



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**

**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO
SOCIAL**



**FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS
“DR. IGNACIO CHÁVEZ”**

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN FARMACOLOGÍA BÁSICA

**EFFECTO NEUROPROTECTOR DE LA HIPERTERMIA SOBRE
EL ESTRÉS OXIDATIVO ASOCIADO A LA TOXICIDAD DEL
ACIDO 3-NITROPROPIÓNICO**

ALUMNO: Q.F.B. ISRAEL GUERRERO LINARES

DIRECTOR DE TESIS: DR. RAFAEL MEDINA NAVARRO

**COMITÉ TUTORIAL: DR. VICTOR MANUEL FARIAS RODRIGUEZ
DR. ALAIN RAYMUNDO RODRIGUEZ OROZCO
DR. JOSE ANGEL EURAN MONTEJO**

INDICE

INTRODUCCIÓN	3
MITOCONDRIA	5
ESTRÉS OXIDATIVO	10
ÁCIDO 3-NITROPROPIÓNICO	12
HIPERtermIA	18
HIPÓTESIS	22
JUSTIFICACIÓN	23
OBJETIVO GENERAL	24
OBJETIVOS PARTICULARES	24
MATERIAL Y MÉTODOS	25
<i>Animales de experimentación</i>	25
<i>Tratamiento térmico</i>	25
<i>Tratamiento con el ácido 3-Nitropropiónico</i>	26
<i>Evaluación del estrés oxidativo y sus efectos</i>	26
<i>Determinación electroquímica de catecolaminas</i>	28
<i>Determinación de las proteínas de choque térmico</i>	28
RESULTADOS	30
<i>Peroxidación de proteínas</i>	30
<i>Hidroxilación del salicilato</i>	34
<i>Determinación de catecolaminas</i>	35
<i>Determinación de la expresión de HSP70</i>	36
DISCUSIÓN	38
BIBLIOGRAFÍA	45

INTRODUCCIÓN

La hipertermia activa mecanismos de protección que podrían tener un beneficio terapéutico, en particular en aquellas enfermedades que comparten como factor común una falla crónica en el metabolismo energético (Karunanithi et al., 1999; Franklin et al., 2005; Neal et al., 2006).

El ácido 3-nitropropiónico (3-NP) es un inhibidor del complejo II de la cadena transportadora de electrones mitocondrial, que tiene la capacidad de inactivar irreversiblemente la enzima succinato deshidrogenasa (Coles et al., 1979). Al interrumpir el metabolismo energético, forma especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, además de una disminución de las concentraciones de ATP (Schulz et al., 1995), lo que conduce a la muerte celular. En este sentido, la administración crónica del ácido 3-NP produce lesiones en el cerebro confinadas al cuerpo estriado con pérdida de las proyecciones de las neuronas espinosas (Beal et al., 1993). Esta disfunción mitocondrial es un indicador de los cambios metabólicos que son comunes a muchas de las enfermedades neurodegenerativas. El uso del ácido 3-NP constituye un modelo adecuado para el estudio de estos cambios en donde la producción de energía juega un papel evidente en la patogénesis de este tipo de enfermedades (Brouiliet et al., 2005).

Una respuesta celular ante un estímulo que produce estrés, como la hipertermia, es la atenuación gradual de esa respuesta a través del fenómeno de adaptación. La adaptación involucra la activación de un mecanismo

protector que podrá incluir un aumento en la expresión o bien en la activación de moléculas de protección tales como las proteínas de choque térmico (HSP's). Se ha planteado la posibilidad de que parte del deterioro cognitivo que acompaña al daño a nivel cerebral característico de algunas enfermedades neurodegenerativas, pudiera estar asociado al agotamiento de las reservas de adaptación del cerebro (Heininger, 2000). Esta premisa plantea la posibilidad del uso de una terapia dirigida a restaurar los mecanismos de autodefensa. Por ejemplo, se sabe que la adaptación a la restricción calórica en modelos animales de la enfermedad de Alzheimer puede inducir la producción de las proteínas de choque térmico y de factores neurotróficos que son capaces de estimular la producción de enzimas antioxidantes de protección e incluso a su vez, son capaces de promover la neurogénesis (Mattson, et al., 2000; Mattson, et al., 2002). Bajo condiciones normales de temperatura, la concentración basal de las HSP's celular es baja. Sin embargo, el aumento de algunos grados en la temperatura basal incrementa la transcripción de los genes de choque térmico con la consiguiente sobreexpresión de los mismos. La unión de las HSP's tanto con proteínas en formación como con proteínas desnaturalizadas de la célula, protege la función de esas proteínas celulares y asegura en su momento el correcto ensamblaje y reciclamiento de las mismas. El estrés previo asegura un efecto protector sobre el estrés subsiguiente y más severo (Latchman, 2001).

MITOCONDRIA

La mitocondria es un orgánulo celular que está presente en todos los organismos eucariotas. La principal función de la mitocondria es mantener la respiración aeróbica y proveer energía a la célula -en forma de trifosfato de adenosina (ATP)- para las rutas metabólicas de la misma. La mitocondria tiene una participación fundamental en diferentes vías de señalización celular, particularmente en la vía de la muerte celular programada o apoptosis. Además, en la mitocondria también se llevan a cabo procesos metabólicos que incluyen el ciclo de Krebs, la β -oxidación de los ácidos grasos, la síntesis de lípidos y de colesterol (Mathews y van Holde, 1998; Schapira, 2006).

Cada mitocondria posee de 10 a 15 copias de un fragmento de ácido desoxirribonucleico mitocondrial (mtDNA). El mtDNA está formado por 16,596 pares de bases. Éste mtDNA codifica 13 polipéptidos, 22 fragmentos de ácido ribonucleico (RNA) de transferencia (tRNA) y 2 fragmentos de RNA ribosomales (rRNA) que codifican proteínas esenciales para el transporte de electrones y para la generación de ATP y; por consecuencia contribuyen a la fisiología celular normal (Anderson et al., 1981; Mathews y van Holde, 1998).

La mitocondria está formada por cuatro compartimentos principales: la membrana externa, la membrana interna, el espacio intermembrana y la matriz mitocondrial (Tabla 1) (Lehninger, 1965; Tzagoloff, 1982).

Tabla 1. Propiedades de los diferentes compartimientos de la mitocondria

(Tomado de: Hicks-Gómez, 2006)

	Composición	Características	Sistemas enzimáticos
Membrana externa	Alto contenido de colesterol 60% de proteínas 40% de lípidos Alta concentración de porinas	Permeable para iones y moléculas pequeñas	NADH-citocromo c reductasa Acil-CoA sintetasa Nucleósido difosfato cinasa Monoamino oxidasa
Espacio intermembranal		Sustratos metabólicos que difunden al interior de la mitocondria	Cinureína oxidasa Colina fosfotransferasa Adenilato cinasa Sulfito oxidasa
Membrana interna	80% de proteínas 20% de lípidos Alta en cardiolipina	ATP Iones Impermeable para la mayoría de los iones, incluso H ⁺	NADH deshidrogenasa Succinato deshidrogenasa Fe-sulfoproteínas Cit <i>c</i> , <i>b</i> , <i>c</i> ₁ y <i>a</i> - <i>a</i> ₃ FOF1-ATPasa Pi-OH translocasa Dicarboxilato translocasa Tricarboxilato translocasa β-oxidación de ácidos grasos
Matriz		Contiene mtDNA Enzimas para su transcripción Ribosomas, ATP, ADP, Pi, Mg ²⁺ , Ca ²⁺ , K ⁺	Complejo piruvato deshidrogenasa Ciclo de Krebs β-oxidación de ácidos grasos Glutamato deshidrogenada Ornitina transcarbamilasa

La membrana interna está plegada y forma crestas que se proyectan hacia el interior de la mitocondria. En ésta, se encuentran embebidas las proteínas transportadoras, principalmente citocromos, que forman la cadena respiratoria. Dichas proteínas transportadoras se ensamblan en cinco complejos multiproteicos: I (NADH deshidrogenasa), II (succinato deshidrogenasa), III (complejo citocromo *bc*), IV (citocromo *c* oxidasa) y V (ATP sintetasa) (Mathews y van Holde, 1998) (Fig. 1).

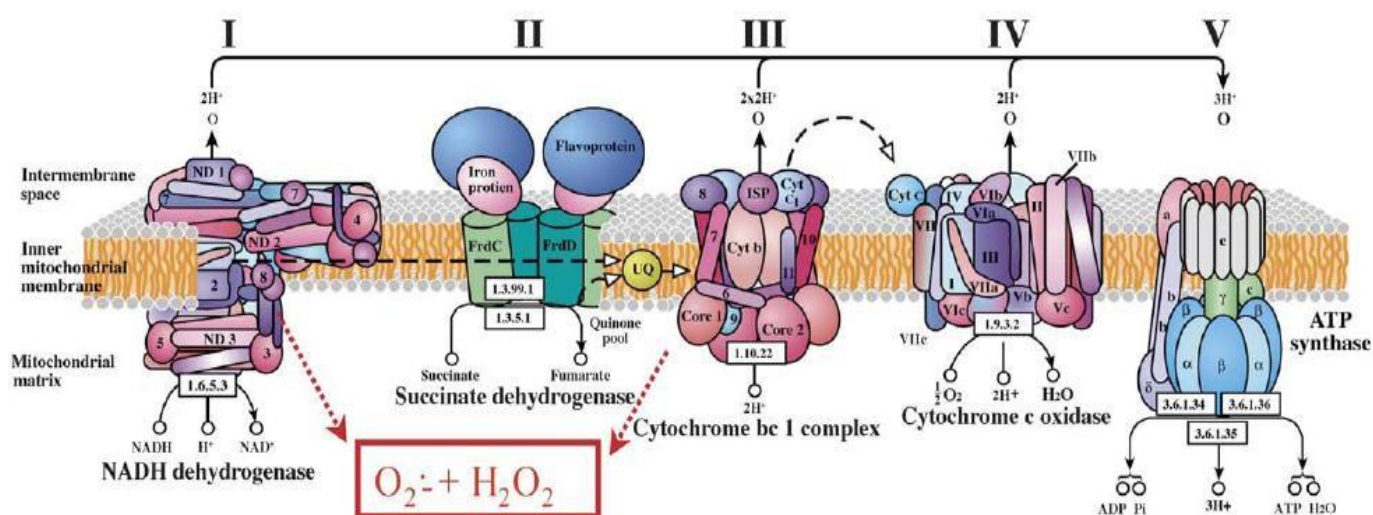


Fig. 1. Complejos multiproteicos que forman la cadena transportadora de electrones (Tomado de: Van Houten et al., 2006).

El complejo I es una flavoproteína grande y compleja que tiene más de 25 cadenas polipeptídicas, se encuentra embebido en la membrana interna de la mitocondria. El complejo I cataliza la reacción de reducción de la ubiquinona (UQ) a ubiquinol (UQH₂), al aceptar un ion hidruro (dos electrones y un protón) proveniente del NADH, que a su vez lo transfiere a su grupo prostético FMN (mononucleótido de flavina). El complejo también tiene entre cinco y ocho centros Fe-S, a través de los cuales pasan los electrones del FMN a la UQ (Hicks-Gómez, 2006).

El complejo II (succinato-ubiquinona reductasa) también cataliza la reducción del UQ a UQH₂. En este caso el donador de electrones es el succinato, un intermediario del ciclo del ácido cítrico. Este complejo es más simple y pequeño que el complejo I. La succinato-ubiquinona reductasa contiene cuatro polipéptidos que contienen los centros catalíticos de la succinato deshidrogenasa. La succinato deshidrogenasa es la enzima que

oxida el succinato a fumarato en el ciclo del ácido cítrico y que tiene como grupos prostéticos FAD (flavin adenin dinucleótido) y un centro de fierro y azufre (Fe-S) con cuatro átomos de fierro. Las subunidades pequeñas son ferrosulfoproteínas, con un total de tres centros Fe-S, en los que se recibe a los electrones del FAD que se les transfiere a la UQ (Hicks-Gómez, 2006).

En el complejo III se denomina ubiquinol-citocromo c reductasa o complejo del citocromo bc_1 . Esta reductasa es un oligómero de al menos ocho proteínas diferentes, incluyendo los citocromos b_{562} , b_{566} y c_1 , además de una ferrosulfoproteína. Estas proteínas se encuentran ubicadas de modo asimétrico en la membrana interna de la mitocondria; el citocromo b atraviesa por completo la membrana, y tanto el citocromo c_1 como la ferrosulfoproteína se encuentra en la superficie externa. El contacto entre los dos acarreadores de electrones (la ubiquinona y el acarreador monoelectrónico [citocromos b_{562} , b_{566} c_1 y c]) se realiza por una serie de reacciones, denominada ciclo Q. El UQH_2 se oxida a UQ y el citocromo c se reduce. Este complejo funciona como una bomba de protones. Debido a la orientación asimétrica del complejo, los protones producidos cuando el UQH_2 se oxida a UQ se liberan al espacio intermembranoso, lo que genera una diferencia en la concentración de protones del interior y el exterior de la mitocondria (gradiente transmembrana de protones) (Hicks-Gómez, 2006).

