



Universidad de Córdoba

Hospital Universitario Reina Sofía

**Estrés oxidativo como marcador de
severidad y pronóstico en pacientes con
enfermedad de Huntington**

Trabajo presentado por Fernando Sánchez López, licenciado en Medicina,
para optar al grado de doctor por la Universidad de Córdoba

Directores: Dr. Francisco Pérez Jiménez y Dr. Isaac Túnez Fiñana

Córdoba, a 24 de Julio de 2013

Fernando Sánchez López

Tesis Doctoral

2013

TITULO: *Estrés oxidativo como marcador de severidad y pronóstico en pacientes con enfermedad de Huntington*

AUTOR: *Fernando Sánchez López*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba. 2013
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es



TÍTULO DE LA TESIS:

Estrés oxidativo como marcador de severidad y pronóstico en pacientes con enfermedad de Huntington

DOCTORANDO/A:

Fernando Sánchez López

INFORME RAZONADO DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

Los directores del presente trabajo de Tesis Doctoral,

INFORMAN que,

El trabajo antes indicado y realizado bajo nuestra dirección en el Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMBIC)/Hospital Universitario Reina Sofía/Universidad de Córdoba, se considera finalizado y puede ser presentado para su exposición y defensa como Tesis Doctoral en el Programa de Doctorado de Biomedicina de la Universidad de Córdoba. Dicho trabajo reúne las condiciones necesarias para su exposición y optar al grado de doctor en Medicina, cumpliendo la normativa vigente y reuniendo los indicios de calidad exigidos.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba a 24 de Julio de 2013

Firma de los directores

Fdo.: Prof. Dr. Francisco Pérez Jiménez

Fdo.: Prof. Dr. Isaac Túnez Fiñana

El éxito consiste en obtener lo que se desea. La
felicidad, en disfrutar lo que se obtiene.
(R.W. Emerson)

El éxito no se logra sólo con cualidades
especiales. Es sobre todo un trabajo de
constancia, de método y de organización.
(J.P. Sergent)

Agradecimientos

Sin duda alguna, el trabajo y los logros conseguidos en el camino tanto de la vida como de la actividad profesional no son el éxito de una sola persona, sino de todo un entorno en el que nos sumergimos y en el que nos desarrollamos. Como diría Ortega y Gasset “yo soy yo y mi circunstancia”. Una circunstancia formada por el cúmulo de muchos hechos, personas y situaciones puntuales que nos van conformando, modelando en el peregrinar de la vida. Bajo este paraguas de argumentación, no cabe sino decir que el presente trabajo es el resultado de la influencia, apoyo y seguimiento de un gran número de personas por ello:

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento al *Dr. Pérez Jiménez* y al *Dr. Túnez*, mis directores de tesis, por confiar en mí para la realización de este trabajo, su dedicación y apoyo incondicional.

A mi esposa e hijos, por su apoyo incondicional, por las horas de desvelo en la elaboración de este proyecto y el desarrollo de un proyecto de vida conjunto.

A todos los miembros del Servicio de Neurología del Hospital Universitario Reina Sofía y de los Departamentos de Bioquímica y Biología Molecular y Medicina (Medicina, Dermatología y Otorrinolaringología) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Córdoba, que en alguna medida han facilitado y ayudado a conseguir esta meta.

Índice

Resumen

Abreviaturas	3
1. Introducción	9
1.1. Enfermedad de Huntington	9
1.2. Estrés oxidativo	15
1.3. Enfermedad de Huntington y estrés oxidativo	29
2. Estado actual del problema	41
2.1. Marcadores en la severidad y pronóstico de la enfermedad de Huntington	43
2.2. Estrés oxidativo como marcador de severidad y pronóstico	58
3. Objetivos	65
4. Material y métodos	69
4.1. Población y diseño del estudio	69
4.2. Diseño del estudio	72
4.3. Metodología específica requerida para la cuantificación de las variables del estudio	73

4.4. Análisis estadístico	83
5. Resultados	87
6. Discusión	103
6.1. Papel del estrés oxidativo en la enfermedad de Huntington	103
6.2. Relación entre el estrés oxidativo y la inflamación en pacientes con enfermedad de Huntington	108
6.3. Relación de los factores neurotróficos y el estrés nitrosativo en la enfermedad de Huntington	110
7. Conclusiones	117
8. Bibliografía	134
ANEXOS	137

Resumen

Objetivos: El presente estudio valoró los cambios en biomarcadores de estrés oxidativo y sistemas antioxidantes en pacientes con enfermedad de Huntington. Analizando los cambios acontecidos en marcadores de inflamación mieloperoxidasa, interleucina 6 y proteína C reactiva, así como los niveles circulantes de factores neurotróficos. Todo ello destinado a evaluar el posible uso de los biomarcadores de estrés oxidativo como indicadores diagnóstico y pronóstico de esta enfermedad, así como profundizar en el conocimiento mecanicista de la patogénesis de este proceso.

Diseño experimental: Estudio transversal descriptivo entre variables biológicas de pacientes y controles. Para el presente trabajo se han incluido un total de 19 pacientes diagnosticados de enfermedad de Huntington (HD), con edad comprendida entre 26-58 años, de los atendidos en la consulta del Servicio de Neurología del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba y del Hospital de Valmes de Sevilla, y clasificados según *The Unified Huntington's Disease Rating Scale* (UHDRS), se han dividido en dos grupos según la severidad: i) grupo HD1: con una puntuación superior a 70 puntos; y ii) grupo HD2: pacientes con una puntuación UHDRS menor o igual a 70 puntos. Estos pacientes han sido comparados con 19 sujetos control (sanos y sin ninguna enfermedad neurológica) tabulados por edad y sexo.

Las concentraciones de los biomarcadores de estrés oxidativo se cuantificaron mediante técnicas espectrofotométricas, mientras que los factores neurotróficos e IL-6 fueron valoradas mediante técnicas ELISA. Finalmente, el análisis dinámico del daño oxidativo se realizó mediante la aplicación de diferentes algoritmos. Para el estudio estadístico aplicamos el programa estadístico SPSS compatible con PC.

Resultados: Los pacientes con enfermedad de Huntington presentaron un mayor estrés oxidativo caracterizado por elevación de los parámetros indicadores de daño oxidativo y disminución de los sistemas antioxidantes, junto con una elevación del cociente MPO/WBC. Datos que se acompañaron de descensos significativos en los niveles circulantes de factores neurotróficos.

Conclusiones: Los pacientes con enfermedad de Huntington presentan un estatus oxidativo diferente según su severidad y de estos respecto de los sujetos sanos, fenómeno que avala la idea de la utilización de los biomarcadores de estrés oxidativo como indicadores del estadio y pronóstico de esta patología.

Abreviaturas

ABREVIATURAS

AEDN: deficiencia antioxidante enzimática

AEXD: Deficiencia antioxidante extracelular

AGEs: Productos finales de glicación (glicosilación) avanzada

AP-1: Proteína activadora 1

ASGD: Deficiencia global de los sistemas antioxidantes

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro

CAT: Catalasa

EH: Enfermedad de Huntington

EROs: Especies reactivas del oxígeno

ERNS: Especies reactivas del nitrógeno

GDNF: Factor neurotrófico derivado de la glía

GOS: Estrés oxidativo global

GSH: Glutación reducido

GPx: Glutación peroxidasa

GRd: Glutación Reductasa

GSSG: Glutación oxidado

GST: Glutación-S-transferasa

GT: Glutación total

HD: Acrónimo inglés de Enfermedad de Huntington

HIF-1 α : Factor 1 alfa inducible por hipoxia

HURS: Hospital Universitario Reina Sofía

htt: Proteína huntingtina

IFN- γ : Interferón gamma

IgG₁: Inmunoglobulina G₁

IL: Interleuquina

LDH: Lactato deshidrogenasa

LPO: Productos de lipoperoxidación

MPO: Mieloperoxidasa

NAD(P)H: Nicotinamida adenina dinucleótido (fosfato) reducido

NO: Óxido nítrico

NOS: Óxido nítrico sintasa

NF-κβ: Factor nuclear kappa beta

NGF: Factor de crecimiento nervioso

Nrf2: Factor 2 relacionado con NF-E2

NT: Nitrotirosina

8OHdG: 8-desoxi-2-hidroxiguanosina

PAO: Actividad antioxidante plasmática

PCR (CPR): Proteína C reactiva

RAGEs: Receptores para AGEs

RL (FR): Radicales libres

SOD: Superóxido dismutasa

TNF-α: Factor de necrosis tumoral alfa

Trx: Tiorredoxina-1

TrRd-1: Tiorredoxina reductasa-1

UCO: Universidad de Córdoba

UHDRS: Escala unificada de rangos de la enfermedad de Huntington

VSG: Velocidad de sedimentación globular

VCAM-1: Molécula de adhesión vascular-1

VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular

WBC: Células blancas sanguíneas

Introducción

1. Introducción

1.1. *Enfermedad de Huntington*

Considerada como enfermedad rara, presenta una prevalencia $< 1/10.000$, la enfermedad de Huntington fue conocida durante mucho tiempo como “baile o mal de San Vito”, Se trata de una enfermedad neurodegenerativa progresiva, hereditaria y autosómica dominante. Durante varias décadas fue denominada como corea de Huntington, hasta que en los estudios desarrollados durante las décadas de los ochenta y noventa se comprobó que no sólo presentaba un cortejo coreico sino muchos otros síntomas y signos no-motores, momento que pasó a ser conocida como enfermedad de Huntington.

Debe su nombre al médico estadounidense George Huntington (1850-1916), quién dio a conocer con detalle sus características y manifestaciones. Sin embargo, fue Waters quién en 1842 la describió por vez primera. Aunque, probablemente existieran ya descripciones menos completas y exhaustivas con anterioridad (Walker, 2007).

La enfermedad puede manifestarse a cualquier edad, habitualmente los primeros síntomas acontecen entre los 30-40 años, existiendo una versión juvenil de inicio precoz a los 20 años, menos común (Ribai et al., 2007).

La enfermedad de Huntington se caracteriza por la alteración en la configuración de la proteína huntingtina, y se encuentra agrupada dentro de

Introducción

las enfermedades neurodegenerativas conocidas como enfermedades poliglutamínicas, poliQ, de expansión del triplete o enfermedades de conformación proteica (Ramsey et al., 2007). Este defecto se encuentra englobado en el epígrafe de las denominadas mutaciones dinámicas. Como puede deducirse de lo comentado, el trastorno genético consiste en la expansión (repetición) del triplete CAG que codifica para el aminoácido glutamina (Gln o Q), de ahí que la secuencia de glutaminas se denomine poliglutamina, poli Q o cola poli Q. (Leznicki, 2005).

Las enfermedades poliglutamínicas comparten las siguientes características:

- Aparición de síntomas cuando se supera un umbral de repeticiones CAG (propio para cada una de ellas y en correlación inversa con la edad de aparición de la enfermedad).

- Elongación repetitiva de un triplete de nucleótidos, determinante de su inestabilidad somática e intergeneracional.

- A pesar de su ubicua expresión, afectación primordialmente de tejido nervioso (neuronas y glía).

- Formación de agregados proteicos intracelulares, que pueden ser citoplasmáticos y/o intranucleares. (Leznicki, 2005).

1.1.1 La proteína huntingtina

La huntingtina es una proteína que posee un segmento poliQ a partir del residuo 17, seguido de un segmento de repeticiones de prolina, cerca del extremo *N*-terminal (Cattano et al., 2005). El segmento poli Q puede contener de 5 a 30 repeticiones CAG; en función de ello, la proteína presenta un tamaño aproximado de 3.136 aminoácidos y una masa molecular de 348 kDa. El gen que la codifica (*IT15*) se encuentra en el brazo corto del cromosoma 4 (4p16.3) y fue caracterizado en 1993. (Huntington, 2007), (The Huntington's Disease Collaborative, 1993).

Dicha proteína contiene múltiples regiones que son importantes para la interacción con otras proteínas, entre ellas HAP-1, HIP-1, HIP-2, gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa y calmodulina. (Nasir et al., 2000). Está presente en el núcleo, citoplasma, dendritas, terminaciones nerviosas de neuronas, así como asociada a numerosos orgánulos, como el aparato de Golgi, retículo endoplásmico y mitocondria. Se expresa de forma ubicua, y se encuentra tanto en el sistema nervioso (neuronas y glía) como en una gran variedad de tejidos (hígado, páncreas, testículos, etc.). Se han evidenciado diferentes dimensiones en la elongación del triplete CAG en los tejidos estudiados o áreas cerebrales analizadas. Así, dentro del tejido nervioso su longitud es menor en el cerebelo respecto de la corteza frontal y estriado (Strong et al., 1993).

Introducción

Diferentes estudios han puesto de manifiesto las múltiples funciones que se le atribuyen a la proteína huntingtina, incluyendo de forma general: (Landles et al., 2004).

- Participación en el desarrollo embrionario de vertebrados.
- Comunicación interneuronal.
- Regulación transcripcional.
- Transporte intracelular.
- Degradación celular.

En condiciones normales, el número de repeticiones del triplete CAG oscila entre 5 a 30 veces (rango normal: 11-27). Los sujetos que contienen 31-35 glutaminas se consideran pre-mutacionales, mientras que en los pacientes con enfermedad de Huntington los residuos contienen más de 35 y en la mayoría de los casos 38 glutaminas (Li et al., 2004).

En 1987, se demostró que era la primera enfermedad genética humana con una penetrancia completa, (Wexler et al., 1987). Así, una cola poli Q de 29-34 glutaminas (premutación) no desarrolla fenotipo de enfermedad de Huntington, pero incrementa el riesgo de su aparición en la siguiente generación a través de la meiosis, mientras que colas poli Q con 35-39 glutaminas desencadenan la enfermedad con una penetrancia variable o incompleta, aumentando en las generaciones siguientes (Kiebertz et al., 1994). Todo esto se debe a la inestabilidad en la replicación cuando el número

de tripletes es igual o superior a 28. (Walker, 2007). También, se ha observado una mayor inestabilidad durante la espermatogénesis respecto de la ovogénesis, hecho que en parte explicaría por qué es más común esta enfermedad en la descendencia cuando el portador de la alteración es el padre (Kimura et al., 2007). Adicionalmente, se conoce que la presencia de más de 40 residuos en la cola poli Q desencadena una penetrancia completa, mientras que una elongación superior a 60 es característica de las denominadas formas juveniles con inicio de la enfermedad entre los 2 y los 20 años (Bruyn, 1968).

Estos datos, junto con otros, han llevado al establecimiento de una estrecha relación entre el número de glutaminas, la intensidad del proceso y la edad de aparición de la enfermedad, que es más grave y más precoz cuantas más repeticiones presente la cola poli Q (Leznicki et al., 2005).

Diferentes estudios revelan que la longitud de la cadena poli Q parece inducir cambios conformacionales en la proteína, lo que propicia la agregación tanto citosólica como nuclear, y con ello altera su función, recambio y, finalmente, induce toxicidad (Bennett et al., 2007).

La huntingtina mutada se diferencia principalmente de la proteína huntingtina no mutada en varios aspectos:

- Se presenta principalmente como acúmulos en el núcleo, aunque también muestra inclusiones en el citoplasma.

Introducción

– Altera sus interacciones con diferentes proteínas, tales como HAP-1, HIP-1 e HIP-2 (Mattson, 2002).

– Pierde la capacidad de inducir el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF).

– Disminuye la supervivencia neuronal e induce la muerte celular.

– No se une al factor citosólico REST/NRSF ((Weiss et al., 2008; Zuccato et al., 2011).

El mecanismo que puede implicarse en la aparición de los agregados intranucleares y citoplasmáticos de huntingtina mutada no se ha establecido aún con claridad. Sin embargo, se piensa que un cambio conformacional disminuye la susceptibilidad de ésta a ser degradada por el sistema ubiquitina-proteasoma lo que facilita la formación de sus depósitos (Bennett et al., 2007).

Por otro lado, se ha descrito que la degradación de huntingtina mutada por proteasas causa la aparición de fragmentos que facilitan la formación de agregados (Gil et al., 2008). Basándose en esto, algunos autores ponen en evidencia que los agregados formados por fragmentos pequeños pueden ser más tóxicos que los originados por fragmentos más grandes (Gong et al., 2008). De tal forma que, por este y otros mecanismos, la proteína huntingtina mutada puede afectar a proteínas nucleares y citoplasmáticas que regulan factores de transcripción, supervivencia, neurogénesis, apoptosis, función mitocondrial, supresión tumoral, liberación de vesículas, proteólisis, degradación de proteínas, neurotransmisores y

transporte axonal. (Gil et al., 2008). Por el contrario, estudios realizados por el grupo de Arrasate y col. sugieren que los cuerpos de inclusión son una respuesta celular protectora frente a la huntingtina mutada, mediada en parte por la mejora de la degradación intracelular de proteínas. (Arrasate et al., 2004).

1.2. Estrés oxidativo

El oxígeno es indispensable para los organismos animales, sin embargo, en cierto modo, también es tóxico en determinadas condiciones y circunstancias. En 1777, Carl Wilhelm Sheele, describió por primera vez los efectos nocivos del oxígeno sobre los seres vivos y a finales del siglo XIX Paul Bert realizó los primeros experimentos controlados que demostraron su efecto tóxico sobre los organismos.

Dicha toxicidad del oxígeno se explica debido a la formación de las especies reactivas del oxígeno (ERO). Las ERO son derivados del oxígeno. Incluyen tanto especies radicales como no radicales que participan en la iniciación o propagación de una reacción en cadena. A pesar del papel fisiológico que desempeñan algunas especies activadas de oxígeno, también pueden dar lugar a reacciones de oxidación indeseadas, contra las cuales los organismos han tenido que desarrollar defensas antioxidantes (Halliwell, 1996). La formación de cierta tasa de radicales libres es un proceso normal e inevitable, ya que son producto de infinidad de reacciones químicas

Introducción

imprescindibles para la vida celular, pudiendo originarse como producto de desecho de una reacción química dada o como producto con una función bioquímica en el organismo. Fridovich afirma, que el oxígeno molecular es tóxico virtualmente para todas las formas de vida, y esta toxicidad se hace patente a concentraciones significativamente superiores a las ambientales, siendo nuestro margen de seguridad muy estrecho.

Cuando la capacidad de los mecanismos antioxidantes se ve superada por las agresiones oxidativas, se da la situación denominada estrés oxidativo y depende no sólo de la agresividad química del propio oxidante, sino también de la cantidad de estos, del tiempo de exposición, del tipo de tejido que sufra el efecto y de la eficacia de las defensas antioxidantes disponibles. En general, un estímulo oxidante de baja intensidad hace que una célula pueda resistir luego condiciones más oxidantes. Sin embargo, las ERO que se producen en cualquier estado fisiológico, producen continuamente daño al ADN, a las proteínas y a los lípidos. Así, se pueden detectar en individuos sanos bases nitrogenadas alteradas en el ADN, aminoácidos modificados en las proteínas y peroxidación de lípidos.

Los radicales libres son especies químicas (moléculas o átomos) que contienen electrones desapareados en su orbital más externo, y pueden tener tanto carga positiva como negativa, o ser neutros. El número total de electrones en los radicales libres es impar y ello les hace muy inestables y muy reactivos ya que tienden a eliminar los electrones solitarios para mantener su estabilidad, por el contrario, la mayoría de las sustancias del

organismo contienen sólo electrones apareados y suelen ser, por tanto, químicamente estables. El radio de acción de los radicales libres en general es muy reducido, acostumbran a agredir a moléculas que tienen a su alrededor.

En condiciones normales, el efecto de los radicales libres del oxígeno es controlado por diferentes sistemas y mecanismos antioxidantes, los cuales, intervienen en distintas fases de las reacciones productoras de dichos radicales, desviándolos u orientándolos hacia productos inertes, también existen sustancias denominadas “atrapadores de radicales libres”, del inglés *scavenger*, susceptibles de enlentecer considerablemente las reacciones de oxidación en cadena. Cuando se produce el desequilibrio entre sustancias prooxidantes y antioxidantes a favor de las primeras, el resultado es un daño oxidativo, que puede afectar a diversas moléculas, pudiéndose reflejarse en sus funciones fisiológicas (Sies, 1986).

La capacidad que presentan las ERO de oxidar macromoléculas biológicas tales como el DNA, proteínas y lípidos contribuyen a la patogénesis de una variedad de enfermedades (Vaughan, 1997).

Se puede decir que los radicales libres son los últimos patógenos que han surgido en el panorama médico, siendo la bioquímica de éstos una parte esencial de su estudio en farmacología, toxicología humana, ciencias del medio ambiente y biología celular. El daño causado por dichos radicales es un factor importante que participa en procesos como inflamación crónica,

Introducción

patología cardiovascular, neoplasias, enfermedades neurodegenerativas, incluyendo el Parkinson, Alzheimer, Huntington, esclerosis múltiple, epilepsia, procesos respiratorios, envejecimiento, dermatopatías, intoxicaciones, neurogeriátrica, oftalmología, diabetes, procesos reumáticos, trastornos digestivos, síndrome metabólico, etc. (Frisard et al., 2006). El cerebro presenta bajos niveles de defensas antioxidantes, alto contenido en lípidos, especialmente ácidos grasos insaturados y catecolaminas, las cuales son susceptibles al ataque de ERO.

1.2.1 Antioxidantes

Son sustancias que a bajas concentraciones respecto a un sustrato oxidable, retardan o previenen la oxidación de dicho sustrato. Son considerados buenos antioxidantes aquellos que previenen la formación de radicales libres en cantidades perjudiciales, los que estimulan mecanismos de reparación endógena al daño causado por el ataque de radicales libres y los que suministran entidades químicas que aumentan la capacidad endógena de secuestro de radicales libres.

El primer estudio sobre antioxidantes fue llevado a cabo en 1922 por Moreau y Dufraise al descubrir que las reacciones de oxidación son detenidas por determinadas sustancias. La industria alimenticia también estimuló el desarrollo del estudio de los antioxidantes con el fin de evitar las oxidaciones de los materiales alimentarios. Así, se descubrió y sintetizó la vitamina E o alfa-tocoferol. Posteriormente Szent-György descubrió la vitamina C (ácido

ascórbico), así como los efectos antioxidantes del ácido úrico, glutatión y otras moléculas. De Duve describió que los peroxisomas (orgánulos celulares que desempeñan un papel importante en la detoxificación de diversos productos) son ricos en la enzima catalasa, cuya función es la de disputar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular.

Otro hito importante en el estudio del papel de los radicales libres (RL) en biomedicina fue el descubrimiento en 1968 por McCordy y Fridovich de las superóxido dismutasa (SOD), enzima que acelera la dismutación del anión superóxido en peróxido de hidrógeno y O_2^4 . Seguidamente, se conoció el papel de la glutatión peroxidasa (GPx), enzima citosólica e intramitocondrial dependiente de selenio y encargada de degradar la mayor parte del peróxido de hidrógeno, en presencia de glutatión reducido (GSH), en agua y en glutatión oxidado (GSSG).

Glutatión reducido (GSH)

El glutatión reducido (gamma-glutamil-cisteinil glicina es la fuente más abundante de tioles (compuestos con grupo –SH) no proteicos en las células (más del 90%), en su estructura presenta dos características fundamentales, en primer lugar la presencia de un grupo tiol en la cisteína, y en segundo lugar la presencia de un enlace gamma-peptídico que lo hace resistente a las peptidasas de la célula, las cuales solo actúan sobre los enlaces alfa-aminoacilo. Este enlace gamma-glutamilo entre el glutamato y la cisteína sólo es

Introducción

hidrolizable por la enzima gamma-glutamil transpeptidasa, presente en la membrana plasmática.

Se trata de un tripéptido formado por los aminoácidos: ácido glutámico, glicina y cisterna (Glu-Gly-Cys)

El contenido de GSH en los distintos tejidos varía dependiendo de la función del tejido. Su contenido en la dieta no influye en los niveles celulares de GSH ya que este tripéptido es degradado en el intestino delgado.

La síntesis y degradación de GSH forma el ciclo del gamma-glutamilo. El GSH es sintetizado en el hígado por la acción de dos enzimas, gamma-glutamil cisteína sintetasa y la glutatión sintetasa. La gamma-glutamil cisteína sintetasa es la etapa limitante en la síntesis de GSH y es inhibida por el glutatión mediante un mecanismo de retroalimentación negativa. La cisteína es el sustrato limitante de la reacción de síntesis del GSH, de forma que aumentando la disponibilidad de cisteína mediante la administración de N-acetilcisteína se aumenta su concentración intracelular. También, la síntesis de GSH puede realizarse mediante la internalización al interior de la célula de la gamma-glutamil cisteína extracelular, para ser reducida en la célula y formar cisteína y gamma-glutamil cisteína. Estas son sustrato para la gamma-glutamil cisteína sintetasa y para la GSH sintetasa respectivamente (Meister et al., 1983).

El GSH, una vez sintetizado, se transporta a los tejidos a través de la sangre. La degradación del GSH tiene lugar fuera de la célula y es llevada a

cabo por la gamma-glutamil transpeptidasa y por las dipeptidasas. Los sustratos para la degradación pueden ser tanto el GSH, como el GSSG como S-conjugados del GSH.

Algunos autores han postulado que el ciclo del gamma-glutamilo es un sistema de transporte de aminoácidos a través de la membrana. Esta forma de transporte se ha corroborado en eritrocitos, en riñón y en otros tipos celulares y tejidos (Meister et al., 1983).

Una función importante del GSH es su capacidad antioxidante, interactúa fácilmente con una amplia gama de RL cediendo un protón. Una de las funciones antioxidantes más importantes del GSH es la eliminación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y peróxidos orgánicos en la reacción catalizada por la GPx, en la que dos moléculas de GSH donan dos átomos de hidrógeno para dar lugar a glutatión oxidado (GSSG), el cual posteriormente es reducido por la glutatión reductasa (GRd) para restaurar el GSH. La concentración de GSSG en la célula se mantiene a niveles muy bajos.

También está implicado en la reducción de varios antioxidantes celulares como por ejemplo la vitamina E y el semidehidroascorbato (radical de la vitamina C), en la síntesis de DNA, como almacén y forma de transporte de cisteínas (Meister et al., 1983). La cisteína, incluso a concentraciones no excesivamente altas, es tóxica para la célula. Una forma de almacenar tioles no proteicos es hacerlo en forma de glutatión, en lugar de cisteína. En la detoxificación de xenobióticos, como la metabolización del paracetamol, con lo

Introducción

que el tratamiento con metionina y N-acetil cisteína por vía oral podría estar indicado en el tratamiento de la hepatotoxicidad por paracetamol, en el control del crecimiento celular (Terradez et al., 1993) en la regulación de la apoptosis (Esteve et al., 1999) y en la síntesis y degradación de proteínas, de forma que las fases de iniciación y elongación del proceso de traducción que tienen lugar en la síntesis proteica se inhiben cuando el GSH se oxida.

Los responsables de la inhibición de la síntesis proteica pueden ser tanto la depleción del GSH, como el incremento del GSSG como ambos a la vez. Por otra parte, el GSH contribuye al mantenimiento del estado redox celular, al cual son sensibles las proteínas. Estas cambian su función y conformación ante cambios en el estado redox, siendo más susceptibles de degradación cuando éste es más oxidante (Dröge, 2002).

Por tanto, y debido al cambio de conformación que pueden sufrir algunas proteínas enzimáticas que alteran su función, el GSH, en la medida en que mantiene los tioles proteicos de aquellas permite mantener la conformación y regular la actividad enzimática de enzimas metabólicas importantes, evitando la formación de disulfuros mixtos y puentes disulfuro.

Además, el GSH actúa como cofactor para algunas enzimas, como la glioxalasa I y II, en las cuales el GSH se consume en la primera reacción y se regenera en la segunda.

Glutación reductasa

La GRd es una flavoenzima dependiente del nicotinamín adenín dinucleótido fosfato reducido (NADPH) que cataliza la reducción del GSSG a GSH el cual será utilizado por la GPx para la reducción del H_2O_2 y de lipoperóxidos (L-OOH). Se puede decir que específicamente, tiene una función de pivoteo en el estrés oxidativo. Esta se encuentra en todos los organismos aeróbicos. Dicha enzima juega un papel importante en la defensa antioxidante y debido a su presencia en los diferentes tejidos y órganos está involucrada en la fisiopatología de varias enfermedades.

Se trata de una enzima homodimérica compuesta por 2 subunidades idénticas entre sí unidas por un puente disulfuro. Ambas subunidades presentan residuos esenciales que contribuyen a los sitios activos y de unión al GSSG, por lo que no presenta actividad enzimática en su forma monomérica ya que su sitio de unión para el sustrato y su sitio catalítico están compuestos por residuos de ambas subunidades.

El sistema antioxidante GPx/GRd está relacionado con otros sistemas antioxidantes como el superóxido dismutasa/catalasa (SOD/catalasa). Se ha observado que ambos sistemas no actúan a la par, la CAT actúa en presencia de altas concentraciones de peróxido de hidrógeno y a bajas concentraciones actúa la GPx. La actividad de la catalasa y de la GPx está inversamente correlacionada, mientras que la catalasa y la GRd presentan correlación positiva.

Introducción

La GRd permite mantener concentraciones de GSH en la célula no sólo para ser utilizado por la GPx en la eliminación del peróxido de hidrógeno ya que el GSH es de utilidad en la recuperación de las vitaminas C (ácido ascórbico) y E (alfa-tocoferol), además de participar en la eliminación de radicales libres. Así, la alteración de la actividad de la GRd provocará disminución en las concentraciones de GSH dando lugar a un aumento en los niveles de ERO.

La unión no enzimática de azúcares a proteínas (glucación) es un fenómeno biológico común que está incrementado en la diabetes. La GRd es susceptible de ser glucosilada y desarrollar una actividad alterada. La enzima puede ser protegida de la glucosilación por algunos medicamentos como la aspirina, que pueden ser usados para prevenir las cataratas en el diabético.

Se plantea que la ingestión de dietas ricas en grasa favorece la disminución de la actividad de la GRd así como de la GPx, indicando que, dietas altas en grasas y en colesterol inducen un desbalance de la defensa antioxidante lo cual provocará un aumento de la peroxidación lipídica.

Glutation peroxidasa

La GPx es responsable de la eliminación de peróxido de hidrógeno e hidroperóxidos de los lugares con bajos contenidos en catalasa o sin catalasa (Voetman et al., 1980) y limita igualmente la propagación de radicales reduciendo los peróxidos (ROOH) inestables en ácidos grasos hidroxilados

(ROH[•]). Reduce los hidroperóxidos utilizando glutatión como agente reductor, aunque las de hidroperóxidos de fosfolípidos pueden utilizar tiorredoxina, glutaredoxina o tioles proteicos como fuente de poder reductor.

Los mamíferos tienen varios tipos: citosólica (GPx1), gastrointestinal (GPx2), plasmática (GPx3) y la de hidroperóxidos de fosfolípidos (GPx4) (Brigelius-Flohé, 1999). Son homotetrámeros con la excepción de la GPx4 que es un monómero de tamaño menor al de las subunidades de las otras glutatión peroxidadas. La GPx de hidroperóxidos de fosfolípidos es capaz de actuar sobre los fosfolípidos de las membranas celulares y de las lipoproteínas, además de los hidroperóxidos de timina y de ésteres de colesterol. Además, esta enzima se requiere durante la espermatogénesis (Maiorino et al., 2002). Se trata de una enzima dependiente de selenio (Se), que acelera el paso del peróxido de hidrógeno a agua en presencia de GSH. La GPx citosólica es la enzima más abundante sobre todo en los eritrocitos, el hígado, los riñones y los pulmones. La GPx plasmática no sólo está en el plasma sanguíneo sino que en la mayoría de secreciones corporales. Se sintetiza en el riñón y de ahí es liberada a la sangre. La GPx gastrointestinal sólo se encuentra en el epitelio del tracto digestivo y en el hígado.

Los principales mecanismos de acción característicos de la GPx son: Su amplia especificidad con respecto a los hidroperóxidos, su alta especificidad para el glutatión, la selectiva inhibición por yodo-acetato de la unión enzima-sustrato, su cinética de vaivén y el carácter esencial de la

Introducción

presencia de selenio en su grupo funcional para que desarrolle actividad enzimática.

Superóxido dismutasa

La superóxido dismutasa (SOD) fue descubierta en 1968, utilizándose para tratar la artritis en adultos, problemas respiratorios en niños y como una terapia coadyuvante en el tratamiento del cáncer. La SOD es un mecanismo de defensa de las células para atrapar a los radicales libres y prevenir enfermedades (Orr et al., 1994). Forman un conjunto de enzimas citoplasmáticas que no se encuentran en las células anaerobias obligatorias. Debido a que la función fisiológica de las SOD es la eliminación de los radicales superóxidos, producidos en las reacciones del metabolismo aeróbico. En el hombre hay dos SOD, una que se encuentra en el citoplasma y otra en el espacio intermembranoso mitocondrial cuya parte activa contiene cobre (Cu) y zinc (Zn) y otra que contiene manganeso (Mn).

Las concentraciones de SOD son muy bajas o nulas en el plasma. Su acción consiste en acelerar considerablemente la dismutación del ión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en peróxido de hidrógeno, impidiendo así la coexistencia de las dos especies y por tanto la producción de radical hidroxilo, debe hallarse obligatoriamente asociada a las de las catalasas/peroxidasas.

El superóxido junto con el óxido nítrico genera peroxinitrito, el cual es principalmente responsable de la muerte de las células. Debido a que el

superóxido es tan potencialmente dañino, la SOD existe en 2 formas en la célula. En las mitocondrias, las cuales son las estructuras productoras de energía de la célula, la SOD está presente como un enzima que contiene manganeso. En el citoplasma de la célula, el cobre y el zinc son los metales principales encontrados en la estructura de la SOD. La presencia de la SOD en ambos lugares, en la mitocondria y el citoplasma asegura que mucho del superóxido sea convertido en peróxido de hidrógeno.

Catalasa

La catalasa (CAT) es una de las enzimas más abundantes en la naturaleza y se encuentra ampliamente distribuida en el organismo humano, aunque su actividad varía en dependencia del tejido; ésta resulta más elevada en el hígado y los riñones, más baja en el tejido conectivo y los epitelios, y prácticamente nula en el tejido nervioso. A nivel celular se localiza en las mitocondrias y los peroxisomas, excepto en los eritrocitos, donde se encuentra en el citosol.

Es una metaloproteína tetramérica, que consta de 4 subunidades idénticas que se mantienen unidas por interacciones no covalentes (Hadju et al., 1977). Como parte del sistema antioxidante está involucrada en la destrucción del H_2O_2 generado durante el metabolismo celular. Esta enzima se caracteriza por su alta capacidad de reacción pero relativamente poca afinidad por el sustrato.

1.2.1 Estrés oxidativo y vías de señalización

El estrés oxidativo puede modular una amplia variedad de procesos biológicos por señales en la superficie celular con cambios en la expresión de genes. Se sugieren múltiples vías de señalización. De hecho los EROs pueden ser definidos como un verdadero segundo mensajero que regula varias cascadas de señales de transducción de factores de transcripción nucleares, incluyendo la modulación de la señal del Ca^{2+} , vías de la proteína quinasa y fosfatasa (Palmer et al., 1997).

Algunos procesos de oxidación son reversibles y pueden jugar un papel en la regulación dinámica de eventos como resultado en la variación de la condición redox dentro de la célula. Tales variaciones pueden causar cambios en las proteínas de señalización y modificar vías transduccionales. Los EROs en general y el peróxido de hidrógeno en particular, son segundos mensajeros para varios estímulos fisiológicos y patológicos, tales como citoquinas inflamatorias, angiotensina, factores de crecimiento, radiación ionizante etc. (Abe et al., 1998). Por ejemplo, el factor de crecimiento derivado de plaquetas incrementa los niveles de peróxido de hidrógeno intracelular en células musculares vasculares lisas e induce la fosforilación de tirosina y la estimulación de la quinasa serina/treonina (Suzuki et al., 1997). La proteína-G Ras actúa como un mediador de la señal de EROs, activando una cascada de quinasas, incluyendo diversos miembros de la familia de la MAP-quinasa (Irani et al., 1997). En el caso de ERK5 o BMK1 (gran MAP-quinasa), el

peróxido de hidrógeno parece ser un activador exclusivo (Abe et al., 1997). La homocisteína es un factor de riesgo independiente para la aterosclerosis que induce estrés oxidativo (Loscalzo, 1996).

Estas observaciones sugieren que los ERO pueden mediar vías de señalización específicas dentro de la célula, así como, las proteínas pueden ser diferentemente sensibles a la oxidación dependiendo de su contenido en residuos de cisteína, su conformación y la intensidad de estrés oxidativo (Sundaresan et al., 1995). Por lo tanto, la posible señal específica puede ser mediada por el estrés oxidativo. Diferentes agentes inducen estrés oxidativo para estimular la actividad de la tirosina quinasa, inducir fosforilación en residuos tirosina y activar a la proteína quinasa C, c-Src, raf-1 y MAPK (Sundaresan et al., 1995). Baas y Berk demostraron que el radical superóxido incrementa la actividad de la MAPK en células musculares lisas vasculares. Tratamientos con antioxidantes inhiben la generación de radicales superóxidos y bloquean la activación de la MAPK.

1.3. Enfermedad de Huntington y estrés oxidativo

El estrés oxidativo desempeña un papel importante en la patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica, la esclerosis múltiple, etc. (Sorolla et al, 2008).

Introducción

En el caso de la enfermedad de Huntington, los estudios ponen de manifiesto la presencia de estrés oxidativo, tanto en pacientes como en modelos con roedores. Dicho estrés oxidativo se caracteriza por un aumento en el daño al ADN (8OHdG) (Browne et al., 2006,1997), a las proteínas (grupos arbonilos y nitración de proteínas) (Sorolla et al., 2008), y a los lípidos (malondialdehído, 4-hidroxinonenal y sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico), y una disminución en el contenido de glutatión reducido, (Gil et al., 2008), así como un incremento en las enzimas antioxidantes como GPx, CAT y SOD (Santamaría et al., 2001).

Según los datos disponibles, el desequilibrio oxidativo acontece antes de la aparición de los síntomas, lo que evidencia que el estrés oxidativo es un evento primario y no un fenómeno secundario al daño y muerte celular en este proceso, situación que avala el hecho de que las especies reactivas, tanto del oxígeno como del nitrógeno, desempeñan un papel central en la neurodegeneración, (Guimaraes et al., 2009). Adicionalmente, se demostró la existencia de una correlación entre la gravedad de la enfermedad –según la *Unified Huntington's Disease Rating Scale*– y los niveles de malondialdehído, lo que indica su posible potencial como biomarcador. Este mismo grupo evidenció la existencia de una correlación entre el número de tripletes CAG en el ADN mitocondrial de leucocitos de estos pacientes y la gravedad de la enfermedad, lo que apunta la posibilidad de que la longitud de repeticiones CAG pueda servir como índice de las enfermedades poli Q, de manera especial de la enfermedad de Huntington. (Liu et al., 2008).

Por otro lado, se detectaron niveles reducidos de BDNF en suero de pacientes con la enfermedad de Huntington (Ciammola et al., 2007), que pueden ser regularse como respuesta al estrés oxidativo y la producción de especies reactivas (Wang et al., 2006). Estudios experimentales manifestaron una importante relación e interacción entre el tamaño de expansión de la cola poli Q, niveles de proteína huntingtina mutada, incremento de metabolitos tóxicos y mecanismos de toxicidad (estrés oxidativo, sucesos inflamatorios, etc.) que delimitan tanto manifestaciones clínicas (penetrabilidad) de la enfermedad como deterioro asociado a ella (Pérez-De la Cruz V, 2007). Así, la intensidad de las modificaciones oxidativas es proporcional al número de repeticiones CAG en el polipéptido huntingtina-poli Q.

El daño oxidativo observado en estos pacientes puede atribuirse a la presencia de la huntingtina mutada. Así, los depósitos de huntingtina mutada provocan un incremento en los niveles de especies reactivas del oxígeno en neuronas y células no neuronales, situación que guarda perfecta concordancia con la característica de que estos acúmulos proteicos funcionan como centros dependientes del hierro de estrés oxidativo.

Estudios bioquímico-moleculares muestran alteraciones en la función mitocondrial de pacientes con enfermedad de Huntington. Una de estas alteraciones afecta a la cadena de transporte electrónico, concretamente a los complejos II y III. Esta situación origina un descenso significativo en la oxidación del succinato en su transformación a fumarato por acción de la succinato deshidrogenasa, así como una reducción en la producción de la

Introducción

síntesis de adenosín trifosfato. Otros trabajos muestran afectación de los complejos I y IV de la cadena de transporte electrónico y del complejo piruvato deshidrogenasa. (Brouillet et al., 2005).

Con el fin de estudiar las posibles vías y mecanismos subyacentes en la patogénesis de esta enfermedad, además de analizar nuevas dianas terapéuticas, se han desarrollado modelos de neurodegeneración por neurotóxicos (Pérez-De la Cruz et al., 2007).

Para abordar los procesos de neurodegeneración acontecidos en el ser humano, como en la enfermedad de Huntington, son de gran utilidad y apoyo los modelos experimentales, tanto los que usan animales transgénicos como los inducidos por neurotóxicos, a pesar del salto filogenético que implica su uso.

Los modelos transgénicos desarrollan cuadros con gran similitud fenotípica, bioquímica y genética al ser humano, y muestran no sólo los cambios conductuales, tróficos y bioquímicos característicos, sino también las alteraciones genéticas implicadas y, en consecuencia, los depósitos de la proteína huntingtina mutada. Sin embargo, debemos tener presente su delicado manejo y su coste, así como el hecho de que existen diferentes modelos transgénicos que manifiestan diferencias entre ellos y, en algunas ocasiones, con el propio proceso humano. En la actualidad, se dispone de una gran variedad de modelos genéticamente manipulados (transgénicos):

– *Transgénicos propiamente denominados*: aquéllos que tienen incorporado en su genoma un fragmento de ADN exógeno con un número de copias en tándem y al azar (por ejemplo, YAC72, YAC128, R6/, R6/2). (Mangiarini et al., 1996). El R6/2 es uno de los más utilizados, ya que manifiesta una forma muy agresiva y similar a la variante juvenil.

– *Knock-in*: aquéllos en los que se ha sustituido un gen normal para la proteína huntingtina, insertándose una secuencia codificante o el gen completo para la huntingtina mutada en la localización exacta dentro del brazo corto del cromosoma 4, lo que le va a conferir otras propiedades determinadas (por ejemplo, CAG140) (Menalled et al., 2003).

– *Knock-out*: inactivación de los dos alelos de un gen.

Según nuestro conocimiento, estos modelos en roedores no muestran algunas de las alteraciones cerebrales (inclusiones nucleares y agregados de neuropilo) y modificaciones de la conducta (disonía y corea) que padecen los pacientes con esta enfermedad. Por ello, se han desarrollado modelos de primates no humanos transgénicos, utilizando al macaco *rhesus*, que adicionalmente reproduce modificaciones cerebrales y conductuales similares a las del ser humano (inclusiones nucleares, agregados de neuropilo, distonía y corea) (Yang et al., 2008).

Por su parte, los modelos inducidos mediante agentes neurotóxicos presentan como ventajas ser más económicos y más fácilmente manipulables, y reproducir cambios bioquímicos, moleculares y conductuales similares a la

Introducción

enfermedad estudiada. Al igual que los modelos transgénicos, también presentan algún inconveniente o limitación, como sería, principalmente, el no mostrar el defecto o la alteración genética. En el caso específico de los agentes neurotóxicos reproductores de un modelo similar a la enfermedad de Huntington (ácido quinolínic, ácido 3-nitropropiónico), no manifiestan la expansión del triplete CAG y, por lo tanto, los depósitos de proteína huntingtina mutada.

En el caso concreto de la enfermedad de Huntington, el modelo inducido por el ácido 3-nitropropiónico reproduce con fidelidad cambios conductuales y del comportamiento, así como bioquímico-moleculares y celulares similares a los acontecidos en esta enfermedad, excepto los depósitos citoplasmáticos e intranucleares de huntingtina mutada (Pérez-De la Cruz et al., 2007).

Estudios experimentales ponen de manifiesto que la excitotoxicidad guarda una estrecha relación con el estado oxidativo encontrado. Este binomio constituye la piedra angular de la patogénesis de este proceso patológico. Así, la excitotoxicidad desencadenada por glutamato en la enfermedad de Huntington se asocia a un incremento intracelular de ion calcio y ERO y ERN (Lafon-Cazal et al, 1993). Estudios en los modelos experimentales, anteriormente comentados, refuerzan estos datos, porque ponen de manifiesto este punto, así como el hecho de que la propia neurotoxicidad de los agentes disminuye el umbral de los receptores glutamatérgicos al glutamato, por lo que se requiere para su estimulación

menor concentración de este neurotransmisor. Esto implica que menores concentraciones de glutamato serían capaces de desencadenar el fenómeno de la excitotoxicidad. (Beal, 1994). Se trata éste de un punto de relevancia, debido a los resultados contradictorios obtenidos en los modelos experimentales, así como a la implicación de la vía corticoestriatal, que desempeña un papel importante en el desarrollo del fenotipo de dicha enfermedad (Cepeda et al., 2007). Es interesante tener presente que diferentes modelos de exón-1 son resistentes a la excitotoxicidad, probablemente debido a la activación de mecanismos compensatorios (Hansson et al., 1999). Por otro lado, en el caso de los YAC128, muestran una mayor sensibilidad a la excitotoxicidad, al menos en parte, por la vía de la muerte celular mediada por calpaína (Cowan et al., 2008).

La elevación de calcio intracelular se traduce en la activación de la óxido nítrico sintasa (NOS) neuronal o tipo I, y la consiguiente liberación de óxido nítrico (NO). El NO, un gas que actúa de segundo mensajero y que se ha involucrado en la plasticidad neuronal se transformará en peroxinitrito tras reaccionar con el anión superóxido procedente de la cadena de transporte de electrones, así como de otras reacciones redox, como la establecida por la NADPH-oxidasa o la xantino oxidasa. Dichos sucesos, junto con el metabolismo de la dopamina, que puede sufrir un proceso de autooxidación, inducen un desequilibrio entre los sistemas oxidantes/antioxidantes a favor de los primeros y caracterizado por una producción y liberación excesiva de

Introducción

ERO/ERN y un declive en los sistemas antioxidantes, tanto enzimáticos (SOD y GPx) como no enzimáticos (GSH) (Gil et al., 2008).

Recientes estudios han involucrado el estrés oxidativo presente en enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Huntington o la activación del factor de transcripción Nrf2. Este factor modula la expresión de los denominados vitagenes, genes conservados en la evolución filogenética de la especie y que regulan la expresión de proteínas antioxidantes de citoprotección de fase II, como tiorredoxina/tiorredoxina reductasa 1, glutatión-S-transferasa (GST), glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa 1. Dicho factor se encuentra secuestrado en el citoplasma por la proteína Keap1. Este complejo puede separarse, entre otros fenómenos conocidos, por la acción de las especies reactivas del oxígeno sobre Keap1 o por la fosforilación de Nrf2, lo que da como resultado la liberación citoplasmática de Nrf2 y su consiguiente translocación al núcleo, donde induciría la transcripción de proteínas antioxidantes.

Un reciente estudio muestra que la huntingtina mutada activa estos genes relacionados con la respuesta antioxidante/reductora vía Nrf2-ARE (van Roon-Mom et al., 2008). Está claro que en el curso natural y evolutivo de la enfermedad de Huntington esta respuesta es insuficiente, ya que, finalmente, se establece el daño oxidativo y la muerte neuronal. Sin embargo, tiene gran relevancia, ya que con ella se abren nuevas perspectivas para estrategias terapéuticas que puedan llevar a un retraso en el inicio de la enfermedad o a un enlentecimiento en su evolución, mejorando con ello las expectativas de

calidad de vida de los pacientes. Sin duda, y a la luz de las evidencias científicas, se requieren más estudios en esta línea.

Adicionalmente, Taherzadeh-Fard et al muestran evidencias de que el coactivador 1α de PPAR γ actúa como pieza clave en la protección neuronal frente al daño oxidativo involucrado en la patogénesis de la enfermedad de Huntington. (Taherzadeh-Fard et al., 2009). PGC- 1α induce la transcripción de programas celulares regulando la respiración mitocondrial, la defensa frente al estrés oxidativo y la termogénesis adaptativa situación que también posibilita la generación de nuevos focos calientes en los estudios de este proceso patológico.

Si bien son múltiples las vías implicadas, aún se desconoce, en parte, cuál es el papel desempeñado por cada una de ellas y la secuencia de aparición e inducción en la enfermedad de Huntington. Datos recientes ponen de manifiesto que el estrés oxidativo, ya sea causa o efecto, tiene un papel relevante y crucial en el curso y evolución de la enfermedad de Huntington, se ha asociado con los distintos estadios evolutivos de la enfermedad y puede utilizarse como marcador de la evolución-pronóstico de la enfermedad y de la efectividad terapéutica. Es también un foco de interés para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas en el tratamiento de la enfermedad de Huntington.

2. Estado actual del problema

La enfermedad de Huntington (HD, acrónimo de su nombre en inglés Huntington's disease), hereditaria y con una prevalencia baja (<10 pacientes/100000 habitantes), es catalogada como enfermedad rara. Se trata de un proceso neurodegenerativo autosómico dominante, que debe su nombre al Dr. George Huntington quién la describió en 1872. La enfermedad de Huntington es causada por la expansión de la secuencia del triplete citosina-adenina-guanina (CAG) presente en el exón 1 del gen que codifica el extremo de glutaminas para la proteína huntingtina (Johri y Beal, 2012; Tasset et al., 2009; Weir et al., 2012).

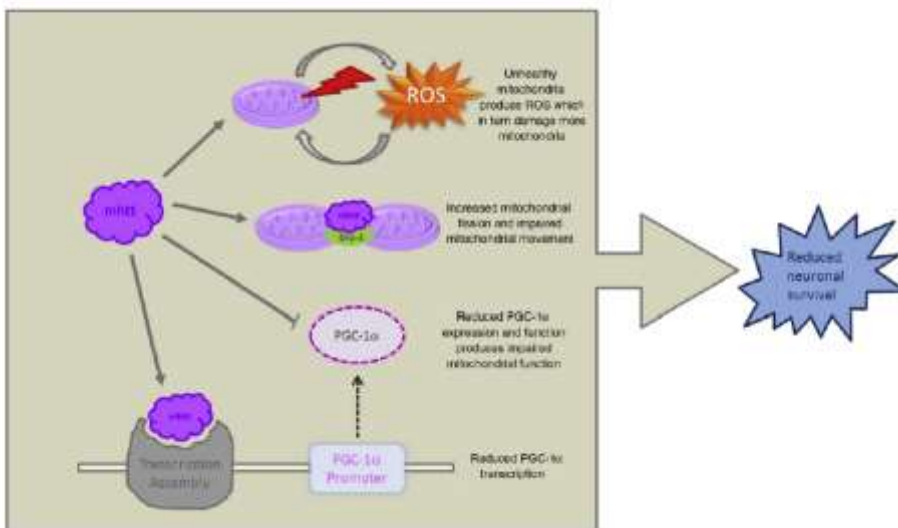
En la mayor parte de los casos, la enfermedad, se manifiesta con una penetrancia completa, es decir, expresa todo su fenotipo caracterizado por alteraciones motoras y cognitivas, con grados diferentes en el cambio de la personalidad y en los procesos psiquiátricos manifestados por los pacientes. Su inicio acontece entre los 30 y 50 años, mostrando una evolución progresiva que conduce a la muerte del paciente entre los 15 y 20 años después de su inicio (Johri y Beal, 2012; Tasset et al., 2009; Weir et al., 2012).

A día de hoy, las funciones de la proteína huntingtina no son conocidas con precisión y claridad en su totalidad. Si bien, es sabido que esta proteína presenta una distribución ubicua, participando en funciones como: transporte de vesículas, biogénesis mitocondrial, endocitosis, mitosis y

Estado actual del problema

señalización intracelular. Por su parte, la expansión del triple CAG conduce a la síntesis de una versión anómala (mutada) de dicha proteína, que se traduce en daño, degeneración y muerte de las neuronas del estriado y corteza cerebral. La proteína huntingtina mutada se ha involucrado en procesos neurotóxicos caracterizados por agregación de proteínas, excitotoxicidad, cambios en la expresión de los genes que codifican factores neurotróficos, especialmente BDNF, y alteración en el tráfico vesicular intracelular (Johri y Beal, 2012; Tasset et al., 2009; Weir et al., 2012).

Fig. 1.- Ciclo vicioso inducido por la proteína huntingtina mutada (mhtt)



(Tomada de Johri y Beal, 2012)

Diferentes estudios muestran una estrecha relación entre la proteína mutada y las alteraciones mitocondriales apreciadas en este trastorno, asociándose a incrementos en la expresión de proteínas involucradas en la fisión (Drp1 u Fis1) y reducción en la fusión (Mfn1, Mfn2, Opa 1 y Tomm40)

mitocondrial así como con el incremento de biomarcadores de estrés oxidativo (Johri y Beal, 2012; Tasset et al., 2009; Weir et al., 2012) (Fig.1).

2.1. Marcadores en la severidad y pronóstico de la enfermedad de Huntington

La enfermedad de Huntington es una enfermedad que no tiene cura y para la que existe muy pocos tratamientos sintomáticos. El diagnóstico clínico se realiza frecuentemente en base a los síntomas motores manifestados como fenotipo de la enfermedad, comúnmente en la cuarta década de la vida. Junto al deterioro motor también aparece un déficit psiquiátrico y un declinar de la capacidad cognitiva (Langbehn et al., 2004; Lee et al., 2012; Paulsen et al., 2008; Scout et al., 2011; Trabizi et al., 2009; Weir et al., 2011).

La identificación del gen responsable de la enfermedad de Huntington ha permitido la identificación de pacientes que aún no exhiben síntomas propios de la enfermedad pero que están en riesgo de sufrir la enfermedad. Todo ello ha hecho que el énfasis de las investigaciones cambie o potencie el conocimiento de marcadores que bien permitan evaluar aplicación de tratamientos o estrategias terapéuticas que retrasen o enlentezcan la aparición de los síntomas en pacientes prodrómicos, bien sirvan para dar seguimiento a la evolución de la enfermedad. Así, las investigaciones con pacientes prodrómicos permiten a los científicos obtener una información valiosa sobre la patogénesis por medio del estudio de la fenotipo-conversión,

Estado actual del problema

permitiendo una mejor comprensión de la enfermedad y el desarrollo de medidas de intervención que prevengan sus manifestaciones (Long et al., 2012; Ross and Tabrizi, 2011).

A pesar de los amplios conocimientos y avances conseguidos sobre los cambios clínicos en pacientes con enfermedad de Huntington, son muy pocos los estudios desarrollados y dirigidos a la consecución de biomarcadores útiles que permitan un seguimiento y monitorización tanto de la enfermedad como de la eficacia terapéutica.

El estudio PREDICT-HD (Neurobiological Predictors of Huntington's Disease), estudio observacional longitudinal, tiene como objetivo principal la identificación de biomarcadores biológicos y/o clínicos en pacientes con o sin sintomatología clínica a los que se les ha realizado pruebas genéticas para detectar posibles mutaciones en el gen responsable de la enfermedad de Huntington (Langbehn et al., 2010; Weir et al., 2011).

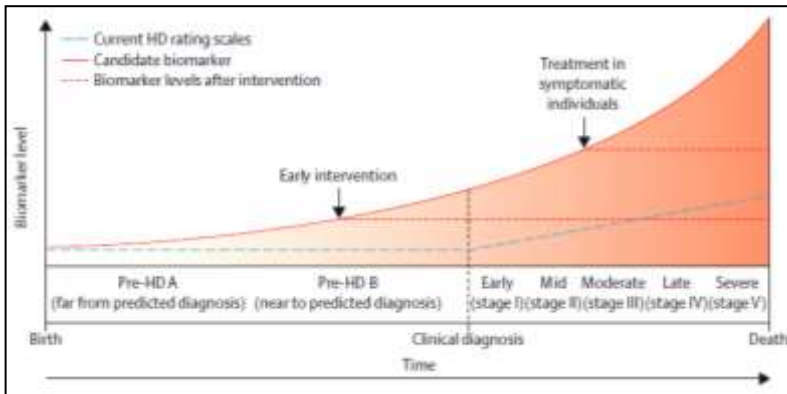
La complejidad del fenotipo clínico de estos pacientes, así como su relativa lenta evolución, ha llevado al uso de escalas clínicas subjetivas como la *unified Huntington's disease rating scale* (UHDRS). Éstas con frecuencia son insensibles para la detección de cambios sutiles en periodos cortos de tiempo (Henley et al., 2005). Por ello, la identificación de marcadores cuantificables para el diagnóstico y evolución de la enfermedad, especialmente en estadios tempranos de la misma, es un objetivo relevante e

importante para este área del conocimiento, así como una herramienta útil en el análisis de la eficacia de los tratamientos e instauración de los más efectivos, para el enlentecimiento del curso de la enfermedad.

Los biomarcadores pueden aportar información sobre el inicio y severidad del proceso. A diferencia de otras enfermedades neurodegenerativas como Parkinson, Alzheimer, etc., la enfermedad de Huntington presenta un excelente marcador, la expansión de repeticiones del triple CAG para el diagnóstico de la enfermedad. Sin embargo, éste no puede dar información sobre la evolución y pronóstico del proceso, ni sobre la eficacia de los diferentes medicamentos y procedimientos terapéuticos aplicados y/o en estudio. Como recoge Weir et al., en su artículo de revisión sobre el desarrollo de biomarcadores para la enfermedad de Huntington, el marcador ideal sería aquél que fuera fácilmente cuantificable y reproducible, permitiendo un seguimiento global del estado de la enfermedad (Weir et al., 2011) (Fig. 2).

Adicionalmente, éste debe tener poca variabilidad en la población control y no verse afectado por factores de comorbilidad no relacionados (Henley et al., 2005). A este respecto, son muchas las investigaciones desarrolladas para encontrar el/los más idóneo/s marcador/es.

Fig. 2.- Características ideales del marcador para la evaluación de la progresión de la enfermedad de Huntington.



(Tomada de Weir et al., Lancet Neurol 10:573-90; 2011)

En esta línea, han sido estudiados:

- i) **Marcadores clínicos:** Se trata de mediciones y escalas clínicamente estandarizadas con las que evaluamos la evolución de la enfermedad de Huntington en base a diferentes aspectos de su fenotipo, como deterioro cognitivo, neuropsiquiátrico y motor (Weir et al., 2011). Generalmente, son baratas y fácil de realizar, sin requerir complejos y sofisticados equipos. Además, ellos pueden proporcionar información y datos sobre la neurobiología del proceso y mejorar el conocimiento sobre la variabilidad fenotípica presentada por estos pacientes. El estudio y análisis de estos marcadores es foco de discusión y análisis en estudios longitudinales, multinacionales y observacionales a gran escala. En esta línea son diferentes los estudios que se están desarrollando dirigidos a la

identificación de variables que puedan predecir el inicio y evolución de la enfermedad. Entre ellos se encuentran los siguientes estudios: PREDICT-HD, TRACK-HD, COHORT y REGISTER, caracterizados por el importante número de pacientes incluidos: más de 1000, 366, 5000 y 7200 respectivamente (Tabrizi et al., 2011, 2012; Weir et al., 2011).

Los datos derivados de estos estudios muestran como las pruebas cognitivas pueden ser útiles para establecer si el sujeto se encuentra en la situación de paciente presintomático o en los inicios de la enfermedad, estableciendo una clara diferencia con el sujeto control (sano) (Duff et al. 2007; Tabrizi et al., 2011; Weir et al., 2011). Por otro lado, las pruebas motoras (control lingual y postural, entre otras) presentan una buena sensibilidad clínica correlacionada con el estadio de la enfermedad, según avala el estudio TRACK-HD (Bechtel et a., 2010; Henley et al., 2005; Weir et al., 2011).

Sin embargo, su uso queda limitado por la diferente sintomatología presentada por los pacientes y los cambios que ésta puede presentar en la evolución y progresión de la enfermedad. Por otro lado, este tipo de marcadores aportan poca luz sobre los mecanismos bioquímico-moleculares que subyacen en su patogénesis y que explicarían la variedad de fenotipos manifestados por los pacientes durante el inicio y evolución de su enfermedad.

Estado actual del problema

Otros estudios muestran como estos biomarcadores de alteración motora o cognitiva no guardan correlación con los cambios estructurales apreciados, mediante el uso de técnicas de imagen, a partir de los 12 meses de evolución. Además, los resultados pueden verse afectados por el estado de ánimo del paciente, la fatiga y la pericia del evaluador (Duff et al., 2007; Henley et al., 2005; Tabrizi et al., 2011). Por to ello, los resultados que se obtendrán a partir de los estudios longitudinales a gran escala que se están desarrollando serán cruciales para establecer con claridad la relevancia y correlación de este tipo de parámetros y con los diferentes estadios de la enfermedad, así como para reconocer el más sensible de ellos.

- ii) ***Marcadores de neuroimagen:*** Su uso deriva de su sensibilidad para detectar alteraciones estructurales y/o fisiológicas en personas sin sintomatología o en fase temprana de la enfermedad. A esto se les une el no ser invasivos, la posibilidad de desarrollar controles de calidad, la adquisición de datos y su reproducibilidad. Entre ellas podemos mencionar los estudios de estructura por imagen (imagen por resonancia magnética, RMI), métodos de imagen funcional y metabólica (MRI funcional, fMRI; tomografía por emisión de positrones, PET; etc.) (Aylward et al., 2012; Bechtel et al., 2010; Harris et al., 1992; Hobbs et al., 2009; Nopoulos et al., 2010, 2011; Paulsen et al., 2010; Rosas et al., 2001, 2003; Soneson et al., 2010; Sturrock et al., 2010; Trabizi et al., 2012).

Los primeros estudios imagen realizados a pacientes con enfermedad de Huntington evaluaban las estructuras anatómicas, concretamente la atrofia del núcleo estriado y su correlación con la expansión del triple CAG la alteración motora (Aylward et al., 2004, 2011, 2012; Harris et al., 1992). Estos datos mostraron como la atrofia del estriado se asociaba con el inicio de la enfermedad, permitiendo indicar el momento de aparición de los primeros síntomas (Paulsen et al., 2010).

Otros datos revelan que la pérdida de volumen cortical presenta una importante variabilidad individual, según la región de la corteza cerebral estudiada, pero puede explicar los diferentes fenotipos encontrados (Rosas et al., 2008).

Si bien, los estudios transversales muestran cambios en las estructuras entre sujetos presintomáticos y sintomáticos sus resultados no pueden ser utilizados para establecer los criterios de los marcadores de imagen, siendo actualmente uno de los principales escollos para su uso como medidas eficaces en los ensayos clínicos la falta de estudios longitudinales (Tabrizi et al., 2011). Aunque, se indican en los estudios existentes como potenciales biomarcadores los cambios en: el volumen total del cerebro, núcleo estriado, núcleo caudado, núcleo putamen,

Estado actual del problema

sustancia blanca cerebral y volumen de los ventrículos (Aylward et al., 2011; Tabrizi et al., 2011).

Así, los cambios estructurales observados mediante técnicas de neuroimagen en los primeros momentos de la enfermedad correlacionarían con el fenotipo manifestado por el paciente. Ello lleva a que la validación de estos procedimientos sea un objetivo importante en los actuales estudios clínicos.

- iii) **Neurofisiología:** El electroencefalograma y los cambios asociados a potenciales evocados son utilizados para el hallazgo de nuevos marcadores en la enfermedad de Huntington en diferentes estudios (Beniczky et al., 2002; de Tommaso et al., 2003; Nguyen et al., 2010; van der Hile et al., 2007). Datos recientes muestran como la detección de cambios de voltaje son asociados con diferentes y específicos procesos neuronales como reducción en la amplitud en el potencial evocado visual, motor y somatosensorial, transformándose en posibles y prometedores biomarcadores en el diagnóstico de patients sintomáticos y asintomáticos (Beste et al., 2008). Además, los potenciales evocados somatosensoriales fueron correlacionados con la longitud de la repatición del triple CAG y las alteraciones cognitivas (Beniczmy et al., 2002; Lefaucheur et al., 2006).

iv) **Marcadores bioquímicos:** Otra área de gran interés es la valoración bioquímica, principalmente, en líquido cefalorraquídeo (LCR) y muestras sanguíneas. En ellas han sido evaluados cambios en parámetros bioquímicos relacionados con:

- a. Función endocrina y metabolismo: La presencia en estos pacientes de cuadros de ansiedad, estrés y depresión llevaron a estudiar el papel jugado por el eje hipotálamo-hipofiso-adrenal en la patogénesis de la enfermedad y su posible uso como marcador en el seguimiento y evolución de esta enfermedad, así como en la evaluación del efecto de los agentes terapéuticos utilizados. Los estudios guiados por esta línea han encontrado aumentos en los niveles plasmáticos de cortisol y ACTH en sangre y orina (Aziz et al., 2011; Bjorkqvist et al., 2006; Saleh et al., 2009). Un reciente estudio desarrollado por Shirbin et al (2012) pone remanifiesto que éste eje, asociado a trastornos del aprendizaje y la memoria, se encuentra alterado en los pacientes con enfermedad de Huntington, tal que los hallazgos sugieren que un hipercortisolismo subyace en los cambios patológicos presentes en este trastorno y que pueden preceder al diagnóstico clínico, asociándose a un deterioro y declive de la memoria.

Por otro lado, investigaciones realizadas sobre el eje hipotálamo-hipofiso-gonadal encuentran resultados contradictorios

Estado actual del problema

en los niveles plasmáticos de testosterona, así unos apreciaron reducciones en este esteroide correlacionados inversamente con el estadio de la enfermedad y el grado de demencia de pacientes varones, mientras otros no encontraron cambios significativos en la concentración de testosterona, LH, FSH y andrógenos en mujeres (Markinos et al. 2005, 2007). Por todo ello, la posibilidad de uso de muchas de estas hormonas como biomarcador en la enfermedad de Huntington se ha visto reducida, cuando no bloqueada.

La pérdida de peso observada en pacientes con enfermedad de Huntington y los estudios desarrollados sobre nutrición en éstos han llevado al planteamiento de que algunas de las moléculas involucradas en el control y regulación de la alimentación (como leptina, grelina; vasopresina; orexina; factor de crecimiento similar a insulina, IGF-1; y aminoácidos de cadena ramificada, entre otras) podrían ser potenciales biomarcadores para el estudio de la evolución de esta enfermedad. (Markianos et al., 2007). Si bien, como acontece con otros posibles marcadores existen discrepancias en los resultados obtenidos.

Así, encontramos en la literatura científica estudios que muestran descensos en los niveles circulantes de leptina plasmática, sin cambios en LCR. Mientras que otros grupos no

detectaron cambios en esta molécula entre sujetos control y pacientes (Mochel et al., 2007; Popovic et al., 2004). Hallazgos similares fueron demostrados para grelina (Aziz et al., 2010; Popovic et al., 2004). Un reciente trabajo publicado por el grupo de Cong revela en el modelo de ratón transgénico para la enfermedad de Huntington la existencia de alteraciones en los niveles circulantes de hormonas metabólicas y lípidos como insulina, leptina, triglicéridos y HDL-colesterol en la etapa presintomática del animal previa a la aparición de alteraciones motoras y/o cognitivas (Cong et al., 2012). Este hecho vuelve a poner en el punto de mira el uso de estas variables como posibles marcadores de la evolución de la enfermedad, así como ayudan a mejorar el conocimiento de su patogénesis.

Diferencias en las concentraciones plasmáticas y séricas de aminoácidos ramificados fueron apreciadas entre sujetos sanos (controles) y pacientes con enfermedad de Huntington. Estos estudios mostraron que valina, leucina e isoleucina presentaban cambios significativos entre los sujetos controles, pacientes presintomáticos y pacientes diagnósticos con este proceso (Mochel et al., 2007; 2011; Underwood et al., 2006). Además, estos cambios fueron correlacionados con la pérdida de peso y la longitud en la expansión de triplete CAG, si bien como muestran

Estado actual del problema

los propios estudios los datos no llegan a ser completamente concluyentes en su totalidad.

- b. Respuesta inmune: Los datos derivados de los trabajos enfocados al análisis de cambios en marcadores del sistema inmune como interleucina 4 (IL-4), 6 (IL-6), 7 (IL-7), 8 (IL-8), 10 (IL-10) y 23 (IL-23), factor de necrosis tumoral alfa (TNF α , cluterina, y proteína C reactiva (PCR) y su papel en la enfermedad de Huntington, encontraron cambios estadísticamente significativos caracterizados por incrementos de éstos en el plasma y tejido cerebral de los pacientes respecto de los sujetos sanos (Forrest et al., 2010; Wild et al., 2008). También, IL-6 e IL-8 mostraron aumentos en LCR asociados a la severidad de la enfermedad (Bjorkqvist et al., 2008; Dalrymple et al., 2007; Forrest et al., 2010; Wild et al., 2008). Asimismo, se ha observado un incremento en los niveles séricos de PCR y neopterinina, que adicionalmente ofrecen un apoyo a la hipótesis de la presencia de un componente inflamatorio en la patogénesis de esta enfermedad. Aunque todo esto parece avalar el uso de estas moléculas como biomarcadores, no debe olvidarse que la presencia de un incremento en el componente inflamatorio puede ser resultado de situaciones de comorbilidad como infecciones gastrointestinales, urinarias, ..., comúnmente presentes en este tipo de pacientes (Dubinsky, 2005; Katsuno et al., 2009).

c. Neuroquímica: Desde esta perspectiva son diferentes las moléculas estudiadas para analizar su papel en la patogénesis de la enfermedad de Huntington y su potencial como biomarcadores en la progresión de la misma. Entre ellas se encuentran los niveles de BDNF, factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), 24S-hidroxicolesterol (24OHC), N-araquidonolietanolamina, GABA, acetilcolina, etc. (Battaglia et al., 2011; Leoni et al., 2008; Zuccato et al., 2007).

Los niveles de BDNF y TGF- β son determinantes para la supervivencia neuronal (Battaglia et al., 2011; Ciammola et al., 2007; Potenza et al., 2003; Squiteri et al., 2009; Zuccato et al., 2007). Ambos factores presentan una importante depleción en el cerebro de pacientes con enfermedad de Huntington que fue correlacionada con el grado de atrofia del núcleo estriado. Así, descensos en la concentración de TGF- β fue encontrada en pacientes presintomáticos (Battaglia et al., 2011). Sin embargo, no pudieron verificarse estos descensos en los pacientes con síntomas, este suceso limita la posibilidad de uso de esta citosina como biomarcador de la progresión de la enfermedad. Por su parte, diferentes investigaciones pusieron de manifiesto la presencia de niveles plasmáticos reducidos de BDNF asociados con el número de repeticiones CAG, deterioro cognitivo y

Estado actual del problema

alteraciones motoras (Ciammola et al., 2007; Potenza et al., 2003; Ruiz et al., 2012; Zuccato et al., 2007), aunque no se consiguió establecer correlación.

La oxidación del colesterol y la consiguiente producción de 24OHC son esenciales para el correcto desarrollo y funcionamiento del SNC. Los datos vertidos por los estudios realizados han encontrado descensos significativos en los niveles plasmáticos de esta molécula incluso en pacientes presintomáticos. Estas reducciones han sido correlacionadas con el grado de atrofia del núcleo caudado y la aparición de síntomas motores, hecho que lo ha convertido en un interesante posible marcador (Katsuno et al., 2009; Markinos et al., 2008). Asimismo, los niveles de colesterol total fueron menores en los pacientes que en los controles (Katsuno et al., 2009; Markinos et al., 2008).

Un aumento significativo en los niveles del ligando para receptores cannabionoides tipo 1, N-araquidoniletanolamina, fue detectado en pacientes con enfermedad de Huntington. Aunque sus cambios no mostraron diferencias entre pacientes presintomáticos y sintomáticos, fenómeno que impide su uso como biomarcador en la evolución de la enfermedad y en la valoración de la eficacia terapéutica de los tratamientos aplicados (Battista et al., 2007).

Otros estudios se centraron en el análisis de neurotransmisores y sus metabolitos tanto en LCR como en sangre periférica. Todo con el objetivo de encontrar variaciones que ayudaran a un mejor conocimiento de la fisiopatología de la enfermedad y pudieran ser útiles como biomarcadores para el seguimiento de la progresión de la enfermedad. En esta línea, descensos en los niveles de glutamato fueron encontrados en LCR de pacientes (Kim et al., 1980). Si bien, al igual que con otros posibles biomarcadores los datos finalmente no son concluyentes, existiendo estudios que no muestran cambios de éste respecto de los sujetos sanos (Reliman et al., 1994). La misma situación es hallada para otras moléculas como aspartato, ácido homovalínico, prolactina y GABA (Bedard et al., 2011; Cunha et al., 1981; García-Ruiz et al., 1995; Kurlan et al., 1988; Markianos et al., 2009, 2010; Stahl et al., 1986).

- d. Daño oxidativo: El estrés oxidativo ha sido ampliamente asociado a la patogénesis de la enfermedad de Huntington, postulándose como piedra de relevancia en la evolución del proceso y convirtiéndose en objetivo de los estudios que buscan encontrar posibles biomarcadores diagnósticos y evolutivos de la enfermedad, así como diana para estrategias terapéuticas que

Estado actual del problema

traten de enlentecer y mitigar la sintomatología presentada por ésta.

2.2. Estrés oxidativo como marcador de severidad y pronóstico

Como ya hemos indicado, un punto de interés en el estudio de esta enfermedad es el hallazgo o tipificación de uno o varios biomarcadores que ayudasen tanto al diagnóstico de la enfermedad como, de manera especial, a su pronóstico. Esto ayudaría a evaluar de manera objetiva la severidad de la enfermedad, así como inferir su evolución y analizar la respuesta a las terapias aplicadas.

El desequilibrio entre la producción de ERO y los sistemas antioxidantes de protección, traducido en daño celular, y conocido como estrés oxidativo se ha transformado en un foco diana tanto para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas como para la identificación de posibles marcadores (Johri y Beal, 2012; Kumar et al., 2010).

La disfunción mitocondrial, la alteración del metabolismo y el estrés oxidativo están íntimamente relacionados e implicados en la patogénesis de la enfermedad de Huntington. Los estudios a la fecha, muestran un intenso daño oxidativo a macromoléculas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos en el tejido cerebral de pacientes postmortem, siendo el daño más intenso en el

núcleo estriado. Junto a ellos, aunque de forma más controvertida, algunos datos encuentran cambios de estos marcadores en LCR. Estos datos son avalados por los resultados derivados de los estudios en modelos animales tanto en los inducidos químicamente como los obtenidos de animales transgénicos para esta enfermedad. Si bien, los resultados finales pueden ser para algunas de las variables estudiadas diferentes, probablemente debido a las diferencias en los modelos utilizados (Chen, 2011; Johri y Beal, 2012).

El incremento de los marcadores de daño oxidativo, suele ir acompañado por cambios en la actividad y expresión de los sistemas antioxidantes de defensa que habitualmente sufren una caída significativa relacionada con la intensidad y severidad del proceso. Asimismo, el daño oxidativo promueve una mayor agregación de la proteína huntingtina mutada. Fenómeno que a su vez se traduce en un mayor daño oxidativo, alteración de proteasoma y reducción de la viabilidad celular que conduce a la muerte neuronal. Además, ocurre una alteración mitocondrial (principal fuente endógena de ERO) que potencia el daño oxidativo, intensifica la reducción de la viabilidad celular y provoca un decremento drástico y dramático de la energía (ATP), especialmente relevante en el estriado (Chen, 2011; Hersch et al., 2006).

En el caudado de pacientes con enfermedad de Huntington se han encontrado incrementos en los niveles de 8OHdG, marcador de daño oxidativo al ADN, así como en el ADN mitocondrial de la corteza parietal

Estado actual del problema

(Browne et al., 1997; Polidori et al., 1999; Tabrizi et al., 2000). Estos datos han sido corroborados en el tejido cerebral tanto en el modelos de ratón transgénico R6/2 como en otros químicamente inducidos (Bogdanov et al., 2001; Chen et al., 2007; Sorolla et al., 2012; Tasset et a., 2012; Túnez et al., 2004).

Los estudios desarrollados y realizados en pacientes con esta enfermedad revelan claramente la existencia de una alteración en la cadena de transporte electrónico mitocondrial (CTE) y en las enzimas del ciclo del ácido tricarboxílico (ciclo de Krebs, TCA) (Costa y Scorrano, 2012). Los datos han puesto de manifiesto descensos significativos en la actividad de los complejos I, II y IV en el núcleo caudado y putamen (Browne et al., 1997), mientras que en el músculo de pacientes que no presentan alteraciones cerebrales se afecta, particularmente, el complejo I (Arenas et al., 1998). Así, siendo la mitocondria la principal fuente endógena de ERO, su alteración implicaría un incremento de éstas que a su vez afectaría a las propias proteínas presentes en la mitocondria, alterando aún más su viabilidad y función, cerrando con ello un círculo vicioso que conducirá a su inviabilidad, un trastorno energético y finalmente la muerte celular (Costa and Scorrano, 2012).

Adicionalmente, fueron observados descensos en la concentración de glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa en pacientes con enfermedad de Huntington comparados con sujetos sanos. Por otro lado, se encontraron

niveles altos de ácido úrico en suero asociados a una progresión más lenta de la enfermedad. Todo ello ha llevado a pensar en la posibilidad de utilizar los sistemas antioxidantes como candidatos para ser biomarcadores (Weir et al., 2012).

En esta línea, el uso de agentes antioxidantes como posibles fármacos terapéuticos, tanto en modelos experimentales como clínicos, avalan el importante papel de las ERO como pieza clave en la patogénesis y evolución de este proceso, y su potencial interés para ser utilizados como biomarcadores. Los datos presentes en la literatura muestran que los antioxidantes tienen un efecto beneficioso y protector frente al daño oxidativo presente en este proceso (Johri y Beal, 2012) tanto en estudios *in vitro* (metaloporfirinas, vitamina C, vitamina E y extracto fenólico de la uva) como en modelos animales (melatonina, selenio, piruvato, N-acetilcisteína, creatina, coenzima Q10, L-carnitina, etc.) y ensayos clínicos (creatina, coenzima Q10, alfa-tocoferol).

Diferentes estudios han mostrado el incremento de marcadores de daño oxidativo fuera del tejido cerebral, concretamente en sangre periférica. Chen et al. (2007) observaron un aumento en los productos de lipoperoxidación en sangre de pacientes con enfermedad de Huntington y una correlación con la severidad de la enfermedad. En este mismo estudio se apreció una reducción en la actividad Cu/Zn-SOD en los hematíes de los pacientes estudiados. Por otro lado, los pacientes presentan incrementos

Estado actual del problema

séricos y leucocitarios de 8OHdG. Asimismo, los niveles de productos de lipoperoxidación (LPO) como malondialdehído (MDA) y/o 4-hidroxinonales (4-HDA) en plasma se han visto incrementados en correlación con la severidad de la enfermedad según la escala UHDRS. Esto avala el importante papel desempeñado por el daño oxidativo en la patogénesis de este proceso. Un reciente estudio elaborado por el grupo de Long (2012) muestra que los niveles de 8OHdG en plasma, la alteración metabólica y la disfunción mitocondrial pueden ser utilizadas en la clínica como marcadores de la progresión de la enfermedad.

Con todos estos antecedentes nos proponemos la realización de un estudio que evalúe como hipótesis que, los cambios en los niveles de glutatión reducido en sangre periférica se correlacionan con la severidad de la enfermedad de Huntington.

Objetivos

3. Objetivos

El presente estudio propone como objetivo principal:

Evaluar la existencia de cambios en los niveles periféricos de glutatión reducido de pacientes con enfermedad de Huntington y su relación con el grado de severidad de la enfermedad.

Mientras que son sus objetivos secundarios:

1. Determinar los niveles en marcadores de estrés oxidativo como: productos de lipoperoxidación, proteínas carbonizadas, 8-hidroxi-2-desoxiguanosina, tioredoxina-1, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y capacidad antioxidante total del plasma.
2. Cuantificar los niveles de biomarcadores de estrés nitrosativo o nitrativo como: nitritos totales (como indicador de los niveles de óxido nítrico), óxido nítrico sintasa y nitritirosina,
3. Analizar cambios en biomarcadores de inflamación como proteína C reactiva, interleucina 6 y mieloperoxidasa.

Objetivos

Población y Métodos

4. Población y Métodos

4.1. Población del estudio

Se incluyeron en el estudio diecinueve pacientes diagnosticados de enfermedad de Huntington fueron incluidos en el estudio, remitidos desde las consultas del Servicio de Neurología del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba y del Hospital de Ntra. Sra. de Valme de Sevilla entre los meses Octubre de 2009 y Septiembre 2010. La edad de los mismos estuvo comprendida entre 26-58 años y su diagnóstico fue confirmado mediante estudio genético (diagnóstico molecular). El trabajo de campo fue realizado durante los meses de Septiembre de 2010 y Enero de 2011 en el laboratorio del grupo B05 del Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC)/Universidad de Córdoba.

4.1.1. Diagnóstico molecular de los pacientes con enfermedad de Huntington

El diagnóstico genético de estos enfermos se realizó mediante amplificación de la región de repetición del triplete CAG en el gen codificador de la proteína huntingtina, usando el sistema *Expand Long PCR* (Roche Diagnostics, Mennheim, Alemania) según protocolo descrito por Hecimovic et al., (2002). Para determinar el número de repeticiones del triplete CAG se utilizaron *primers* HD1 y HD3, excluyendo la región adyacente CCG en el gen para la

Material y Métodos

huntingtina (Warner et al., 1993). Finalmente, los productos resultantes de PCR y que contiene las repeticiones CAG fueron corridos en gel de poliacrilamida al 10%, cuantificándose el número de tripletes por comparación con estándar con número de tripletes CAG conocido.

4.1.2. Cálculo del tamaño muestral:

El número requerido de sujetos para el estudio se calculó con ayuda del programa para Análisis Epidemiológico de Datos Tabulados, Granmo 5.0, en base a las siguientes asunciones:

- Variable principal del estudio: Niveles de GSH en pacientes con enfermedad de Huntington.
- Diferencia mínima esperada: 10%.
- Riesgo alfa: 0,05.
- Potencia (1- β): 0,80.
- Contraste bilateral

En base a estas premisas el número de pacientes a enrolar en el presente trabajo debería ser, al menos, de 17 según el cálculo estimativo. Asumiendo, un porcentaje de pérdidas de un 10%, se estimo un número total de 19 pacientes.

4.1.3. Criterios de inclusión

1. Consentimiento informado.

2. Mayoría de edad.
3. Diagnóstico molecular de la enfermedad de Huntington con expansión del trinucleótico CAG superior a 35.
4. Edad comprendida entre 18 y 70 años.
5. Puntuación igual o superior a 25 en el el examen del estado mental (*mini mental state examination*, MMSE) (Folstein et al., 1975).

4.1.4. Criterios de exclusión

1. Enfermedad endocrina como diabetes, hiper o hipotiroidismo o inflamatoria crónica.
2. Enfermedades psiquiátricas severas.
3. