérgicas así como la síntesis de GABA previniendo así el daño funcional ocasionado por la administración de AQ.

La prevención del daño neuronal en el estriado de los ratones también se evidenció con la tinción de Fluoro Jade B, en la que se observó la disminución de células en neurodegeneración en el grupo que recibió el tratamiento y la lesión con AQ (Figura 16). La prevención del daño neuronal en el estriado de los ratones se correlacionó con la mejoría motora en los sujetos de estudio, evaluados con las pruebas de campo abierto y rotarod (Figuras 12 y 13).

Por otra parte, se sabe que los metabolitos contenidos en la dieta rica en ácidos grasos actúan a nivel de membrana lipídica (Morales-Martínez et al., 2017) como atrapadores de radicales libres a través de la activación de los PPARs o los NRF 1 y 2, que a su vez regulan genes necesarios que participan en la respiración mitocondrial y además son coactivados por PGC1- α , este efecto puede explicar el aumento en la actividad del complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial (Figura 18), así como la disminución de la peroxidación de lípidos y de las especies

reactivas de oxígeno (Figura 19). Además, existe evidencia de que los PUFAs participan en la vía de señalización de CREB involucrada en la expresión de BDNF, lo que contribuiría al efecto del laquinimod y que conjuntamente podrían evitar el deterioro motor que se observa en los ratones lesionados intraestriatalmente con AQ que recibieron los vehículos (Guo et al., 2020; Jin, 2020; Yu et al., 2021)

Adicionalmente, varios estudios han mostrado el efecto del laquinimod en la modulación de la vía de NF- κ B, esta vía está involucrada en la respuesta inmune celular, así como en procesos como apoptosis e infecciones. Esta vía es inhibida por la administración de laquinimod en varios modelos de enfermedades autoinmunes como esclerosis múltiple por mecanismos que no han sido descritos. Sin embargo se ha observado que por esta vía el laquinimod reduce la activación de astrocitos y la liberación de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IFN α , IL-23p19 e IL-12p35 y promueve el aumento de citocinas antiinflamatorias como TGF β , IL-10 e IL-4 (Brück et al., 2012; Jolivel et al., 2013; Leibowitz & Yan, 2016). En este estudio determinamos la activación de los astrocitos (Figura 20) donde pudimos observar su disminución en el grupo lesionado con AQ, provocada por la administración del tratamiento debido al efecto del laquinimod, además, es probable que también exista la disminución de citocinas proinflamatorias en el sitio de la lesión con AQ, sin embargo, no realizamos su determinación.

Los resultados de este trabajo en conjunto demuestran que la combinación del laquinimod y una dieta rica en ácidos grasos, es una terapia eficaz en el modelo experimental para la EH inducido por AQ. El mecanismo de acción del inmunomodulador y la dieta involucran vías neuroprotectoras que no están completamente relacionadas pero se ha probado que tienen un efecto sinérgico como tratamiento. La combinación de estos compuestos como pretratamiento podría emplearse en otros modelos experimentales de enfermedades neurodegenerativas que tienen en común daño excitotóxico, procesos inflamatorios, daño oxidante y la alteración en la cadena respiratoria mitocondrial.

9. Resumen de resultados

La combinación de las DE50 de laquinimod y una dieta rica en ácidos grasos tiene un efecto sinérgico.

La combinación de laquinimod y una dieta rica en ácidos grasos disminuye el daño neuronal, así como el deterioro conductual en el modelo de excitotoxicidad ocasionado por la administración de AQ.

El tratamiento mejora la actividad del complejo II de la cadena respiratoria y disminuye el estrés oxidante generado por el AQ.

El tratamiento disminuye la astrogliosis en los ratones administrados con AQ.

10. Conclusión

La combinación de laquinimod y una dieta rica en ácidos grasos ejerce su efecto neuroprotector en un modelo de la EH por la administración intraestriatal de AQ modulando tres vías. Por un lado, proponemos que aumenta la expresión de BDNF que al unirse a su receptor TrkB promueve la transcripción de GAD67 previniendo el daño neuronal ocasionado por la neurotoxina (Figura 22a), lo que se ve reflejado en la mejoría en la coordinación motora y la conducta ambulatoria de los sujetos de estudio. Por otra parte, los ácidos grasos principalmente previenen el daño ocasionado por el AQ en las membranas celulares mediante su integración directa, disminuyendo como consecuencia el estrés oxidante (Figura 22b), además de que, probablemente, modulan la expresión de cofactores y factores de transcripción como PGC1 α y PPAR γ , respectivamente, que incrementan la biogénesis mitocondrial, así como el consumo de oxígeno y finalmente, el laquinimod disminuye la activación de NF- κ B, que a su vez disminuye la activación de astrocitos y posiblemente también ocasione la disminución en la liberación de citocinas proinflamatorias (Figura 22c).

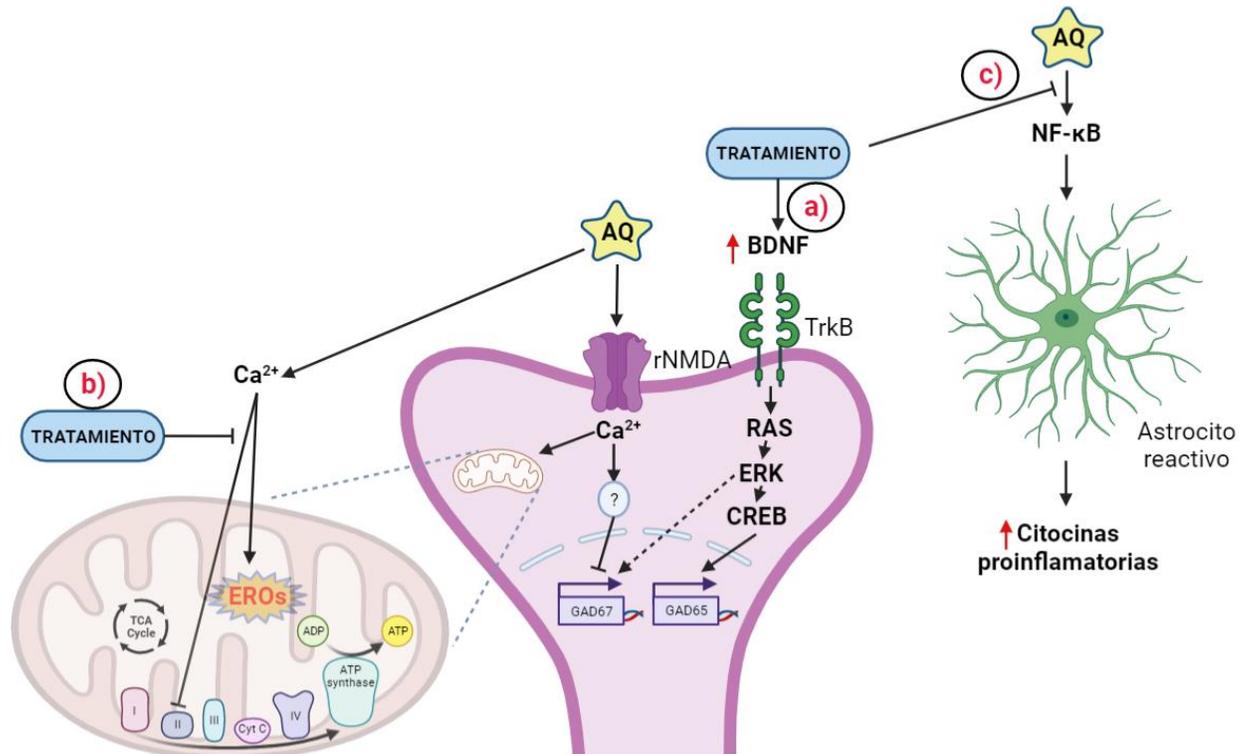


Figura 22. Posibles vías en las que participa el tratamiento en el modelo de enfermedad de Huntington inducido por Aβ. El tratamiento puede ejercer su efecto neuroprotector por tres vías: a) aumentando la expresión de BDNF que se une a su receptor TrkB y promueve la transcripción de GAD67; b) los ácidos grasos previenen el daño ocasionado por el Aβ en las membranas celulares mediante su integración directa, disminuyendo como consecuencia el estrés oxidante y c) el laquinimod disminuye la activación de NF-κB, que a su vez disminuye la activación de astrocitos. Modificada de Lee et al., 2019; Mor et al., 2021; Morales-Martínez et al., 2017.

11. Perspectivas

Evaluar el efecto del tratamiento en un modelo transgénico de la enfermedad de Huntington.

Evaluar los metabolitos de la vía de las kinureninas posterior a la administración de laquinimod.

12. Referencias

- Addae, J. I., & Stone, T. W. (2014). Quinolinate and related excitotoxins: Mechanisms of neurotoxicity and disease relevance. *Handbook of Neurotoxicity*, 2, 1543–1565. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5836-4_127
- Amaral, M., Outeiro, T. F., Scutton, 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. <https://doi.org/10.1007/s00109-013-1046-9>
- Bates, G. P., Dorsey, R., Gusella, J. F., Hayden, M. R., Kay, C., Leavitt, B. R., Nance, M., Ross, C. A., Scahill, R. I., Wetzel, R., Wild, E. J., & Tabrizi, S. J. (2015). Huntington disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 1(April), 1–21. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.5>
- Beal, F. 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. [https://doi.org/10.1016/0022-510X\(92\)90191-M](https://doi.org/10.1016/0022-510X(92)90191-M)
- Beal, M. Flint, & Ferrante, R. J. (2004). Experimental therapeutics in transgenic mouse models of Huntington's disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(5), 373–384. <https://doi.org/10.1038/nrn1386>
- 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.
- 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. <https://doi.org/10.1038/321168a0>
- Benchoua, A., Trioulier, Y., Zala, D., Gaillard, M.-C., Lefort, N., Dufour, N., Saudou, F., Elalouf, J.-M., Hirsch, E., Hantraye, P., Déglon, N., & Brouillet, E. (2006).

Involvement of Mitochondrial Complex II Defects in Neuronal Death Produced by N-Terminus Fragment of Mutated Huntingtin. *Molecular Biology of the Cell*, 17, 1652–1663. <https://doi.org/10.1091/mbc.E05-07-0607>

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.

Bordelon, Y. M., Chesselet, M.-F., Nelson, D., Welsh, F., & Erecińska, M. (2010). Energetic Dysfunction in Quinolinic Acid-Lesioned Rat Striatum. *Journal of Neurochemistry*, 69(4), 1629–1639. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.69041629.x>

Brück, W., Pfortner, R., Pham, T., Zhang, J., Hayardeny, L., Piryatinsky, V., Hanisch, U. K., Regen, T., Van Rossum, D., Brakelmann, L., Hagemeyer, K., Kuhlmann, T., Stadelmann, C., John, G. R., Kramann, N., & Wegner, C. (2012). Reduced astrocytic NF-κB activation by laquinimod protects from cuprizone-induced demyelination. *Acta Neuropathologica*, 124(3), 411–424. <https://doi.org/10.1007/s00401-012-1009-1>

Brunmark, C., Runström, A., Ohlsson, L., Sparre, B., Brodin, T., Åström, M., & Hedlund, G. (2002). The new orally active immunoregulator laquinimod (ABR-215062) effectively inhibits development and relapses of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neuroimmunology*, 130(1–2), 163–172. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(02\)00225-4](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(02)00225-4)

Caron, N. S., Dorsey, E. R., & Hayden, M. R. (2018). Therapeutic approaches to huntington disease: From the bench to the clinic. *Nature Reviews Drug Discovery*, 17(10), 729–750. <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.133>

Chan, A. W. S., Jiang, J., Chen, Y., Li, C., Prucha, M. S., Hu, Y., Chi, T., Moran, S., Rahim, T., Li, S., Li, X., Zola, S. M., Testa, C. M., Mao, H., Villalba, R., Smith, Y., Zhang, X., & Bachevalier, J. (2015). Progressive cognitive deficit, motor impairment and striatal pathology in a transgenic huntington disease monkey model from infancy to adulthood. *PLoS ONE*, 10(5), 1–16.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122335>

- Choo, Y. S., Johnson, G. V. W., MacDonald, M., Detloff, P. J., & Lesort, M. (2004). Mutant huntingtin directly increases susceptibility of mitochondria to the calcium-induced permeability transition and cytochrome c release. *Human Molecular Genetics*, 13(14), 1407–1420. <https://doi.org/10.1093/HMG/DDH162>
- Chou, T. C. (2006). Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacological Reviews*, 58(3), 621–681. <https://doi.org/10.1124/pr.58.3.10>
- Coyle, J., & Schwarcz, R. (1976). Lesion of striatal neurones with kainic acid provides a model for Huntington's chorea. *Nature*, 262, 774–776.
- Diem, R., Sättler, M. B., Merkler, D., Demmer, I., Maier, K., Stadelmann, C., Ehrenreich, H., & Bähr, M. (2005). Combined therapy with methylprednisolone and erythropoietin in a model of multiple sclerosis. *Brain*, 128(2), 375–385. <https://doi.org/10.1093/brain/awh365>
- 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. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000031791.10922.CF>
- Elfawy, H. A., & Das, B. (2019). Crosstalk between mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and age related neurodegenerative disease: Etiologies and therapeutic strategies. *Life Sciences*, 218(December 2018), 165–184. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.12.029>
- Ellrichmann, G., Blusch, A., Fatoba, O., Brunner, J., Hayardeny, L., Hayden, M., Sehr, D., Winklhofer, K. F., Saft, C., & Gold, R. (2017). Laquinimod treatment in the R6/2 mouse model. *Scientific Reports*, 7(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04990-1>
- Estrada Sánchez, A. M., Mejía-Toiber, J., & Massieu, L. (2008). Excitotoxic Neuronal Death and the Pathogenesis of Huntington's Disease. *Archives of Medical Research*, 39(3), 265–276. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2007.11.011>

- Fão, L., Coelho, P., Rodrigues, R. J., & Rego, A. C. (2022). Restored Fyn Levels in Huntington's Disease Contributes to Enhanced Synaptic GluN2B-Composed NMDA Receptors and CREB Activity. *Cells*, 11(19), 3063. <https://doi.org/10.3390/CELLS11193063/S1>
- Ferguson, M. W., Kennedy, C. J., Palpagama, T. H., Waldvogel, H. J., Faull, R. L. M., & Kwakowsky, A. (2022). Current and Possible Future Therapeutic Options for Huntington's Disease. *Journal of Central Nervous System Disease*, 14, 117957352210925. <https://doi.org/10.1177/11795735221092517>
- Franco-Iborra, S., Vila, M., & Perier, C. (2018). Mitochondrial quality control in neurodegenerative diseases: Focus on Parkinson's disease and Huntington's disease. *Frontiers in Neuroscience*, 12(MAY), 1–25. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00342>
- Frank, S. (2014). Treatment of Huntington's Disease. *Neurotherapeutics*, 11(1), 153–160. <https://doi.org/10.1007/s13311-013-0244-z>
- Frost, J. L., & Schafer, D. P. (2016). *Microglia: Architects of the Developing Nervous System*. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.02.006>
- Garcia-Miralles, M., Hong, X., Tan, L. J., Caron, N. S., Huang, Y., To, X. V., Lin, R. Y., Franciosi, S., Papapetropoulos, S., Hayardeny, L., Hayden, M. R., Chuang, K. H., & Pouladi, M. A. (2016). Laquinimod rescues striatal, cortical and white matter pathology and results in modest behavioural improvements in the YAC128 model of Huntington disease. *Scientific Reports*, 6(February), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep31652>
- Ghosh, R., & Tabrizi, S. J. (2018). *Clinical Features of Huntington 's Disease*.
- Gil, J. M., & Rego, a C. (2008). Mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease. *Eur.J.Neurosci.*, 27(1460-9568 (Electronic) LA-eng PT-Journal Article PT-Research Support, Non-U.S. Gov't PT-Review RN-0 (HD protein, human) RN-0 (Nerve Tissue Proteins) RN-0 (Nuclear Proteins) SB-IM), 2803–2820. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06310.x>

- Goebel, H. H., Heipertz, R., Scholz, W., Iqbal, K., & Tellez-Nagel, I. (1978). Juvenile Huntington chorea. *Neurology*, 28(1), 23–23. <https://doi.org/10.1212/WNL.28.1.23>
- González-Correa, J. A., Muñoz-Marín, J., Arrebola, M. M., Guerrero, A., Narbona, F., López-Villodres, J. A., & De La Cruz, J. P. (2007). Dietary virgin olive oil reduces oxidative stress and cellular damage in rat brain slices subjected to hypoxia-reoxygenation. *Lipids*, 42(10), 921–929. <https://doi.org/10.1007/s11745-007-3097-6>
- Gould, T. D., Dao, D. T., & Kovacsics, C. E. (2009). *The Open Field Test* (pp. 1–20). Humana Press, Totowa, NJ. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-303-9_1
- Gourfinkel-An, I., Parain, K., Hartmann, A., Mangiarini, L., Brice, A., Bates, G., & Hirsch, E. C. (2003). Changes in GAD67 mRNA expression evidenced by in situ hybridization in the brain of R6/2 transgenic mice. *Journal of Neurochemistry*, 86(6), 1369–1378. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01916.x>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2004.07.006>
- Guillemin, G. J. (2012). Quinolinic acid, the inescapable neurotoxin. *FEBS Journal*, 279(8), 1356–1365. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08485.x>
- Guo, C., Liu, Y., Fang, M. sheng, Li, Y., Li, W., Mahaman, Y. A. R., Zeng, K., Xia, Y., Ke, D., Liu, R., Wang, J. Z., Shen, H., Shu, X., & Wang, X. (2020). ω -3PUFAs Improve Cognitive Impairments Through Ser133 Phosphorylation of CREB Upregulating BDNF/TrkB Signal in Schizophrenia. *Neurotherapeutics*, 17(3), 1271–1286. <https://doi.org/10.1007/s13311-020-00859-w>
- Guo, S., Wang, H., & Yin, Y. (2022). Microglia Polarization From M1 to M2 in Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 14(February), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.815347>

- He, B., Lu, C., Zheng, G., He, X., Wang, M., Chen, G., Zhang, G., & Lu, A. (2016). Combination therapeutics in complex diseases. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *20*(12), 2231–2240. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12930>
- Hensley, K., Fedynyshyn, J., Ferrell, S., Floyd, R. A., Gordon, B., Grammas, P., Hamdheydari, L., Mhatre, M., Mou, S., Pye, Q. N., Stewart, C., West, M., West, S., & Williamson, K. S. (2003). Message and protein-level elevation of tumor necrosis factor α (TNF α) and TNF α -modulating cytokines in spinal cords of the G93A-SOD1 mouse model for amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of Disease*, *14*(1), 74–80. [https://doi.org/10.1016/S0969-9961\(03\)00087-1](https://doi.org/10.1016/S0969-9961(03)00087-1)
- Hinkle, P. C. (2005). P/O ratios of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, *1706*(1–2), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2004.09.004>
- Horton, T. M., Graham, B. H., Corral-Debrinski, M., Shoffner, J. M., Kaufman, A. E., Beal, M. F., & Wallace, D. C. (1995). Marked increase in mitochondrial DNA deletion levels in the cerebral cortex of Huntington's disease patients. *Neurology*, *45*(10), 1879–1883. <https://doi.org/10.1212/WNL.45.10.1879>
- Hsu, Y. T., Chang, Y. G., & Chern, Y. (2018). Insights into GABA A ergic system alteration in Huntington's disease. *Open Biology*, *8*(12). <https://doi.org/10.1098/rsob.180165>
- Jacobsen, J. C., Bawden, C. S., Rudiger, S. R., McLaughlan, C. J., Reid, S. J., Waldvogel, H. J., MacDonald, M. E., Gusella, J. F., Walker, S. K., Kelly, J. M., Webb, G. C., Faull, R. L. M., Rees, M. I., & Snell, R. G. (2010). An ovine transgenic Huntington's disease model. *Human Molecular Genetics*, *19*(10), 1873–1882. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq063>
- 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.
- Jenkins, B. G., Rosas, H. D., Chen, Y. C. I., Makabe, T., Myers, R., MacDonald, M.,

- Rosen, B. R., Beal, M. F., & Koroshetz, W. J. (1998). ¹H NMR spectroscopy studies of Huntington's disease. *Neurology*, *50*(5), 1357–1365. <https://doi.org/10.1212/WNL.50.5.1357>
- Jimenez-Sanchez, M., Licitra, F., Underwood, B. R., & Rubinsztein, D. C. (2017). Huntington's disease: Mechanisms of pathogenesis and therapeutic strategies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *7*(7), 1–22. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a024240>
- Jin, W. (2020). Regulation of bdnf-trkb signaling and potential therapeutic strategies for parkinson's disease. *Journal of Clinical Medicine*, *9*(1). <https://doi.org/10.3390/jcm9010257>
- Jolivel, V., Luessi, F., Masri, J., Kraus, S. H. P., Hubo, M., Poisa-Beiro, L., Klebow, S., Paterka, M., Yogev, N., Tumani, H., Furlan, R., Siffrin, V., Jonuleit, H., Zipp, F., & Waisman, A. (2013). Modulation of dendritic cell properties by laquinimod as a mechanism for modulating multiple sclerosis. *Brain*, *136*(4), 1048–1066. <https://doi.org/10.1093/brain/awt023>
- Jurcau, A. (2022). Molecular Pathophysiological Mechanisms in Huntington's Disease. *Biomedicines*, *10*(6). <https://doi.org/10.3390/biomedicines10061432>
- Katsumoto, A., Miranda, A. S., Butovsky, O., Teixeira, A. L., Ransohoff, R. M., & Lamb, B. T. (2018). Laquinimod attenuates inflammation by modulating macrophage functions in traumatic brain injury mouse model. *Journal of Neuroinflammation*, *15*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1075-y>
- Kaur, N., Chugh, V., & Gupta, A. K. (2014). Essential fatty acids as functional components of foods- a review. *Journal of Food Science and Technology*, *51*(10), 2289–2303. <https://doi.org/10.1007/S13197-012-0677-0/FIGURES/7>
- Kaushik, D. K., & Basu, A. (2013). A friend in need may not be a friend indeed: role of microglia in neurodegenerative diseases. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, *12*(6), 726–740.
- Kim, A., Lalonde, K., Truesdell, A., Welter, P. G., Brocardo, P. S., Rosenstock, T.

- R., & Gil-mohapel, J. (2021). New avenues for the treatment of huntington's disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 1–50. <https://doi.org/10.3390/ijms22168363>
- Kirkwood, S. C., Su, J. L., Conneally, P. M., & Foroud, T. (2001). Progression of Symptoms in the Early and Middle Stages of Huntington Disease. *Archives of Neurology*, 58(2), 273–278. <https://doi.org/10.1001/ARCHNEUR.58.2.273>
- Lee, S. E., Lee, Y., & Lee, G. H. (2019). The regulation of glutamic acid decarboxylases in GABA neurotransmission in the brain. *Archives of Pharmacal Research*, 42(12), 1031–1039. <https://doi.org/10.1007/s12272-019-01196-z>
- Leibowitz, S. M., & Yan, J. (2016). NF-κB pathways in the pathogenesis of multiple sclerosis and the therapeutic implications. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 9(SEP2016), 1–23. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2016.00084>
- Liddel, S. A., Guttenplan, K. A., Clarke, L. E., Bennett, F. C., Bohlen, C. J., Schirmer, L., Bennett, M. L., Münch, A. E., Chung, W. S., Peterson, T. C., Wilton, D. K., Frouin, A., Napier, B. A., Panicker, N., Kumar, M., Buckwalter, M. S., Rowitch, D. H., Dawson, V. L., Dawson, T. M., ... Barres, B. A. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*, 541(7638), 481–487. <https://doi.org/10.1038/nature21029>
- Liu, C. S., Cheng, W. L., Kuo, S. J., Li, J. Y., Soong, B. W., & Wei, Y. H. (2008). Depletion of mitochondrial DNA in leukocytes of patients with poly-Q diseases. *Journal of the Neurological Sciences*, 264(1–2), 18–21. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2007.07.016>
- Lv, J., Jiang, S., Yang, Z., Hu, W., Wang, Z., Li, T., & Yang, Y. (2018). PGC-1α sparks the fire of neuroprotection against neurodegenerative disorders. *Ageing Research Reviews*, 44(February), 8–21. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2018.03.004>
- Mackay, J. P., Nassrallah, W. B., & Raymond, L. A. (2018). Cause or compensation?—Altered neuronal Ca²⁺ handling in Huntington's disease. *CNS Neuroscience and Therapeutics*, 24(4), 301–310.

<https://doi.org/10.1111/cns.12817>

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. <https://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.

Mejía-Rodríguez, R., Romero-Trejo, D., González, R. O., & Segovia, J. (2023). Combined treatments with AZD5363, AZD8542, curcumin or resveratrol induce death of human glioblastoma cells by suppressing the PI3K/AKT and SHH signaling pathways. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 33(January), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2023.101430>

Mohagheghi, F., Bigdeli, M. R., Rasouljan, B., Zeinanloo, A. A., & Khoshbaten, A. (2010). Dietary virgin olive oil reduces blood brain barrier permeability, brain edema, and brain injury in rats subjected to ischemia-reperfusion. *TheScientificWorldJournal*, 10, 1180–1191. <https://doi.org/10.1100/tsw.2010.128>

Mor, A., Tankiewicz-Kwedlo, A., Krupa, A., & Pawlak, D. (2021). Role of kynurenine pathway in oxidative stress during neurodegenerative disorders. *Cells*, 10(7), 1–30. <https://doi.org/10.3390/cells10071603>

Morales-Martínez, A., Montes, S., Sánchez-Mendoza, A., Angeles-López, Q. D., Joel, J. G., Pablo Eliasib, M. G., & Francisca, P. S. (2020). Synaptosomes as a model to study fish oil and olive oil effect as neuroprotectors. In *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention* (pp. 239–249). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819528-4.00024-9>

Morales-Martínez, A., Sánchez-Mendoza, A., Martínez-Lazcano, J. C., Pineda-Farías, J. B., Montes, S., El-Hafidi, M., Martínez-Gopar, P. E., Tristán-López, L., Pérez-Neri, I., Zamorano-Carrillo, A., Castro, N., Ríos, C., & Pérez-

- Severiano, F. (2017). Essential fatty acid-rich diets protect against striatal oxidative damage induced by quinolinic acid in rats. *Nutritional Neuroscience*, 20(7), 388–395. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2016.1147683>
- Mori, T., Koyama, N., Tan, J., Segawa, T., Maeda, M., & Town, T. (2017). Combination therapy with octyl gallate and ferulic acid improves cognition and neurodegeneration in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Biological Chemistry*, 292(27), 11310–11325. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.762658>
- Oliván, S., Martínez-Beamonte, R., Calvo, A. C., Surra, J. C., Manzano, R., Arnal, C., Osta, R., & Osada, J. (2014). Extra virgin olive oil intake delays the development of amyotrophic lateral sclerosis associated with reduced reticulum stress and autophagy in muscle of SOD1G93A mice. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 25(8), 885–892. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.04.005>
- Palpagama, T. H., Waldvogel, H. J., Faull, R. L. M., & Kwakowsky, A. (2019). The Role of Microglia and Astrocytes in Huntington's Disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 12(October), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00258>
- 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. <https://doi.org/10.1038/nn884>
- Paxinos, G., & Franklin, K. (2004). *Brain Drawings.pdf*. <https://www.elsevier.com/books/paxinos-and-franklins-the-mouse-brain-in-stereotaxic-coordinates/paxinos/978-0-12-391057-8%0Abooksite.elsevier.com/9780123910578/>
- 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. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(92\)90749-W](https://doi.org/10.1016/0304-3940(92)90749-W)
- 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. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(82\)91048-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(82)91048-4)

Pido-Lopez, J., Andre, R., Benjamin, A. C., Ali, N., Farag, S., Tabrizi, S. J., & Bates, G. P. (2018). In vivo neutralization of the protagonist role of macrophages during the chronic inflammatory stage of Huntington's disease. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-018-29792-X>

Pitarokoili, K., Ambrosius, B., Schrewe, L., Hayardeny, L., Hayden, M., & Gold, R. (2014). Laquinimod exerts strong clinical and immunomodulatory effects in Lewis rat experimental autoimmune neuritis. *Journal of Neuroimmunology*, 274(1–2), 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2014.06.012>

Politis, M., Lahiri, N., Niccolini, F., Su, P., Wu, K., Giannetti, P., Scahill, R. I., Turkheimer, F. E., Tabrizi, S. J., & Piccini, P. (2015). Increased central microglial activation associated with peripheral cytokine levels in premanifest Huntington's disease gene carriers. *Neurobiology of Disease*, 83, 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2015.08.011>

Pouladi, M. a, Morton, a J., & Hayden, M. R. (2013). Choosing an animal model for the study of Huntington's disease. *Nature Reviews. Neuroscience*, 14(10), 708–721. <https://doi.org/10.1038/nrn3570>

Precious, S. V., Rosser, A. E., & Dunnett, S. B. (Eds.). (2018). *Huntington's Disease*. 1780. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7825-0>

Quintanilla, R. A., & Johnson, G. V. W. (2009). Role of mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Huntington's disease. *Brain Research Bulletin*, 80, 242–247. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2009.07.010>

Raymond, L. A. (2003). Excitotoxicity in Huntington disease. *Clinical Neuroscience Research*, 3(3), 121–128. [https://doi.org/10.1016/S1566-2772\(03\)00054-9](https://doi.org/10.1016/S1566-2772(03)00054-9)

Saft, C., Zange, J., Andrich, J., Müller, K., Lindenberg, K., Landwehrmeyer, B., Vorgerd, M., Kraus, P. H., Przuntek, H., & Schöls, L. (2005). Mitochondrial impairment in patients and asymptomatic mutation carriers of Huntington's

disease. *Movement Disorders*, 20(6), 674–679.
<https://doi.org/10.1002/mds.20373>

Sanberg, P. R., Fibiger, H. C., & Mark, R. F. (1981). BODY WEIGHT AND DIETARY FACTORS IN HUNTINGTON'S DISEASE PATIENTS COMPARED WITH MATCHED CONTROLS. *Medical Journal of Australia*, 1(8), 407–409.
<https://doi.org/10.5694/J.1326-5377.1981.TB135681.X>

Saré, R. M., Lemons, A., & Smith, C. B. (2021). Behavior testing in rodents: Highlighting potential confounds affecting variability and reproducibility. *Brain Sciences*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/brainsci11040522>

Sathyaikumar, K. V., Breda, C., Schwarcz, R., & Giorgini, F. (2018). Assessing and modulating kynurenine pathway dynamics in Huntington's disease: Focus on kynurenine 3-monooxygenase. *Methods in Molecular Biology*, 1780, 397–413. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7825-0_18

Saudou, F., & Humbert, S. (2016). The Biology of Huntingtin. *Neuron*, 89(5), 910–926. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.02.003>

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.

Sepers, M. D., & Raymond, L. A. (2014). Mechanisms of synaptic dysfunction and excitotoxicity in Huntington's disease. *Drug Discovery Today*, 19(7), 990–996.
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.02.006>

Skaper, S., Facci, L., & Giusti, P. (2014). Neuroinflammation, Microglia and Mast Cells in the Pathophysiology of Neurocognitive Disorders: A Review. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 13(10), 1654–1666.

Sofroniew, M. V. (2015). *Astrogliosis*.

Stack, E. C., Smith, K. M., Ryu, H., Cormier, K., Chen, M., Hagerty, S. W., Del Signore, S. J., Cudkovicz, M. E., Friedlander, R. M., & Ferrante, R. J. (2006). Combination therapy using minocycline and coenzyme Q10 in R6/2 transgenic

- Huntington's disease mice. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1762(3), 373–380. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2005.11.002>
- Stahl, W. L., & Swanson, P. D. (1974). Biochemical abnormalities in Huntington's chorea brains. *Neurology*, 24(9), 813–813. <https://doi.org/10.1212/WNL.24.9.813>
- Stone, T. W., & Darlington, L. G. (2002). Endogenous kynurenines as targets for drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov*, 1(August), 609–620. <https://doi.org/10.1038/nrd870>
- Szalardy, L., Klivenyi, P., Zadori, D., Fulop, F., Toldi, J., & Vecsei, L. (2012). Mitochondrial Disturbances, Tryptophan Metabolites and Neurodegeneration: Medicinal Chemistry Aspects. *Current Medicinal Chemistry*, 19(13), 1899–1920. <https://doi.org/10.2174/092986712800167365>
- Tabrizi, S. J., Workman, J., Hart, P. E., Mangiarini, L., Mahal, A., Bates, G., Cooper, J. M., & Schapira, A. H. V. (2000). Mitochondrial dysfunction and free radical damage in the Huntington R6/2 transgenic mouse. *Annals of Neurology*, 47(1), 80–86. [https://doi.org/10.1002/1531-8249\(200001\)47:1<80::AID-ANA13>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/1531-8249(200001)47:1<80::AID-ANA13>3.0.CO;2-K)
- Tai, Y. F., Pavese, N., Gerhard, A., Tabrizi, S. J., Barker, R. A., Brooks, D. J., & Piccini, P. (2007). Microglial activation in presymptomatic Huntington's disease gene carriers. *Brain*, 130(7), 1759–1766. <https://doi.org/10.1093/brain/awm044>
- Tasset, I., Pontes, A. J., Hinojosa, A. J., de la Torre, R., & Túnez, I. (2011). Olive oil reduces oxidative damage in a 3-nitropropionic acid-induced huntington's disease-like rat model. *Nutritional Neuroscience*, 14(3), 106–111. <https://doi.org/10.1179/1476830511Y.0000000005>
- Tellez-Nagel, I., Johnson, A. B., & Terry, R. D. (1974). Studies on Brain Biopsies of Patients with Huntington's Chorea. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 33(2), 308–332. <https://doi.org/10.1097/00005072-197404000-00008>

- Tellone, E., Galtieri, A., & Ficarra, S. (2019). Reviewing Biochemical Implications of Normal and Mutated Huntingtin in Huntington's Disease. *Current Medicinal Chemistry*, 27(31), 5137–5158. <https://doi.org/10.2174/0929867326666190621101909>
- Thöne, J., Ellrichmann, G., Seubert, S., Peruga, I., Lee, D. H., Conrad, R., Hayardeny, L., Comi, G., Wiese, S., Linker, R. A., & Gold, R. (2012). Modulation of autoimmune demyelination by laquinimod via induction of brain-derived neurotrophic factor. *American Journal of Pathology*, 180(1), 267–274. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.09.037>
- Thöne, J., & Linker, R. A. (2016). Laquinimod in the treatment of multiple sclerosis: A review of the data so far. *Drug Design, Development and Therapy*, 10, 1111–1118. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S55308>
- Turner, C., Cooper, J. M., & Schapira, A. H. V. (2007). Clinical correlates of mitochondrial function in Huntington's disease muscle. *Movement Disorders*, 22(12), 1715–1721. <https://doi.org/10.1002/MDS.21540>
- Van Raamsdonk, J. M., Hayden, M. R., & Leavitt, B. R. (2005). Experimental models of Huntington's disease. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 2(4), 291–297. <https://doi.org/10.1016/j.ddmod.2005.11.010>
- Vazey, E. M., Chen, K., Hughes, S. M., & Connor, B. (2006). Transplanted adult neural progenitor cells survive, differentiate and reduce motor function impairment in a rodent model of Huntington's disease. *Experimental Neurology*, 199(2), 384–396. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2006.01.034>
- Verma, M., Lizama, B. N., & Chu, C. T. (2022). Excitotoxicity, calcium and mitochondria: a triad in synaptic neurodegeneration. *Translational Neurodegeneration*, 11(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s40035-021-00278-7>
- Wang, Jie, Hu, W. W., Jiang, Z., & Feng, M. J. (2020). Advances in treatment of neurodegenerative diseases: Perspectives for combination of stem cells with neurotrophic factors. *World Journal of Stem Cells*, 12(5), 323–338. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v12.i5.323>

- Wang, Jinghong, 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. <https://doi.org/10.1074/jbc.M603503200>
- Wang, Y., Guo, X., Ye, K., Orth, M., & Gu, Z. (2021). Accelerated expansion of pathogenic mitochondrial DNA heteroplasmies in Huntington's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *118*(30). <https://doi.org/10.1073/pnas.2014610118>
- Wani, T. A., Masoodi, F. A., Gani, A., Baba, W. N., Rahmanian, N., Akhter, R., Wani, I. A., & Ahmad, M. (2018). Olive oil and its principal bioactive compound: Hydroxytyrosol – A review of the recent literature. *Trends in Food Science and Technology*, *77*(May), 77–90. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.05.001>
- Wilton, D. K., & Stevens, B. (2020). The contribution of glial cells to Huntington's disease pathogenesis. *Neurobiology of Disease*, *143*(May), 104963. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.104963>
- Yablonska, S., Ganesan, V., Ferrando, L. M., Kim, J. H., Pyzel, A., Baranova, O. V., Khattar, N. K., Larkin, T. M., Baranov, S. V., Chen, N., Strohlein, C. E., Stevens, D. A., Wang, X., Chang, Y. F., Schurdak, M. E., Carlisle, D. L., Minden, J. S., & Friedlander, R. M. (2019). Mutant huntingtin disrupts mitochondrial proteostasis by interacting with TIM23. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *116*(33), 16593–16602. <https://doi.org/10.1073/pnas.1904101116>
- Yang, J. S., Xu, L. Y., Xiao, B. G., Hedlund, G., & Link, H. (2004). Laquinimod (ABR-215062) suppresses the development of experimental autoimmune encephalomyelitis, modulates the Th1/Th2 balance and induces the Th3 cytokine TGF- β in Lewis rats. *Journal of Neuroimmunology*, *156*(1–2), 3–9. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2004.02.016>
- Yu, J. Z., Wang, J., Sheridan, S. D., Perlis, R. H., & Rasenick, M. M. (2021). N-3 polyunsaturated fatty acids promote astrocyte differentiation and neurotrophin

production independent of cAMP in patient-derived neural stem cells. *Molecular Psychiatry*, 26(9), 4605–4615. <https://doi.org/10.1038/s41380-020-0786-5>

Zhang, N., Fu, J. N., & Chou, T. C. (2016). Synergistic combination of microtubule targeting anticancer fludelsonone with cytoprotective panaxytriol derived from panax ginseng against MX-1 cells in vitro: Experimental design and data analysis using the combination index method. *American Journal of Cancer Research*, 6(1), 97–104.

Zheng, C., Geetha, T., & Babu, J. R. (2014). Failure of ubiquitin proteasome system: Risk for neurodegenerative diseases. In *Neurodegenerative Diseases* (Vol. 14, Issue 4, pp. 161–175). S. Karger AG. <https://doi.org/10.1159/000367694>

Zou, L. P., Abbas, N., Volkmann, I., Nennesmo, I., Levi, M., Wahren, B., Winblad, B., Hedlund, G., & Zhu, J. (2002). Suppression of experimental autoimmune neuritis by ABR-215062 is associated with altered Th1/Th2 balance and inhibited migration of inflammatory cells into the peripheral nerve tissue. *Neuropharmacology*, 42(5), 731–739. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(02\)00015-1](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(02)00015-1)