La citocromo c oxidasa atraviesa la membrana mitocondrial interna, cataliza la reducción del O_2 por cuatro electrones y, como consecuencia se

forma agua. Además bombea dos protones al espacio intermembranoso. Este complejo está constituido por los citocromos a y a_3 , que consisten en dos grupos hem unidos a diferentes regiones de la misma molécula, pero desde el punto de vista espectroscópico y funcional son distintos. El citocromo c oxidasa también contiene dos iones de cobre, Cu_A y Cu_B , que son fundamentales en la transferencia de electrones de oxígeno. Este complejo transfiere cuatro electrones al oxígeno (O_2), sin generar intermediarios reducidos de manera incompleta, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o los radicales libres hidroxilo ($OH\cdot$), que son muy reactivos y pueden dañar estructuras celulares (Hicks-Gómez, 2006).

La ATP sintasa es la enzima que permite la síntesis de adenosin trifosfato (ATP) a partir de adenosin difosfato (ADP) en la mitocondria; esta enzima es la estructura más compleja de la membrana mitocondrial interna. Está constituida por dos subunidades funcionales: la F_0 , que es una proteína liposoluble transmembrana compuesta por 10 o 12 subunidades y contiene un canal para la translocación de protones; y F_1 , que es una proteína hidrosoluble ubicada en la periferia de la membrana, formada por cinco tipos de subunidades y fácilmente dissociable de F_0 por medio de urea. La F_1 solubilizada puede hidrolizar el ATP, pero no sintetizarlo, de ahí su nombre de ATPasa (Hicks-Gómez, 2006).

ESTRÉS OXIDATIVO

El metabolismo oxidativo continuamente genera especies de O_2 parcialmente reducido, que son más reactivas y, por tanto, más tóxicas que el mismo O_2 . La reducción de un electrón del O_2 produce un ion superóxido (O_2^-); la de un electrón adicional produce H_2O_2 y; un tercer electrón separa el oxígeno en un radical $OH\cdot$ (Mathews, 1998). La producción de los radicales superóxido ocurre principalmente en dos puntos de la cadena transportadora de electrones, en el complejo I y en el complejo III (Finkel y Holbrook, 2000).

Por otro lado, la producción de especies reactivas de oxígeno puede interrumpir a los transportadores de glutamato en la membrana de los astrocitos y neuronas (Trotti et al., 1998). Los transportadores de glutamato se encuentran concentrados a través de la membrana neuronal (Zerangue y Kavanaugh, 1996). La función de éstos transportadores es mantener baja la concentración extracelular del glutamato y como consecuencia, ayudar a proteger a las neuronas de la sobreestimulación excitatoria producida por la acción de éste neurotransmisor. La exposición excesiva a glutamato resulta tóxica para las neuronas, probablemente por potenciar la entrada masiva de calcio (Ca^{2+}) a la célula (Lipton y Roseberg, 1994). Los efectos mediados por el Ca^{2+} sobre la activación del receptor pueden involucrar varias rutas que causan estrés oxidativo promoviendo un círculo vicioso. La estimulación de la fosfolipasa A2 mediada por el receptor a glutamato el N-metil-D-aspartato (NMDA), activa la cascada del ácido araquidónico lo cual desencadena la producción de radicales libres (Dumuis et al., 1988).

Por otra parte, la elevada concentración de Ca^{2+} intraneuronal activa las peptidasas, tales como la calpaina I, la cual puede catalizar la conversión enzimática de la xantina deshidrogenasa a xantina oxidasa (Moldoveanu et al., 2002). Dicha conversión conduce a la generación de O_2^- e induce la formación de óxido nítrico por la sintasa del óxido nítrico. Las especies reactivas de oxígeno producidas constantemente en condiciones normales son atrapadas por diferentes enzimas tales como la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa (GSHPx) y por la catalasa. Otras moléculas antioxidantes pequeñas como el glutatión, el ácido ascórbico y el α -tocoferol también participan en la detoxificación de los radicales libres. Estas defensas antioxidantes endógenas son superadas cuando hay sobreproducción de radicales libres por la participación de las enzimas prooxidantes citosólicas, lo que produce la inactivación de los sistemas de detoxificación y la falla en el adecuado recambio de los antioxidantes (Oliver et al., 1990).

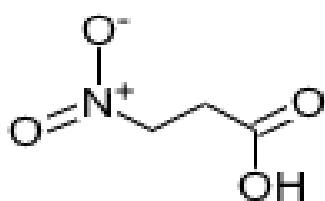
Las especies reactivas de oxígeno alteran la fisiología y la integridad celular por actuar en sitios blanco tales como las proteínas, el DNA y las membranas celulares (Davies y Delsignore, 1987). Así, la disfunción celular y mitocondrial puede conducir a alteraciones graves en la función fisiológica del individuo. Las enfermedades mitocondriales humanas incluyen las mutaciones del mtDNA y DNA nuclear, así como los defectos inducidos por toxinas (Grollman y Moryia, 1993; Purgan et al., 1994; Schapira, 2006). La disfunción mitocondrial, la excitotoxicidad y el estrés oxidativo son procesos que están interactuando en las enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad

de Huntington, la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer. Se sabe que la producción de energía juega un papel evidente en la patogénesis de este tipo de enfermedades (Albin y Greenamyre, 1992; Beal, 1992; Beal, 2000).

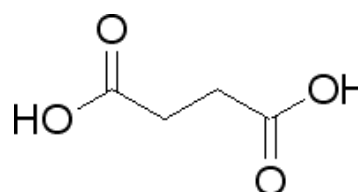
ÁCIDO 3-NITROPROPIÓNICO

El ácido 3-nitropropionico (3-NP) es una toxina mitocondrial, que inhibe de manera irreversible la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa (SDH), una enzima que participa tanto el ciclo de Krebs como en el complejo II y III de la cadena transportadora de electrones. Esto produce un daño en el metabolismo energético, formando especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, además de la disminución de las concentraciones de ATP (Beal et al., 1993; Brouillet et al., 1995).

La SDH cataliza la oxidación de succinato a fumarato. El mecanismo bioquímico de la inhibición de la SDH por el ácido 3-NP aun no ha sido probado, pero la similitud entre las estructuras del 3NP ($C_3H_5NO_4$) y el ácido succínico ($C_4H_6O_4$) puede ser la clave en la potencia del 3NP (Schapira, 2006; Browne y Beal, 2002) (Fig. 2).



Ácido 3-Nitropropiónico



Ácido Succínico

Fig. 2. Estructura química del 3-NP y del ácido succínico (Tomado de www.sigma-aldrich.com)

Actualmente hay dos teorías sobre el mecanismo de acción del ácido 3-NP que predominan. Una hipótesis propone que la forma dianion del ácido 3-NP puede generar carbaniones que preferencialmente reaccionan con la fracción flavin de la SDH formando un aducto que altera el sustrato específico de la enzima (Alston et al., 1977). Alternativamente, la otra teoría sugiere que el sustrato se une al sitio de la SDH que es el mismo sitio blanco para el ácido 3-NP. Se ha demostrado que la forma dianion del ácido 3-NP puede unirse a la SDH, formando nitroacrilato. Este grupo acrilato puede reaccionar con el grupo tiol de la SDH y unirse irreversiblemente a este grupo para bloquear el acceso del succinato a la enzima (Coles et al., 1979).

El efecto inhibitor del ácido 3-NP

en la mayoría de las regiones cerebrales es similar a excepción del cuerpo estriado en donde el efecto del ácido 3-NP es más acentuado. Existen diversos mecanismos de degeneración estriatal inducida por el ácido 3-NP (Fig. 3). La

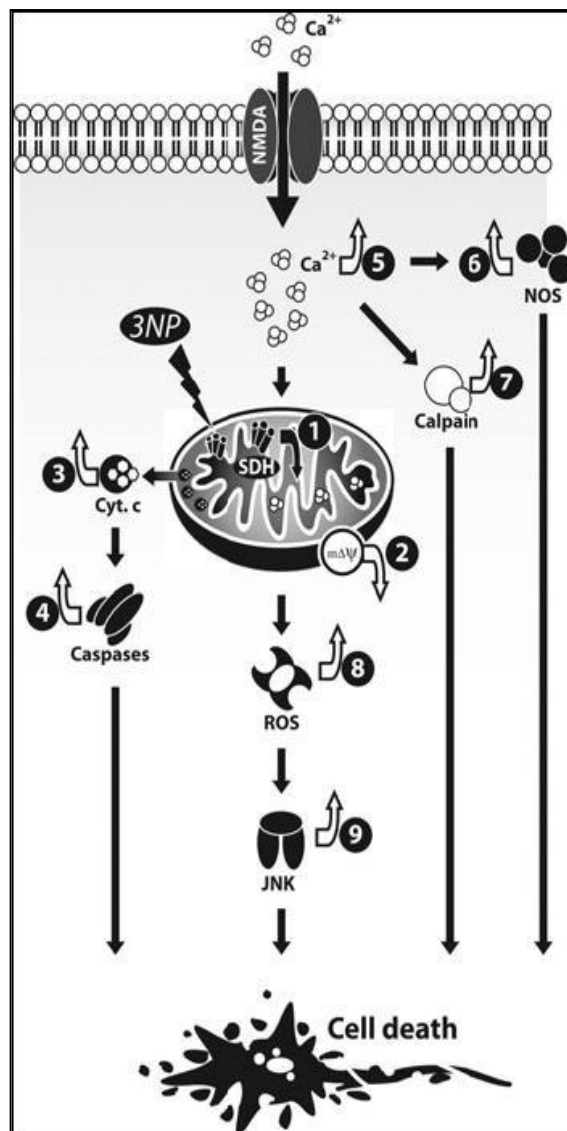


Fig. 3. Representación esquemática de los mecanismos de degeneración estriatal inducida por el 3-NP. 1) Inhibición de la succinato deshidrogenasa. 2) Decremento del potencial de membrana mitocondrial. 3) Liberación de Cit-c. 4) Activación de las caspasas. 5) Incremento del Ca^{2+} intracelular. 6) Incremento de las especies reactivas de nitrógeno. 7) Activación de la calpaína. 8) Producción masiva de ROS. 9) Activación de JNK. (Tomado de: Brouillet et al., 2005).

degeneración preferencial del estriado no está relacionada con la distribución de esta neurotoxina hacia las estructuras cerebrales. El deterioro del estriado ocurre cuando se obtiene una inhibición del 50 al 60% de la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa (Alexi et al., 1998; Brouillet et al., 1998; Blum et al., 2002; Bizat et al., 2003). Sin embargo, a concentraciones bajas de 3NP se producen cambios funcionales sin neurodegeneración y la progresiva inhibición de la succinato deshidrogenasa activa varias rutas bioquímicas involucradas en la muerte y supervivencia celular. Existen reportes que sugieren que al 35% de inhibición del complejo II, se presenta una relocalización del citocromo *c*, lo cual está probablemente asociado con la pérdida del potencial de membrana mitocondrial (Bizat et al., 2003; Leventhal et al., 2000). Además de la inducción de la liberación de factores mitocondriales apoptogénicos (citocromo *c* y Smac/Diablo) que es precedida por la relocalización de los miembros de la familia Bcl-2 proapoptótica hacia la membrana mitocondrial (Galas et al., 2004).

Otro cambio importante producido por el tratamiento ácido 3-NP es la producción anormal de especies reactivas de oxígeno (ROS), tales como radicales hidroxilo y anión superóxido, así como moléculas altamente reactivas derivadas de la formación de óxido nítrico (NO) (La Fontaine et al., 2000a; Schulz et al., 1995; Bogdanov et al., 1998). El aumento en la producción de ROS y NO probablemente tiene un papel importante en la degeneración estriatal inducida por el ácido 3-NP. Dicha participación se ha visto abatida cuando se administran sustancias con efecto neuroprotector tales como

atrapadores de radicales libres y/o antioxidantes, así como de inhibidores de la oxido nítrico sintasa (NOS) (Shultz et al., 1995; Shultz et al., 1996; La Fontaine et al., 2000a). Se ha reportado que los últimos eventos de la muerte celular inducida por el ácido 3-NP es la activación de la proteasas particularmente la caspasa-3 (Duan et al., 2000; Kim et al., 2000; Almeida et al., 2004; Ruan et al., 2004); aunque, hay otros reportes que sugieren que la inhibición del complejo II no dispara la activación de la caspasa-3 (Bizat et al., 2003; Galas et al., 2004). Sin embargo, la administración sistémica de un inhibidor de las caspasas presenta efecto neuroprotector en un modelo crónico con el ácido 3-NP (Yang et al., 2004). Por lo tanto, la pregunta de si las caspasas tienen un papel importante en la degeneración estriatal inducida por el tratamiento crónico del ácido 3-NP es todavía materia de debate.

Reportes recientes han demostrado que un factor importante de la degeneración estriatal inducida por el ácido 3-NP es la calpaina. En el estriado de la rata, la activación de la calpaina ha sido estudiada en tratamientos agudos y crónicos del ácido 3-NP (Bizat et al., 2003). No se ha observado activación de la calpaina en la corteza cerebral ni en otras regiones donde no se produce daño por el ácido 3-NP, a pesar de que los niveles de inhibición del complejo II, son similares a los encontrados en el estriado (Galas et al., 2004). Lo anterior sugiere un fenómeno autonómico celular diferencial que puede controlar la activación de la calpaina en dos poblaciones de neuronas. La activación de la calpaina, es probablemente el mecanismo por el cual el ácido 3-NP produce degeneración estriatal. De hecho, existe evidencia de que los

inhibidores de la calpaina ejercen acción neuroprotectora (Bizat et al., 2003; Bizat et al., 2005). Aunque la calpaina parece tener una participación importante en la toxicidad inducida por el ácido 3-NP, existen otros mecanismos que también contribuyen a la degeneración estriatal. Por ejemplo, la activación de las vías de c-Jun N-Terminal quinasa (JNK) y c-jun que actúan en las neuronas GABAérgicas de proyección en el estriado de ratas tratadas con 3NP (García et al., 2002).

Un gran número de estudios sugieren que la inervación glutamatérgica tiene un papel clave en la degeneración estriatal producida por la administración sistémica del ácido 3-NP. En este sentido, bajas concentraciones del ácido 3-NP previenen selectivamente el almacenamiento vesicular de glutamato (Tavares et al., 2001). Además, la inhibición de la recaptura del glutamato incrementa la toxicidad del ácido 3-NP (Storgaard et al., 2000) y hace susceptible a las neuronas estriatales a dosis subletales de la toxina (García y Massieu 2003). Sin embargo, no hay evidencia directa de que el ácido 3-NP requiera concentraciones extracelulares de glutamato para ejercer su acción neurotóxica, por lo que se considera que tienen mecanismos diferentes (Brouillet et al., 2005).

Al igual que el glutamato, la dopamina contribuye en la toxicidad estriatal inducida por el ácido 3-NP (Figura 4). Aunque no está claro si el ácido 3-NP produce la liberación de dopamina en el estriado. Algunos estudios sugieren que hay un aumento en las concentraciones extracelulares de dopamina

después del tratamiento del ácido 3-NP (Nishino et al., 1997). La toxina actúa a nivel de los transportadores de dopamina como un inhibidor no competitivo (Maragos et al., 2002). De la misma manera que el glutamato, la presencia de la dopamina potencia la toxicidad del ácido 3-NP, como otra prueba de su implicación, la dopamina es requerida para que se lleve a cabo la excitación sináptica mediada por NMDA inducida por el ácido 3-NP de las neuronas espinosas del estriado (Calabresi et al., 2001). Este efecto de potenciación de la dopamina, debe ocurrir en una etapa temprana del proceso degenerativo, debido a que la lesión inducida por el ácido 3-NP afecta la inervación nigro-estriatal (Reynolds et al., 1998; Blum et al., 2004). La producción de especies reactivas de oxígeno asociado con el metabolismo de la dopamina puede contribuir a la neurotoxicidad inducida por el ácido 3-NP (Johnson et al., 2000; Jakel y Maragos, 2000).

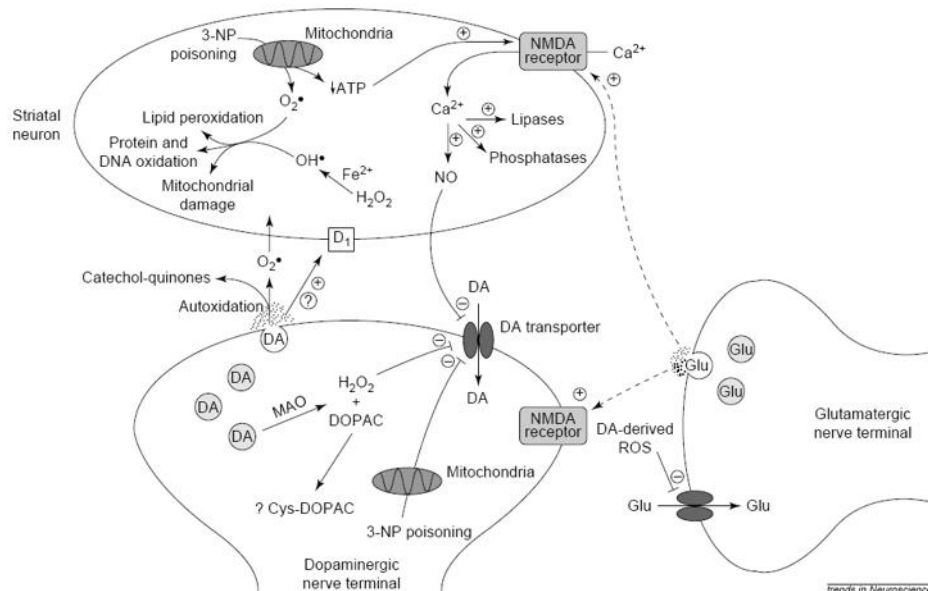


Fig. 4. Posible interacción entre el deterioro mitocondrial y la función de la dopamina. En las neuronas estriatales, el envenenamiento por el 3NP reduce la concentración de ATP en la célula, lo cual resulta en una activación indirecta de los receptores NMDA. El subsecuente incremento del calcio intracelular activa lipasas y fosfatasas y se estimula la producción de NO. El aumento en las concentraciones de calcio intracelular es amortiguado por la mitocondria, lo cual lleva a desacoplar la cadena respiratoria y la producción de ROS. En la adyacente terminal dopaminérgica, el transportador de dopamina es inhibido por la disminución de las concentraciones de ATP, que resulta en el deterioro de la función mitocondrial, las ROS y NO derivados de la dopamina, contribuyen al aumento de las concentraciones de dopamina. Las ROS alteran la recaptura de glutamato, lo cual lleva a la activación de los receptores NMDA en las neuronas estriatales (estimulando las vías excitotóxicas), todos estos factores pueden contribuir a llevar a la muerte celular. (Modificado de Jakel y Maragos, 2000).

HIPERTERMIA

La hipertermia se considera un aumento en la temperatura corporal por encima del punto establecido por el hipotálamo y clínicamente resulta cuando hay falla en la termorregulación, mientras que la elevación resultante de respuestas homeostáticas es categorizada como fiebre o pirexia (Simon, 1993). La hipertermia se produce en respuesta a causas externas directas (incendios, quemaduras) o medio ambiente caluroso, además de algunas drogas adictivas que causan la activación metabólica junto con la disminución de la disipación de calor a partir de la vasoconstricción periférica (cocaína y metanfetamina)

(Cremer y Kalkman, 2007). Alternativamente, la hipertermia puede ser inducida deliberadamente para el tratamiento de algunas enfermedades, u ocurrir accidentalmente durante el recalentamiento después del bypass cardiopulmonar hipotérmico o el tratamiento de la hipotermia accidental (Robins et al., 1989; Bissonnette et al., 2000; van der Zee, 2002). Comparado con la fiebre espontánea, el aumento de la temperatura corporal durante la hipertermia deliberada o accidental es relativamente rápida y breve (Cremer y Kalkman, 2007).

El estrés por calor, representa el malestar después de ejercitarse o el trabajo diario por largos periodos de tiempo en un medio ambiente con temperatura elevada (temperatura del aire > 32 °C) (Anderson et al., 1983; Knochel y Reed, 1994; Bouchama y Knochel, 2002). El “golpe de calor” representa enfermedad por calor cuando la hipertermia excede >40°C. Lo que se encuentra asociado con anormalidades en el Sistema Nervioso Central (SNC), por ejemplo: delirio, convulsiones o coma (Malamud et al., 1946; Sterner, 1990; Knochel y Reed, 1994; Bouchama y Knochel, 2002). Reportes post-mortem de victimas de “golpe de calor” sugiere que el SNC es uno de los órganos más vulnerables (Gauss y Meyer, 1917; Alpers, 1936; Malamud et al., 1946; Austin y Berry, 1956). Esto debido a la respuesta inflamatoria sistémica inducida por la hipertermia, además de producir una disfunción multiorgano que esta predominada por una encefalopatía severa (Knochel y Reed, 1994; Bouchama y Knochel, 2002). El tratamiento de tumores en el cerebro u otras partes del cuerpo es comúnmente conocido como “hipertermia terapéutica”.

Aunque, esta también asociada con severas reacciones adversas en el SNC (Hahn, 1982; Hoopes, 1991; Ryan et al., 1991). Esta terapia, induce relativamente un rápido aumento de la temperatura corporal comparado con el medio ambiente caluroso o “el golpe de calor” (Bouchama y Knochel, 2002), y esto es usado para destruir tumores en pacientes con cáncer (Hahn, 1982; Hoopes, 1991; Ryan et al., 1991).

El grado de daño celular depende tanto de la duración como de la intensidad del estrés por calor. Sobre un rango de temperatura (42°C a 50°C) el grado de daño celular se aumenta con la duración de la hipertermia de manera logarítmica en muchos tipos de células (Harmon et al., 1990). Una exposición de 1.5-2 h a 43°C es requerida para que mueran las neuronas en cultivo. La hipertermia ha mostrado que produce muerte en neuronas corticales (Vogel et al., 1997), neuronas cerebelares (Lowenstein et al., 1991), en neuronas de la raíz dorsal ganglionar (Uney et al., 1993).

Por otro lado, dado que la mayoría de los procesos que gobiernan la actividad neural son dependientes de temperatura, los cambios en la temperatura cerebral no solo se ven reflejados en la actividad neural metabólica. Por ejemplo, la recaptura de la dopamina se duplica cuando se aumenta la temperatura 3°C (Xie et al., 2000). La temperatura aumenta la actividad de los canales iónicos (particularmente Na⁺ y Ca⁺⁺; Rosen, 1996,2001), un aumento en la recaptura debe ser compensada con un aumento en la liberación de la dopamina. Debido a este aumento en la

liberación y la recaptura, pareciera que la hipertermia hace más eficiente la neurotransmisión y por lo tanto, más efectivas las funciones neurológicas (Kiyatkin, 2007).

En este mismo sentido, como respuesta a la hipertermia el cerebro responde con la rápida inducción de Hsp70 (Brown y Sharp, 1999). Hay evidencia que las neuronas que producen HSP en respuesta a una variedad de estresores ambientales, resultan en protección para el subsecuente daño letal (Ritosa et al., 1962; Subject et al., 1986; Welch et al., 1986; Welch et al., 1992; Sato et al., 1999). Reportes previos indican que la Hsp70 podría proteger a las neuronas del cuerpo estriado de la muerte causada por disfunción mitocondrial inducida por la administración de malonato y el ácido 3-NP (Dedeoglu et al., 2002). Se ha reportado que la inducción de las proteínas del estrés (Hsp70) puede proteger a las células del daño oxidativo producido por la administración de H₂O₂ en cultivo celular (Polla et al., 1996). En este mismo sentido, la privación de glucosa o la exposición al H₂O₂ está asociada con un aumento de los niveles de glutatión, lo que sugiere que las Hsp70 pueden proteger a las células a través de un mecanismo antioxidante que conduce a la mejor estabilidad de los antioxidantes endógenos (Xu y Giffard, 1997). Por otro lado, el aumento del Ca²⁺ intracelular a niveles tóxicos debido a estímulos estresantes, conduce a la activación de varias proteasas y endonucleasas que favorecen la muerte celular. Tal aumento de Ca²⁺ intracelular es atenuado por la Hsp70 al reducir el flujo de Ca²⁺ a través de un proceso de desensibilización sobre sistemas tales como el de intercambio de Na⁺-Ca²⁺ (Kiang y Tsokos, 1998).

HIPÓTESIS

La hipertermia disminuye el daño producido en el estriado por el estrés oxidativo inducido por el ácido 3-nitropropiónico.

JUSTIFICACIÓN

La función cerebral puede verse afectada de múltiples formas que pueden involucrar factores físicos, ambientales y genéticos, que contribuyen al desbalance de los procesos de daño y reparación cerebral. Algunos de los mecanismos involucrados en el daño neuronal son desencadenados por el estrés oxidativo. Una estrategia de tratamiento factible para revertir o neutralizar este fenómeno, es a través del refuerzo de las reservas de adaptación en el cerebro que movilicen los mecanismos de auto-defensa. Se ha establecido que la sobreexpresión de algunos factores de protección claves en los procesos neurodegenerativos, se logra elevando la temperatura corporal durante un periodo corto.

Una herramienta útil en el estudio de estos mecanismos es un modelo probado de daño neuronal degenerativo del cerebro de animales de experimentación. El ácido 3-nitropropiónico es un agente neurotóxico, que permite estudiar algunos de los aspectos de las enfermedades neurodegenerativas, principalmente el daño producido por los radicales libres, que se encuentra asociado a muchas de estas enfermedades. En este sentido es importante conocer los mecanismos de producción de estos radicales en las etapas tempranas del envenenamiento del ácido 3-nitropropiónico. Esto permitiría implementar tratamientos que contrarresten dichos efectos; la hipertermia puede ser una terapia que permita ayudar a tratar las enfermedades neurodegenerativas.

OBJETIVO GENERAL

Establecer si la hipertermia protege al cuerpo estriado del efecto neurotóxico del ácido 3-NP.

OBJETIVOS PARTICULARES

Luego de la administración sistémica de ácido 3-NP:

1. Determinar si la hipertermia modifica la concentración de dopamina y sus metabolitos.
2. Determinar si el tratamiento térmico influye sobre la formación de grupos carbonilos en corteza, cerebelo y estriado.
3. Determinar si la hipertermia altera la producción de radical hidroxilo.
4. Determinación de la expresión de HSP70.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales de Experimentación

Se utilizaron ratas de la cepa Sprague-Dawley de 350 g de peso. Los animales fueron dispuestos en 4 grupos de estudio de 6 animales cada uno:

CTRL: Ratas control sometidas a isoterminia y sin tratamiento

3NP: Ratas control sometidas a isoterminia y tratadas con el ácido 3-NP

HT: Ratas sometidas a hipertermia sin tratamiento

3NP + HT: Ratas sometidas a hipertermia y tratadas con ácido 3-NP

Tratamiento térmico en las ratas

Ratas Sprague-Dawley (350 g) fueron colocadas en una incubadora por 45 minutos a 43°C. La temperatura rectal de los animales se monitoreo para mantenerla en $42 \pm 0.2^\circ\text{C}$ en el caso de los grupos HT y 3NP + HP. Los animales fueron retirados de la incubadora y se les permitió que se recuperaran en sus jaulas de mantenimiento a temperatura ambiente por espacio de 16 horas. Este periodo es en el cual se ha reportado que existe el pico máximo de expresión de las proteínas de choque térmico (Yang, et al., 1999). Al cabo de este periodo los grupos asignados para los experimentos con ácido 3-NP comenzaron el tratamiento descrito más adelante. Los procedimientos se hicieron siguiendo los lineamientos aprobados por el Comité de Kyoto para el manejo y tratamiento de animales de experimentación.

Tratamiento con el ácido 3-Nitropropiónico

El ácido 3-NP fue disuelto en solución salina 0.9% y su pH ajustado a 7.4. Luego del tratamiento de hipertermia cada una de las ratas de experimentación asignadas a los grupos 3NP y 3NP + HP, recibió una dosis de 20 mg/Kg de ácido 3-NP vía intraperitoneal cada 12 horas (3 dosis); los animales de los grupos CTRL y HT recibieron solo solución salina. Los animales tratados con el ácido 3-NP fueron sacrificados junto con los controles. Se procedió a la obtención del cerebro por craneotomía. Posteriormente y en frío, se realizó la disección del tejido cerebral en estudio (corteza, cerebelo y estriado). El tejido disecado fue colocado en amortiguador de homogenización (20 mM Tris·HCl, 100 mM KH₂PO₄, 5 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.25 M sucrosa, 2 mM ditioneitol, leupeptina 5 mM, pepstatina 2 mM, aprotinina 5 mM) (Beal et al., 1993).

Evaluación del estrés oxidativo y sus efectos

Peroxidación de proteínas. Para determinar el grado de oxidación de las proteínas se realizó la prueba colorimétrica para carbonilos como sigue: las muestras fueron homogenizadas mediante sonicación, en seguida se procedió a centrifugar las muestras a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C. Del sobrenadante, se tomó una alícuota (2 mg/mL) y se colocó en 500 µL de dinitrofenilhidrazina (DNPH) en ácido clorhídrico (HCl) 2 N. Los controles de la prueba se colocaron en 500 µL de HCl 2 N. Las mezclas anteriores fueron

incubadas por 45 minutos en la oscuridad, con mezclado ocasional. Una vez cumplido el tiempo se les adicionó 600 μ L de ácido tricloroacético al 20 % frío. Las muestras se incubaron durante 10 minutos a -30 °C. Se procedió a centrifugarlas por 10 minutos a 2500 rpm. El sobrenadante fue descartado y el precipitado se lavó 3 veces con una mezcla de etanol:acetato de etilo (1:1, v/v). Para solubilizar la proteína, se agregaron 500 μ L de guanidina 6 M a cada una de las muestras y se incubaron por toda la noche. Posteriormente, se mezclaron con vortex y se centrifugaron 10 minutos a 2500 rpm para descartar materiales insolubles. El sobrenadante de las muestras fue leído en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 375 nm (Alamdari et al., 2005).

Determinación indirecta del radical hidroxilo. Se utilizaron 6 ratas macho de la cepa Sprague-Dawley de 350g de peso. Se formaron 5 grupos, de los cuales se hizo lo siguiente: a un grupo blanco, solo se le administró solución salina; el grupo control recibió solo salicilato de sodio (200 mg/Kg); otro grupo se les administró 3 dosis del ácido 3-NP (20 mg/Kg), una cada 12 horas. Dos horas después de la última dosis, se les administró una inyección intraperitoneal de salicilato de sodio (200 mg/Kg). Otro grupo recibió el mismo tratamiento pero previamente había sido sometido a hipertermia. Por último un grupo que recibió tratamiento térmico que se administro la misma concentración de salicilato de sodio. Los animales fueron sacrificados por decapitación una hora después. El núcleo estriado fue aislado y colocado en ácido perclórico 0.1 M. Las muestras fueron sonicadas y se centrifugaron a 10000 rpm por 10 minutos. Alícuotas del sobrenadante fueron analizadas con

el uso de HPLC con detección electroquímica. Los ácidos 2,3 y 2,5-dihidroxibenzóico (DHBA) fueron detectados utilizando un potencial de la celda de 480 mV (Beal et al., 1990).

Determinación electroquímica de catecolaminas. Después de la última dosis de 3NP, los animales fueron sacrificados por decapitación, se realizó la craneotomía para hacer la disección del estriado, la corteza y el cerebelo. Una vez obtenido el tejido se coloca en ácido perclórico 0.1 M y después las muestras fueron sonicadas y centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos; los sobrenadantes fueron separados y filtrados. Para la determinación de catecolaminas se utilizó un método de cromatografía líquida con detección electroquímica y utilizando un potencial de la celda de 440 mV (Hy-Ref) (Reader y Grandin, 1987; Ase et al., 1999).

Determinación de las proteínas de choque térmico. Se tomaron alícuotas (25 µg de proteína) de las muestras de los animales con hipertermia y de los animales controles las cuales fueron calentadas a 95°C por 3 minutos en igual volumen de amortiguador de solubilización (Tris Base 0.5M pH 6.8, Glicerol 20%, SDS 4%, 2-mercaptoetanol 0.2%, azul de bromofenol 0.001%). Las proteínas fueron sometidas a electroforesis en un gel de poliacrilamida-SDS al 9%. La transferencia de las proteínas del gel a la membrana de nitrocelulosa se llevo a cabo durante una hora y media usando el siguiente amortiguador de transferencia (Tris Base 25 mM, Glicina 0.19 M, metanol 20%, pH de 8.3) y a 350 mA. La membrana de nitrocelulosa fueron lavadas con amortiguador TTBS

(Tris Cl 100 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0.1%, pH 7.5) y colocadas en solución de bloqueo (caseína 2% en TTBS) por 1 hora. La membrana se incubó con el anticuerpo monoclonal anti-HSP70 (SIGMA H5147) usando una dilución de 1:5000 en TTBS por espacio de 1h y posteriormente lavadas 3 veces con TTBS e incubadas por dos horas con el anticuerpo anti-ratón IgA peroxidasa (SIGMA A4789), utilizando una dilución 1:5000 en TTBS. Finalmente se visualizo utilizando 3,3',5,5'-tetrametilbencidina como agente cromogénico (Belay y Brown, 2003).

RESULTADOS

PEROXIDACION DE PROTEINAS. Como prueba de la peroxidación de proteínas, se realizó la determinación e grupos carbonilos en cerebelo, corteza y estriado. Se encontró que, en el caso del cerebelo (Figura 5) no hay diferencias significativas entre los grupos que recibieron tratamiento con el ácido 3-nitropropiónico (3-NP). En el caso de la corteza, (Figura 6) se presentó un incremento moderado en la formación de carbonilos en el grupo que recibió el ácido 3-NP. En estriado se presentó la mayor evidencia de estrés por carbonilos en el grupo que recibió el ácido 3-NP (Figura 7). En todos los casos los resultados se reportan en nmol/mg de tejido.

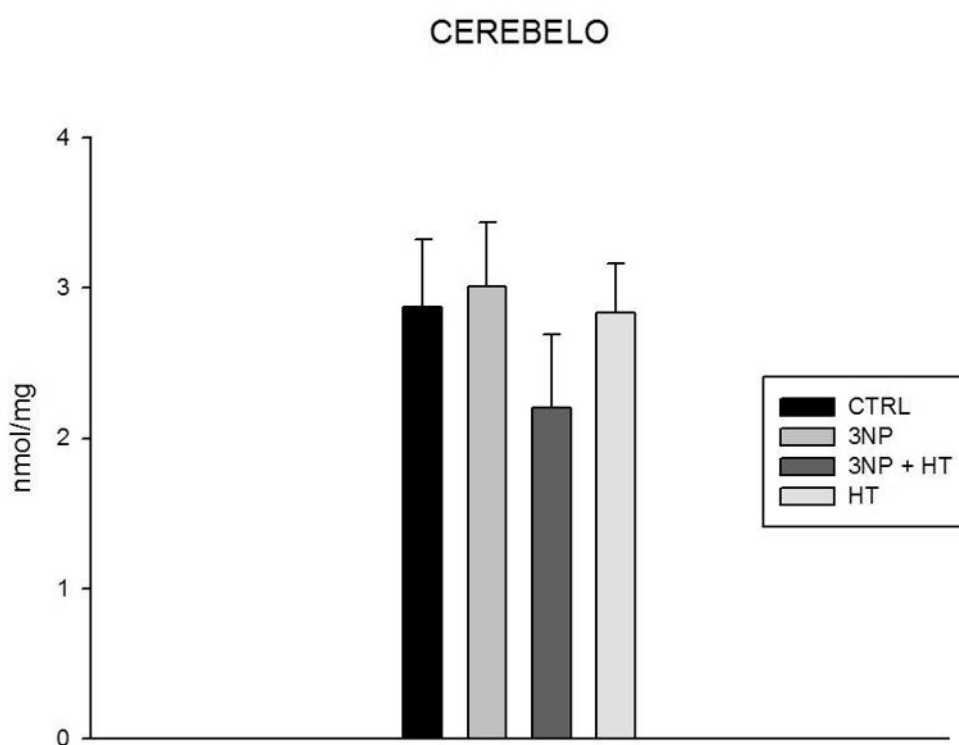


Figura 5. Prueba de carbonilos. nmol/mg de proteína en cerebelo. Grupos: control (CTRL); tratado con ácido 3-nitropropionico (3NP); 3NP e hipertermia (3NP+HT); y, tratamiento térmico (HT). Los datos representan la media \pm EEM. No se observaron diferencias significativas entre los grupos. $P < 0.05$. $n=6$.

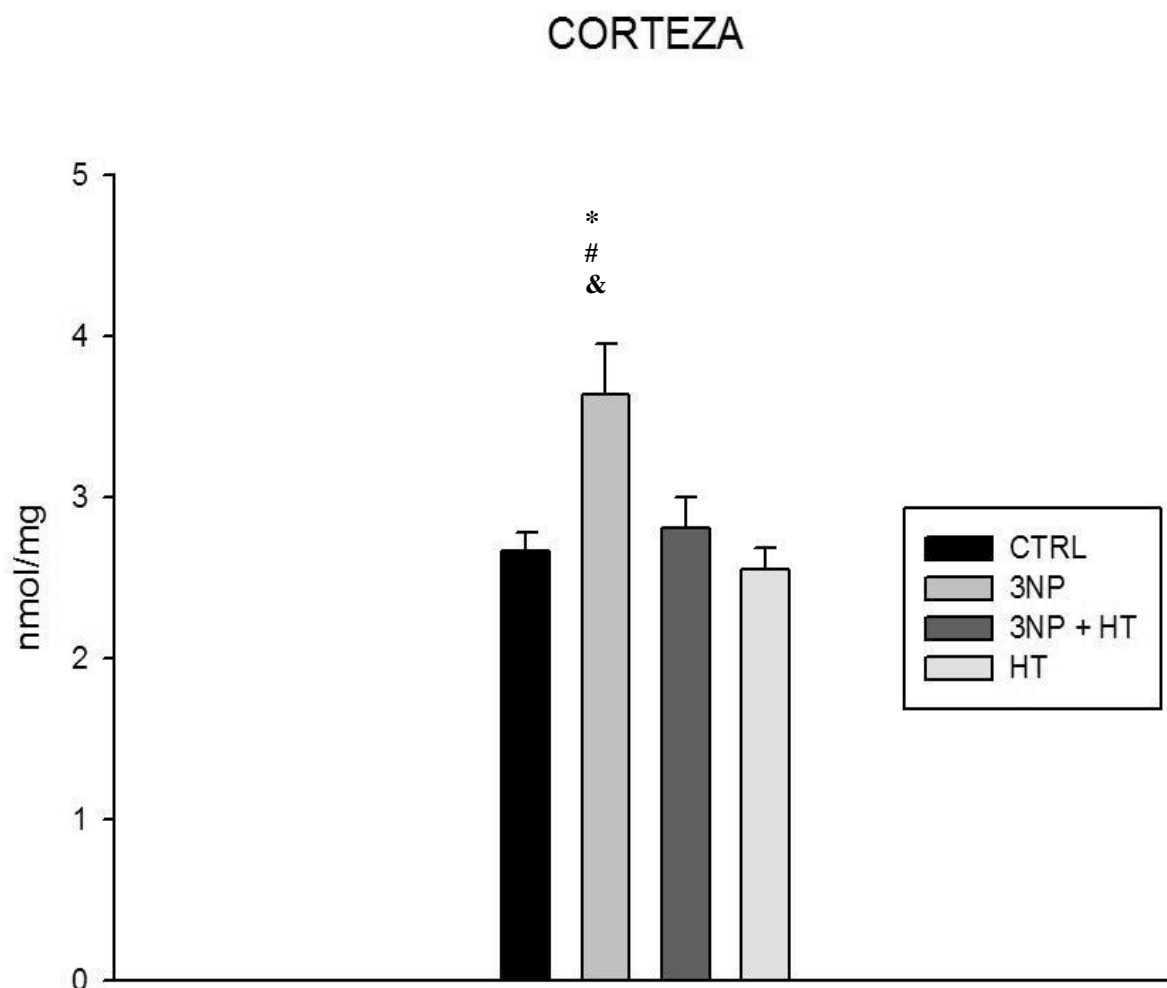


Figura 6. Prueba carbonilos. nmol/mg de proteína en corteza. Grupos: control (CTRL); tratado con ácido 3-nitropropionico (3NP); 3NP e hipertermia (3NP+HT); y, tratamiento térmico (HT). Los datos representan la media \pm EEM. *: diferencia significativa de 3NP vs CTRL; #: diferencia significativa de 3NP vs 3NP + HP; &: diferencia significativa de 3NP vs HT. $p < 0.05$. $n=6$.

La figura 8 resume los resultados de la prueba y que señalan de forma inequívoca, por un lado la mayor formación de grupos carbonilos en el estriado en comparación de cerebelo y corteza y por otro el efecto protector que la hipertermia ejerce sobre la acción del ácido 3-NP tanto en corteza cerebral

como en el estriado de los animales de experimentación. Cuando el periodo de tiempo que los animales permanecieron en condiciones de hipertermia se observó, un aumento sustancial y generalizado en los niveles de carbonilos se pudo observar (datos no mostrados).

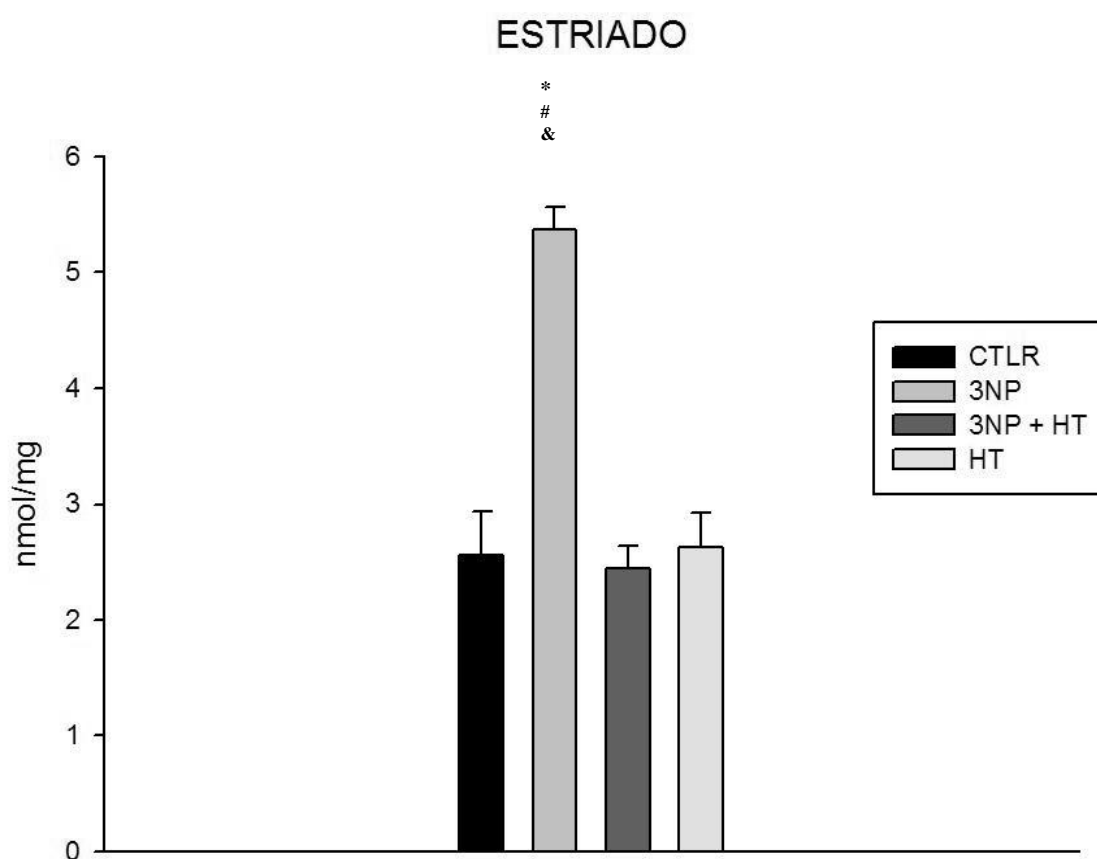


Figura 7. Prueba carbonilos. nmol/mg de proteína en estriado. Grupos: control (CTRL); tratado con ácido 3-nitropropionico (3NP); 3NP e hipertermia (3NP+HT); y, tratamiento térmico (HT). Los datos representan la media \pm EEM. *: diferencia significativa de 3NP vs CTRL; #: diferencia significativa de 3NP vs 3NP + HP; &: diferencia significativa de 3NP vs HT. $p < 0.05$. $n=6$.

RESUMEN DE LA PRUEBA DE CARBONILOS

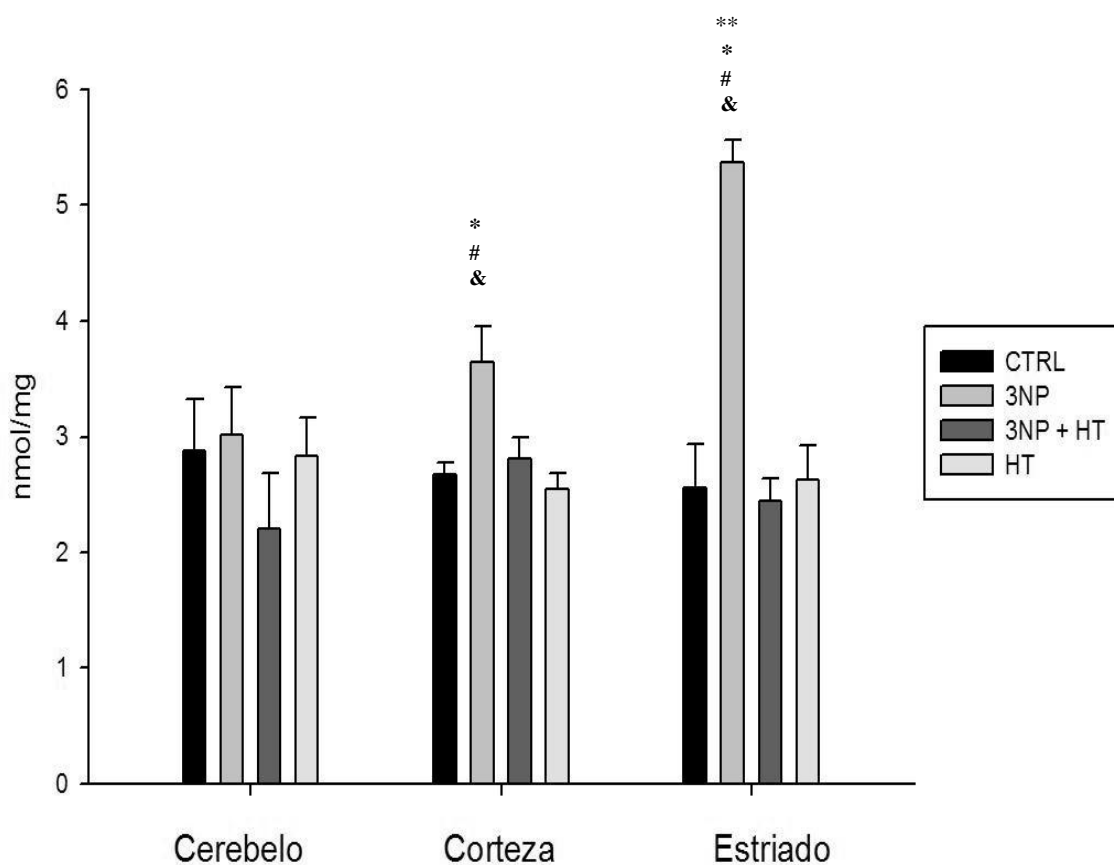


Figura 8. Resumen de prueba carbonilos en cerebelo, corteza y estriado. Grupos: control (CTRL); tratado con acido 3-nitropropionico (3NP); 3NP e hipertermia (3NP+HT); y, tratamiento térmico (HT). Los datos representan la media \pm EEM. *:diferencia significativa de 3NP vs CTRL; #: diferencia significativa de 3NP vs 3NP + HP; &: diferencia significativa de 3NP vs HT. **: diferencia significativa del efecto de 3NP en corteza vs 3NP en estriado. $p < 0.05$. $n=6$.

HIDROXILACION DEL SALICILATO. En la determinación de la hidroxilación del salicilato en el estriado (Figura 9), se encontró que el grupo que solo recibió solución salina (BCO) no mostró evidencia de la formación de los productos de hidroxilación (DHBs); en el grupo control (grupo que solo recibió salicilato) hay una incremento moderado de los productos de oxidación del salicilato, mientras que se pudo comprobar que el grupo que recibió 3NP, presento un aumento considerable en la concentración de DHBs, ya que, como se pudo comprobar se muestra más del doble de la concentración que presenta el grupo control. En el grupo que fue sometido a hipertermia y además se le administró 3NP (3NP+HT), se generaron DHBs en una cantidad equiparable al grupo control; lo que también ocurre con el grupo que recibió solo tratamiento térmico (HT).

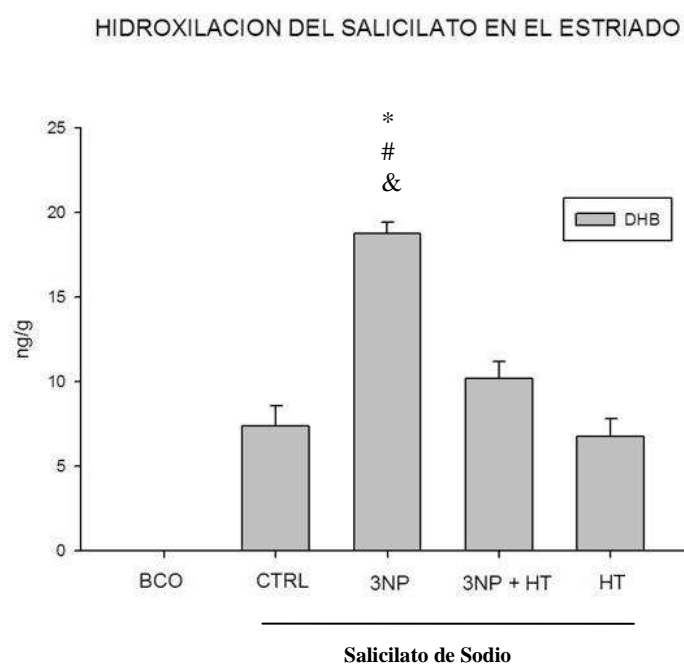


Figura 9. Determinación del ácido dihidroxibenzoico (DHB). ng/g de tejido. Grupos: blanco (BCO) solo recibió solución salina. Control (CTRL); tratado con ácido 3-nitropropionico (3NP); 3NP e hipertermia (3NP+HT); y, tratamiento térmico (HT). Los datos representan la media \pm EEM. *: diferencia

significativa de 3NP vs CTRL; #: diferencia significativa de 3NP vs 3NP + HP; &: diferencia significativa de 3NP vs HT. $p < 0.05$. $n=6$.

CATECOLAMINAS. Se realizó la detección de catecolaminas (dopamina, noradrenalina), serotonina, además de algunos metabolitos de estos en corteza, estriado y cerebelo.

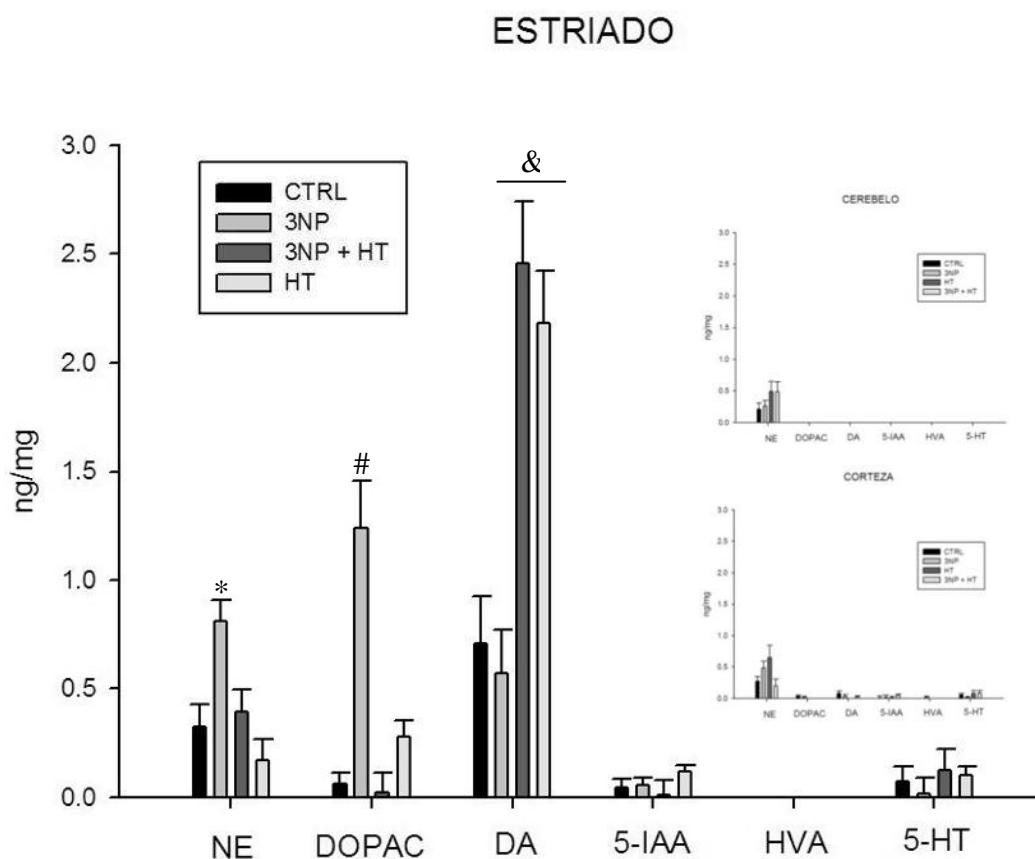


Figura 10. Determinación de catecolaminas y sus metabolitos, así como serotonina. NE, norepinefrina; DOPAC, ácido 3,4-dihydroxifenilacético; DA, dopamina; 5-IAA, ácido indolácético; HVA, ácido homovanílico; 5-HT, serotonina. ng/mg de proteína en cerebelo, corteza y estriado. Grupos: control (CTRL); tratado con ácido 3-nitropropionico (3NP); 3NP e hipertermia (3NP+HT); y, tratamiento térmico (HT). Los datos representan la media \pm EEM. *: diferencia significativa respecto de la NE; #: diferencia significativa de 3NP vs CTRL, HT, HT+3NP respecto al DOPAC; &: diferencia significativa de HT+3NP, HT vs CTRL, 3NP. $p < 0.05$. $n=6$.

En el estriado, el grupo tratado con el ácido 3-NP mostró una mayor concentración de NE y DOPAC, aunque es notable que se observan concentraciones normales de DA; en esta región no se observaron diferencias sobre la concentraciones de 5HT, 5IAA y HVA. Por otro lado, el grupo tratado con el ácido 3-NP e hipertermia (3NP + HT) mostró tener un marcado efecto sobre la concentración de DA, un aumento considerable de casi dos veces la concentración normal, mientras que no se demostraron cambios significativos sobre la concentración de sus metabolitos. El grupo que recibió solo tratamiento térmico también mostró el mismo incremento en las concentraciones de dopamina que el grupo 3NP+HT (Figura 10); en corteza y cerebelo no se pudo conseguir evidencia alguna del efecto del ácido 3-NP en las concentraciones de las catecolaminas ni de sus metabolitos en los grupos de estudio. Es de hacerse notar que la administración del ácido 3-NP por si misma, o bien en conjunto con el tratamiento hipertérmico aumentan significativamente la concentración de dopamina en el estriado.

DETERMINACION DE HSP70. Para comprobar uno de los efectos conocidos de la hipertermia sobre los tejidos, se midió la inducción de las proteínas de choque térmico en el estriado.



Figura 11. Inducción de HSP70 en el estriado de animales control (1) y de animales sometidos a hipertermia (2), respectivamente. Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE, detectadas por inmunotinción con el anticuerpo anti-HSP70.

En membrana de nitrocelulosa revelada por inmunotinción con el anticuerpo anti-HSP70, se observa una mayor intensidad en la banda del grupo que fue sometido a hipertermia, en comparación con el grupo control que no recibió tratamiento térmico.

DISCUSION

En el presente estudio se evaluó el efecto neuroprotector de la hipertermia sobre el estrés oxidativo generado por el compuesto neurotóxico mitocondrial ácido 3-nitropropiónico (3-NP), en la región del estriado del cerebro de ratas de experimentación.

La administración sistémica del ácido 3-NP, un inhibidor irreversible de la enzima succinato deshidrogenasa de la cadena transportadora de electrones y del ciclo del ácido cítrico, produce un deterioro en el metabolismo energético. Dicho deterioro incluye la producción de estrés oxidativo, formación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Lipton y Rosenberg, 1994; Schultz et al., 1995). Tales factores están involucrados directamente en la muerte neuronal, particularmente en la región del estriado (García, et al., 2002)

Las especies reactivas de oxígeno están implicadas en procesos fisiológicos y patológicos. Estas especies pueden modificar moléculas como el DNA, lípidos y proteínas (Stadtman, et al., 1993). En el caso de las proteínas, las ROS modifican las cadenas de aminoácidos (principalmente lisina, arginina, prolina e histidina), lo que resulta en la generación de grupos carbonilos libres (Amici, et al., 1989). En el envejecimiento, así como en un gran número de enfermedades, se ha demostrado que existe un factor común que es el aumento en la formación de los carbonilos en

las proteínas (Stadtman, et al., 1997; Beal, et al., 2002), como secuela de la intervención de radicales libres.

En el presente estudio los tejidos que se investigaron, no son particularmente sensibles al ácido 3- nitropropiónico, no demostraron un incremento importante en los niveles de grupos carbonilos, como es el caso del cerebelo y la corteza cerebral (Figura 5 y 6), lo que podría indicar que no hubo un ataque sustantivo de radicales libres a las proteínas en estos tejidos en particular; además, en cerebelo no se observaron diferencias significativas en comparación con el grupo control. En el caso de la corteza, se pudo observar que, esta fue vulnerable al efecto neurotóxico del 3NP, debido a que la concentración de grupos carbonilos resultó elevada respecto del control (36%)(Figura 6). Existe evidencia que nos indica que la corteza es afectada por la oxidación que se genera por la inhibición de la cadena transportadora de electrones y por consecuencia, del ciclo de Krebs (La Fontaine, et al., 2000a). El tratamiento hipertérmico redujo significativamente la producción de grupos carbonilo. Estos resultados sugieren que la hipotermia reduce parte del efecto tóxico del ácido 3-NP.

La región del estriado fue la zona más significativamente afectada por la administración del ácido 3-NP (Fig. 7). Esto concuerda con estudios previos donde ha sido mostrado que el 3NP produce oxidación de proteínas en el estriado y en la corteza, lo que conduce a la pérdida

masiva de las neuronas estriatales (La Fontaine et al., 2000a; La Fontaine et al., 2000b; Shulz, et al., 1996). La oxidación de las proteínas precede la muerte neuronal en el estriado (La Fontaine et al., 2000a).

Por otro lado, observamos un efecto importante de la hipertermia que sugiere que podría estar presentando inducción de las proteínas de choque térmico ya que estas, de acuerdo a nuestros resultados y a previos reportes, muestran tener un papel protector y preventivo, evitando la oxidación de las proteínas en el estriado (Dedeoglu, et al., 2002). Dicho efecto se observa como una concentración significativamente menor de carbonilos cuando el grupo tratado con 3NP es sometido a hipertermia.

La posible intervención de radical hidroxilo como resultado de la formación de radicales libres se constato en particular en el estriado, la región mas susceptible al ataque del ácido 3-NP. En nuestros resultados, encontramos que se produjo mayor concentración de los metabolitos de hidroxilación del salicilato en el estriado de los animales que solo recibieron 3NP (Figura 9), lo que nos sugiere que en este grupo hubo mayor producción de radicales libres. Por otro lado, el tratamiento térmico contrarrestó la producción de radical hidroxilo, ya que el grupo 3NP + HT (Ratas sometidas a hipertermia y tratadas con ácido 3-NP) no presentó concentraciones elevadas de los metabolitos de oxidación del salicilato (Figura 9).

Las catecolaminas en particular tienen un papel muy importante en la toxicidad del ácido 3-NP (Reynolds, et al., 1998). En nuestros resultados su determinación en el cerebelo y corteza, nos muestran que en estas regiones su producción no estaría afectada por el ácido 3-NP. Tal como se muestra en la figura 10, en la región del estriado el ácido 3-NP aumenta los niveles de norepinefrina y de DOPAC, mientras que es particularmente notable que se encontraron concentraciones normales de dopamina; esto es probablemente el resultado de su metabolismo hacia norepinefrina y DOPAC (Figura 10). De acuerdo a reportes previos, los metabolitos de la dopamina tienen la capacidad de generar ROS (Jakel y Maragos, 2000); pero además el 3,4-dihidroxi-fenilacetaldehido (DOPAL), el principal producto de la acción de la MAO sobre la dopamina, es capaz de producir muerte celular sobre las neuronas dopaminérgicas (Kristal et al., 2001).

La hipertermia induce un aumento en la liberación de la dopamina, un efecto que también se presenta en el grupo que recibió además el ácido 3-NP. De acuerdo a estos resultados, la hipertermia favorece la liberación de la dopamina en el estriado, pero evita que se metabolice. Esto sugiere que al evitar el metabolismo de la dopamina, se evita la formación de grandes cantidades de radicales libres, así como de los metabolitos neurotóxicos de la dopamina. Una de las posibilidades es que

la hipertermia pudiera actuar sobre las enzimas monoaminoxidasas para evitar su acción sobre la dopamina.

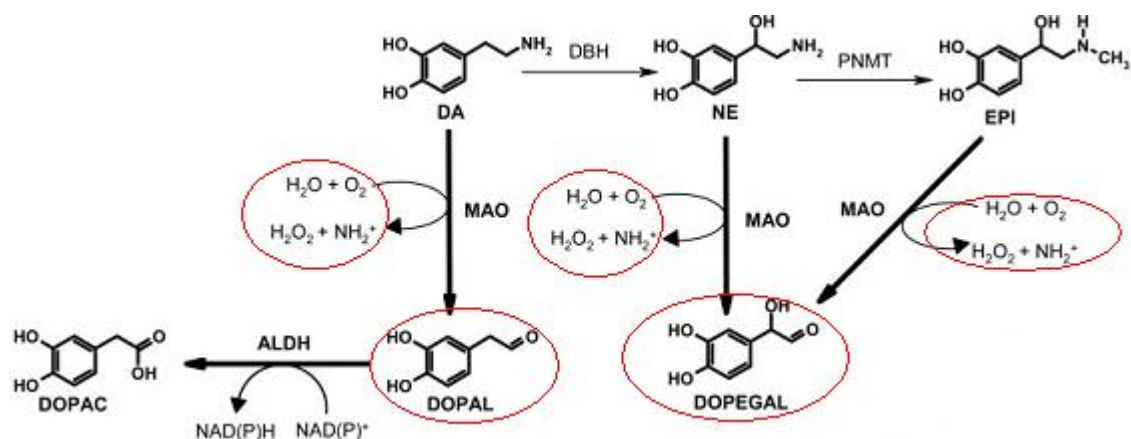


Figura 12. Metabolismo de la dopamina, se observa que el metabolismo de la dopamina genera gran cantidad de ROS, además de la formación de los metabolitos neurotóxicos DOPAL y DOPEGAL. Dopamina (DA), Norepinefrina (NE), Epinefrina (EPI), Monoaminoxidasas (MAO), feniletanolamina N-metiltransferasa (PNMT), Aldehído deshidrogenasa (ALDH), 3,4-dihidroxiacetilfenilaldehído (DOPAL), 3,4-dihidroxiacetilfenilaldehído (DOPEGAL), ácido 3,4-dihidroxiacetilfenilacético (DOPAC), peróxido de hidrógeno (H₂O₂); Tomado de: Marchitti et al., 2007.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis, podemos concluir que, tal como ha sido establecido con anterioridad, el ácido 3-nitropropionico es capaz de producir entre otros, cambios celulares tales como la capacidad de aumentar las concentraciones de dopamina, su acumulación y metabolismo. El resultado final de lo anterior es la producción de grandes cantidades de ROS, que probablemente conllevan a la muerte neuronal particularmente en la región del estriado.

Por lo tanto, la capacidad del tratamiento térmico para prevenir o atenuar los efectos del ácido 3-nitropropionico en las condiciones de

experimentación que fueron utilizadas, está probablemente asociada a los siguientes argumentos teóricos:

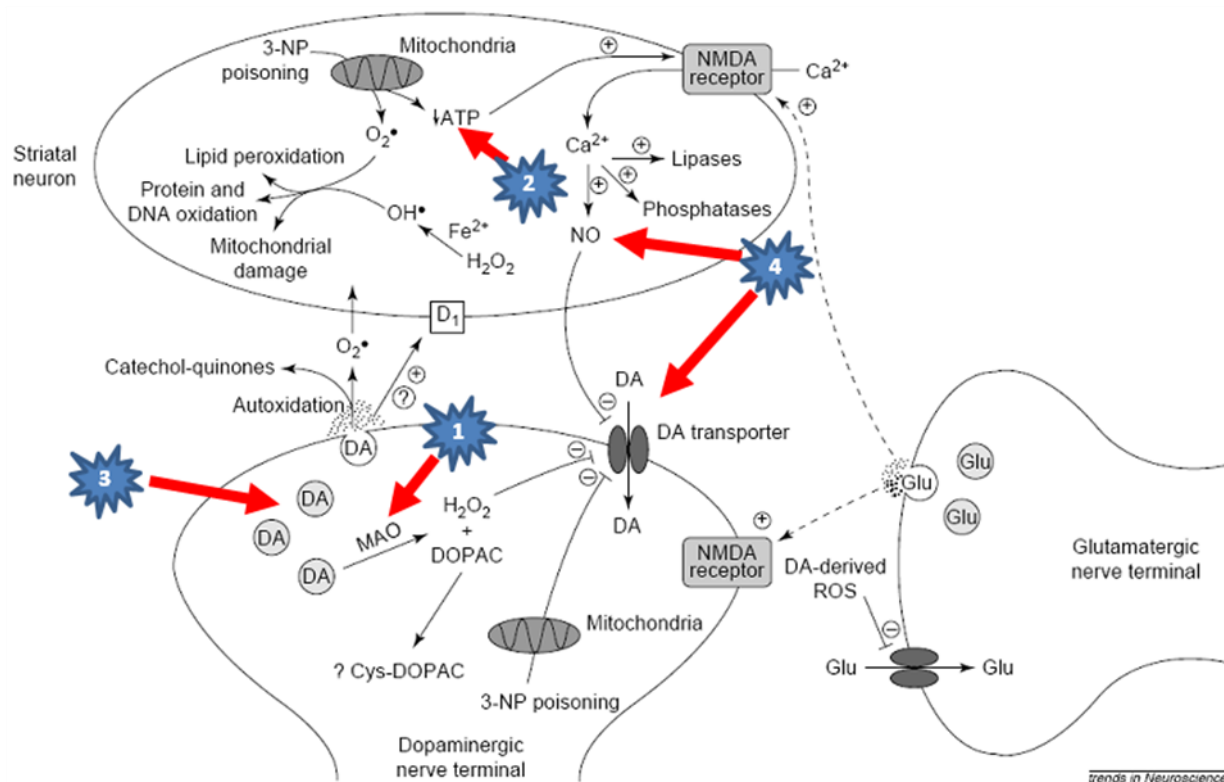


Figura 13. Las flechas señalan los posibles sitios donde la hipertermia pudiera participar, para prevenir el daño producido por el ácido 3-Nitropropiónico.

- 1. La hipertermia al bloquear el metabolismo de la dopamina, evitaría la producción de especies reactivas del oxígeno, así como de sus metabolitos tóxicos, como se señala en la figura 13 con el numero 1.**

- 2. El ácido 3-nitropropiónico produce una disminución en las concentraciones de ATP, mientras que un aumento de la temperatura como respuesta primaria aumenta la tasa metabólica, lo que podría tener un efecto compensatorio, indicado en la figura 13 con el numero 2.**
- 3. La hipertermia favorece la liberación de dopamina, mientras que su recaptura se favorece al estar aumentada la actividad de su transportador, lo que podría evitar su metabolismo y producción de ROS, efecto que se muestra en la figura 13 con el numero 3.**
- 4. La hipertermia podría inactivar la NOS y así impedir la síntesis de NO, el cual es un inhibidor del transportador de dopamina. Una disminución en la actividad del transportador traerá como respuesta una disminución en el recambio dopaminérgico, como es señalado en la figura 13 con el numero 4.**

BIBLIOGRAFIA

- Alamdari DH, Kostidou E, Paletas K, Sarigianni M, Konstas AG, Karapiperidou A, Koliakos G (2005). High sensitivity enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method for measuring protein carbonyl in samples with low amounts of protein. *Free Radic Biol Med.* 15;39(10):1362-7.
- Albin RL y Greenamayer JT (1992). Alternative excitotoxic hypotheses. *Neurology.* 42:733-739.
- Alexi T, Hughes PE, Knusel B y Tobin AJ (1998). Metabolic compromise with systemic 3-nitropropionic acid produces striatal apoptosis in Sprague–Dawley rats but not in BALB/c ByJ mice. *Exp. Neurol.* 153:74–93.
- Almeida S, Domingues A, Rodrigues L, Oliveira CR y Rego AC (2004). FK506 prevents mitochondrial-dependent apoptotic cell death induced by 3-nitropropionic acid in rat primary cortical cultures. *Neurobiol. Dis.* 17:435–444.
- Alpers, BJ (1936) Hyperthermia due to lesions in the hypothalamus. *Arch. Neurol. Psychiatr.*, 35: 30–42.
- Alston TA, Mela L y Bright HJ (1977). 3-Nitropropionate, the toxic substance of *indigofera*, is a suicide inactivator of succinate dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74:3767-3771.

- Amici A, Levine RL, Tsai L y Stadman ER (1989). Conversion of amino acid residues in proteins and amino acid homopolymers to carbonyl derivatives by metal-catalyzed oxidation reactions. *J. Biol. Chem.* 264:3341– 3346.
- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, y Young IG (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature.* 290:457–465.
- Austin, MG and Berry, J.W. (1956) Observation on one hundred cases of heatstroke. *JAMA*, 161: 1525–1529.
- Beal MF (1992). Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illnesses? *Ann. Neurol.* 31:119–130.
- Beal MF (2002). Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Radic. Biol. Med.* 32:797– 803.
- Beal MF, Brouillet E, Jenkins BG, Henshaw R, Rosen B y Hyman BT (1993). Age-dependent striatal excitotoxic lesions produced by the endogenous mitochondrial inhibitor malonate. *J. Neurochem.* 61:1147-1150.
- Beal MF, Palomo T, Kostrzewa RM y Archer T (2000). Neuroprotective and neurorestorative strategies for neuronal injury. *Neurotox. Res.* 2:71-84.
- Belay HT y Brown IR (2003). Spatial analysis of cell death and Hsp70 induction in brain, thymus, and bone marrow of the hyperthermic rat. *Cell Stress and Chaperones.* 8:395-404.

- Belay HT y Brown IR (2006). Cell death and expression of heat-shock protein Hsc 70 in the hyperthermic rat brain. *J. Neurochem. Suppl* 1:116-119.
- Bissonnette, B, Holtby, HM, Davis, AJ, Pua, H, Gilder, FJ and Black, M (2000) Cerebral hyperthermia in children after cardiopulmonary bypass. *Anesthesiology*, 93: 611–618.
- Bizat N, Galas M, Jacquard C, Boyer F, Schiffmann SN, Hantraye P, Blum D y Brouillet E (2005). Neuroprotective effects on zVAD-fmk against 3-nitropropionic acid involves direct inhibition of calpain. *Neuropharm.* 49:695–702.
- Bizat N, Hermel JM, Boyer F, Jacquard C, Creminon C, Ouary S, Escartin C, Hantraye P, Kajewski S y Brouillet E (2003). Calpain is a major cell death effector in selective striatal degeneration induced in vivo by 3-nitropropionate: implications for Huntington's disease. *J. Neurosci.* 23:5020–5030.
- Blum D, Galas MC, Cuvelier L y Schiffmann SN (2004). Chronic intoxication with 3-nitropropionic acid in rats induces the loss of striatal dopamine terminals without affecting nigral cell viability. *Neurosci. Lett.* 354:234–238.
- Blum D, Galas MC, Gall D, Cuvelier L, Schiffmann SN.(2002). Striatal and cortical neurochemical changes induced by chronic metabolic compromise in the 3-nitropropionic model of Huntington's disease. *Neurobiol Dis.* 10(3):410-26.

- Bogdanov MB, Ferrante RJ, Kuemmerle S, Klivenyi P y Beal MF (1998). Increased vulnerability to 3-nitropropionic acid in an animal model of Huntington's disease. *J. Neurochem.* 71:2642–2644.
- Bouchama, A and Knochel, JP (2002) Heat stroke. *N. Engl. J. Med.*, 346(25): 1978–1988. Review
- Brouillet E, Guyot MC, Mittoux V, Altairac S, Conde F, Palfi S y Hantraye P (1998). Partial inhibition of brain succinate dehydrogenase by 3-nitropropionic acid is sufficient to initiate striatal degeneration in rat. *J. Neurochem.* 70:794–805.
- Brouillet E, Hantraye P, Ferrante RJ, Dolan R, Leroy-Willig A y Kowall NW (1995). Chronic mitochondrial energy impairment produces selective striatal degeneration and abnormal choreiform movements in primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:7105–7109.
- Brouillet E, Jacquard C, Bizat N y Blum D (2005). 3-Nitropropionic acid: a mitochondrial toxin to uncover physiopathological mechanisms underlying striatal degeneration in Huntington's disease. *J. Neurochem.* 95:1521–1540.
- Brown IR (2007). Heat shock proteins and protection of the nervous system. *Ann. NY Acad. Sci.* 1113:147-158.
- Brown IR y Sharp FR (1999). The cellular stress gene response in brain in stress protein, handbook of experimental pharmacology. Latchman DS eds. pp: 234-263.

- Browne SE, Beal MF (2002). Toxin-induced mitochondrial dysfunction. *Int Rev Neurobiol.* 53:243-79
- Calabresi P., Gubellini P., Picconi B., Centonze D., Pisani A., Bonsi P., Greengard P., Hipskind R. A., Borrelli E. and Bernardi G. (2001) Inhibition of mitochondrial complex II induces a longterm potentiation of NMDA-mediated synaptic excitation in the striatum requiring endogenous dopamine. *J. Neurosci.* 21, 5110–5120.
- Cleren C, Calingasan NY, Chen J, Beal MF. (2005). Celastrol protects against MPTP- and 3-nitropropionic acid-induced neurotoxicity. *J Neurochem.* 94(4):995-1004.
- Coles CJ, Edmonson DE y Singer TP (1979). Inactivation of succinate dehydrogenase by 3-nitropropionate. *J. Biol. Chem.* 255:4772–4780.
- Coudray C, Favier A. (2000) Determination of salicylate hydroxylation products as an in vivo oxidative stress marker. *Free Radic Biol Med.* 29(11):1064-70.
- Craig, EA (1989). Essential roles of 70kDa heat inducible proteins. *BioEssays.* 11:48-52.
- Cremer LO, Kalkman CJ (2007). Cerebral pathophysiology and clinica neurology of hyperthermia in humans. *Prog Brain Res.* 162:153-69.

Davies KJ y Delsignore ME (1987). Protein damage and degradation by oxygen radicals. III. Modification of secondary and tertiary structure. *J. Biol. Chem.* 262:9908-9913.

Dedeoglu A, Ferrante RJ, Andreassen OA, Dillmann WH y Beal MF (2002). Mice over expressing 70-kDa heat shock protein show increased resistance to malonate and 3-nitropropionic acid. *Exp. Neurol.* 176:262-265.

Duan W, Guo Z y Mattson MP (2000). Participation of par-4 in the degeneration of striatal neurons induced by metabolic compromise with 3-nitropropionic acid. *Exp. Neurol.* 16:1–11.

Dumuis A, Sebben M, Haynes L, Pin JP y Bockaert J (1988). NMDA receptors activate the arachidonic acid cascade system in striatal neurons. *Nature.* 336:68–70.

Finkel T y Holbrook NJ (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature.* 408:239–247.

Floyd RA, Watson JJ y Wong PK (1984). Sensitive assay of hydroxyl free radical formation utilizing high pressure liquid chromatography with electrochemical detection of phenol and salicylate hydroxylation products. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 10:221–235.

Galas MC, Bizat N, Cuvelier L, Bantubungi K, Brouillet E, Schiffmann SN y Blum D (2004). Death of cortical and striatal neurons induced by

mitochondrial defect involves differential molecular mechanisms. Neurobiol. Dis. 15:152–159.

Garcia M, Vanhoutte P, Pages C, Besson MJ, Brouillet E y Caboche J (2002). The mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid induces striatal neurodegeneration via a c-Jun N-terminal kinase/c-Jun module. J. Neurosci. 22:2174–2184.

Garcia O y Massieu L (2003). Glutamate uptake inhibitor 1-transpyrrolidine 2,4-dicarboxylate becomes neurotoxic in the presence of subthreshold concentrations of mitochondrial toxin 3-nitropropionate: involvement of mitochondrial reducing activity and ATP production. J. Neurosci. Res. 74:956–966.

Garrido Y, Gurbuxani S, Rabagnan L y Kroemer G (2001). Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. Biochem. Biophys. Res. Commun. 286:443-442.

Gauss, H and Meyer, KA (1917) Heat stroke: report of one hundred and fifty-eight cases from Cook County Hospital, Chicago. Am. J. Med. Sci., 154: 554–564.

Grollman AP y Moriya M (1993). Mutagenesis by 8-oxoguanine: an enemy within. Trends Genet. 9:246-249.

Hahn, GM (1982) Hyperthermia and Cancer. Plenum Press, New York, NY.

- Harmon, BV, Corder, AM, Collins, RJ, Gobe, GC, Allen, J, Allan, DJ and Kerr, JF. (1990) Cell death induced in a murine mastocytoma by 42–47 degrees C heating in vitro: evidence that the form of death changes from apoptosis to necrosis above a critical heat load. *Int. J. Radiat. Biol.*, 58: 845–858.
- Hartl FU, Martin J y Neupert W (1992). Protein folding in the cell, the role of molecular chaperones Hsp70 and Hsp60. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 21:293-322.
- Heininger KA (2000). Unifying hypothesis of Alzheimer Disease. IV. Causation and sequence of events. *Rev. Neurosci.* 11:213-328.
- Henze KW y Martin (2003). "Evolutionary biology: Essence of mitochondria". *Nature.* 426:127-128.
- Hicks-Gómez JJ (2006). *Bioquímica*. Ed. Mc Graw-Hill Interamericana. 25:368-388.
- Hoopes, PJ (1991) The effects of heat on the nervous system. In: Gutin P.H., Leibel S.A. and Sheline G.E. (Eds.), *Radiation Injury to the Nervous System*. Raven Press, New York, NY, pp. 407–430.
- Johnson JR, Robinson BL, Ali SF y Binienda Z (2000). Dopamine toxicity following long term exposure to low doses of 3-nitropropionic acid (3-NPA) in rats. *Toxicol. Lett.* 116:113-118.

- Karunanithi S, Barclay JW, Robertson RM, Brown IR, Atwood HL (1999). Neuroprotection at Drosophila synapses conferred by prior heat shock. *J Neurosci.* 19(11):4360-9.
- Kiang JG y Tsokos GC (1998). Heat Shock protein 70 kDa: molecular biology biochemistry and physiology. *Pharmacol. Ther.* 80:183-201.
- Kim GW, Copin JC, Kawase M, Chen SF, Sato S, Gobbel GT y Chan PH (2000). Excitotoxicity is required for induction of oxidative stress and apoptosis in mouse striatum by the mitochondrial toxin, 3-nitropropionic acid. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 20:119–129.
- Kiyatkin EA (2007). Physiological and pathological brain hyperthermia. *Prog Brain Res.* 162:219-43.
- Knochel, JP (1974) Environmental heat illness. An eclectic review. *Arch. Intern. Med.*, 133(5): 841–864.
- Kregel KC. (2002). Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol.* 92(5):2177-86.
- Kristal BS, Conway AD, Brown AM, Jain JC, Ulluci PA, Li SW, Burke WJ. (2001). Selective dopaminergic vulnerability: 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde targets mitochondria. *Free Radic Biol Med.* 15; 30(8):924-31.

La Fontaine M, Geddes J, Banks A y Butterfield DA (2000a). 3-Nitropropionic acid-induced in vivo protein oxidation in striatal and cortical synaptosomes: Insights into Huntington's disease. *Brain Res.* 858:356–362.

La Fontaine M, Geddes J, Banks A y Butterfield DA (2000b). Exogenous and endogenous antioxidants protect against 3-nitropropionic acid induced oxidative: Implications for Huntington's disease. *J. Neurochem.* 75:1709–1715.

Latchman DS (2001). Heat shock proteins and cardiac protection. *Cardiovasc. Res.* 51:637-646.

Lenhiger AL (1982). *The mitochondria*. Plenum, New York.

Leventhal L, Sortwell CE, Hanbury R, Collier TJ, Kordower JH y Palfi S (2000). Cyclosporin A protects striatal neurons in vitro and in vivo from 3-nitropropionic acid toxicity. *J. Comp. Neurol.* 425:471–478.

Lipton SA y Rosenberg PA (1994). Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N. Engl. J. Med.* 330:613–622.

Lowenstein, DH, Chan, PH and Miles, MF. (1991) The stress protein response in cultured neurons: characterization and evidence for a protective role in excitotoxicity. *Neuron*, 7: 1053–1060.

Malamud, N, Haymaker, W and Custer, RP (1946) Heat stroke. A clinicopathological study of 125 fatal cases. *Mil. Surg.*, 99: 397–449.

Maragos WF, Zhu J, Chesnut MD y Dwoskin LP (2002). Mitochondrial toxin inhibition of [3H]dopamine uptake into rat striatal synaptosomes. *Biochem. Pharmacol.* 63:1499-505.

Marchitti SA, Deitrich RA, Vasiliou V. (2007) Neurotoxicity and metabolism of the catecholamine-derived 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde and 3,4-dihydroxyphenylglycolaldehyde: the role of aldehyde dehydrogenase. *Pharmacol Rev.* 59(2):125-50. Epub 2007 Mar 22.

Mathews KC y Van Holde KE (1998). *Bioquímica*. 2ª Edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana, Madrid, España.

Matthews RT, Yang LY, Jenkins BG, Ferrante RJ, Rosen BR, Kaddurah-Daouk R y Beal F (1998). Neuroprotective effect of Creatine and Cyclocreatine in animal models of Huntington's disease. *J. Neurosci.* 18:156-163.

Mattson MP (2000). Neuroprotective signaling and the aging brain: take away my food and let me run. *Brain Res.* 886:47-53.

Mattson MP, Duan W, Chan SL, Cheng A, Haughey N, Gary DS, Guo Z, Lee J y Furukawa K (2002). Neuroprotective and neurorestorative signals transduction mechanisms in brain aging: modifications by genes, diet and behavior. *Neurobiol. Aging.* 23:695-705.

Moldoveanu T, Hosfield CM, Lim D, Elce JS, Jia Z y Davies PL (2002). A Ca(2+) switch aligns the active site of calpain. *Cell.* 108:649-660.

Neal SJ, Karunanithi S, Best A, So AK, Tanguay RM, Atwood HL, Westwood JT. (2006). Thermoprotection of synaptic transmission in a *Drosophila* heat shock factor mutant is accompanied by increased expression of Hsp83 and DnaJ-1. *Physiol Genomics*. 25(3):493-501.

Nishino H, Kumazaki M, Fukuda A, Fujimoto I, Shimano Y, Hida H, Sakurai T, Deshpande SB, Shimizu H, Morikawa S y Inubushi T (1997). Acute 3-nitropropionic acid intoxication induces striatal astrocytic cell death and dysfunction of the blood-brain barrier: involvement of dopamine toxicity. *Neurosci. Res*. 27:343-355.

Oliver CN, Starke-Reed PE, Stadtman ER, Liu GJ, Carney JM y Floyd RA (1990) Oxidative damage to brain proteins, loss of glutamine synthetase activity, and production of free radicals during ischemia/reperfusion-induced injury to gerbil brain. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 87:5144-5147

Parsell DA y Lindquist S (1993). The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu. Rev. Genet*. 27:437-496.

Polla BS, Kantengwa S, Francois D, Salvioli S, Franceschi C, Marsac C y Cossarizza A (1996). Mitochondria are selective targets for the protective effects of heat shock against oxidative injury, *Proc. Natl. Acad. Sci*. 93:6458-6463.

- Purmal AA, Kow YW y Wallace SS (1994). Major oxidative products of cytosine, 5-hydroxycytosine and 5-hydroxyuracil, exhibit sequence context-dependent mispairing in vitro. *Nuclei Acids Res.* 22:72-78.
- Reynolds DS, Carter RJ y Morton AJ (1998). Dopamine modulates the susceptibility of striatal neurons to 3-nitropropionic acid in the rat model of Huntington's disease. *J. Neurosci.* 18:10116–10127.
- Richmond R, Halliwell B, Chauhan J y Darbre A (1981). Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals: detection of hydroxyl radicals by the hydroxylation of aromatic compounds. *Anal. Biochem.* 118:328–335.
- Ritossa, F. (1962) A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 18: 571–573.
- Robins, HI, Hugander, A and Cohen, JD (1989) Whole body hyperthermia in the treatment of neoplastic disease. *Radiol. Clin. North Am.*, 27: 603–610.
- Rosen, A.D. (1996) Temperature modulation of calcium channel function in GH3 cells. *Am. J. Physiol.*, 271: C863–C868.
- Rosen, AD (2001) Nonlinear temperature modulation of sodium channel kinetics in GH3 cells. *Biochem. Biophys. Acta*, 1511: 391–396.
- Ruan Q, Lesort M, MacDonald ME y Johnson GV (2004). Striatal cells from mutant huntingtin knock-in mice are selectively vulnerable to mitochondrial complex II inhibitor-induced cell death through a non-apoptotic pathway. *Hum. Mol. Genet.* 13:669–681.

Ryan, TP, Hoopes, PJ, Taylor, JH, Strohbehn, JW, Roberts, DW, Double, EB and Coughlin, CT (1991) Experimental brain hyperthermia: techniques for heat delivery and thermometry. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 20: 739–750.

Sagone AL, Husney RM y Davis B (1993). Biotransformation of para-aminobenzoic acid and salicylic acid by PMN. *Free Radic. Biol. Med.* 14:27–35.

Samali A y Orrenius S (1998). Heat shock proteins: regulators of stress response and apoptosis. *Cell Stress and Chaperones.* 3:228-236.

Sato, K., H. Saito, and N. Matsuli. (1996) HSP70 is essential to the neuroprotective effect of heat-shock. *Brain Res.* 740: 117–123.

Schapira AHV (2006). Mitochondrial Disease. *Lancet* 368:70-82.

Schulz JB, Matthews RT, Jenkins BG, Ferrante RJ, Siwek D, Henshaw DR, Cipolloni PB, Mecocci P, Kowall NW, Rosen BR y Beal MF (1995a). Blockade of neuronal nitric oxide synthase protects against excitotoxicity in vivo. *J. Neurosci* 15:8419-8429.

Schulz JB, Matthews RT, Muqit MMK, Browne SE y Beal MF (1995b). Inhibition of neuronal nitric oxide synthase by 7-nitroindazole protects against MPTP-induced neurotoxicity in mice. *J. Neurochem.* 64:936-939.

Schulz, JB, Henshaw DR, MacGarvey U y Beal MF (1996). Involvement of oxidative stress in 3-nitropropionic acid neurotoxicity. *Neurochem. Int.* 29:167–171.

Simon, HB (1993) Hyperthermia. *N. Engl. J. Med.*, 329: 483–487.

Stadtman ER (1993). Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Annu. Rev. Biochem.* 62:797–821.

Stadtman ER y Berlett BS (1997). Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Chem. Res. Toxicol.* 10:485–494.

Sterner, S (1990) Summer heat illnesses. Conditions that range from mild to fatal. *Postgrad. Med.*, 87(8): 67–70, 73.

Storgaard J, Kornblit BT, Zimmer J y Gramsbergen JB (2000). 3-Nitropropionic acid neurotoxicity in organotypic striatal and corticostriatal slice cultures is dependent on glucose and glutamate. *Exp. Neurol.* 164:227–235.

Subjeck, J. R, and T.-T. Shyy. (1986) Stress protein systems of mammalian cells. *Am. J. Physiol.* 250 (*Cell Physiol.* 19): C1–C17.

Tavares RG, Santos CE, Tasca CI, Wajner M, Souza DO y Dutra-Filho CS (2001). Inhibition of glutamate uptake into synaptic vesicles from rat brain by 3-nitropropionic acid in vitro. *Exp. Neurol.* 172:250–254.

- Trotti D, Danbolt NC y Volterra A (1998). Glutamate transporters are oxidantvulnerable:a molecular link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration? *Trends Pharmacol. Sci.* 19:328–334.
- Tzagoloff A (1982). *Mitochondria*. Plenum, New York.
- Uney, JB, Kew, JN, Staley, K, Tyers, P and Sofroniew, MV. (1993) Transfection-mediated expression of human Hsp70i protects rat dorsal root ganglian neurones and glia from severe heat stress. *FEBS Lett.*, 334: 313–316.
- Van der Zee, J (2002) Heating the patient: a promising approach? *Ann. Oncol.*, 13: 1173–1184.
- Van Houten B, Woshner V y Santos JH (2006). Role of mitochondrial DNA in toxic responses to oxidative stress. *DNA Repair.* 5:145–152.
- Vogel, P, Dux, E and Wiessner, C. (1997) Evidence of apoptosis in primary neuronal cultures after heat shock. *Brain Res.*, 764: 205–213.
- Welch, W. J. (1992) Mammalian stress response: cell physiology structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiol. Rev.* 72: 1063–1081.
- Welch, W. J., and J. P. Suhan. (1986) Cellular and biochemical events in mammalian cells during and after recovery from physiological stress. *J. Cell Biol.* 103: 20352052.

- Xie, T, McGann, UD, Kim, S, Yuan, J and Ricaurte, GA. (2000) Effect of temperature on dopamine transporter function and intracellular accumulation of methamphetamine: implications for methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity. *J. Neurosci.*, 20: 7838–7845.
- Xu L y Giffard RG (1997). HSP70 protects murine astrocytes from glucose deprivation injury, *Neurosci. Lett.* 224:9–12
- Yang L, Sugama S, Mischak RP, Kiaei M, Bizat N, Brouillet E, Joh TH y Beal MF (2004). A novel systemically active caspase inhibitor attenuates the toxicities of MPTP, malonate, and 3NP in vivo. *Neurobiol. Dis.* 17:250–259.
- Yang YL, Lin LT. (1999). Heat shock protein expression protects against cerebral ischemia and monoamine overload in rat heatstroke *Am J Physiol.* 1999 Jun;276(6 Pt 2):H1961-7.
- Yenari MA. (2002). Heat shock proteins and neuroprotection. *Adv Exp Med Biol.* 513:281-99.
- Zerangue N y Kavanaugh MP (1996). Flux coupling in a neuronal glutamate transporter. *Nature.* 383:634–637.
- Zhang Y, Huang L, Zhang J, Moskophidis D y Mivechi NF (2002). Targeted disruption of HSF1 leads to lack of thermo tolerance and defined tissue-specific regulation for stress-inducible Hsp molecular chaperones. *J. Cell Biochem.* 86:376-393.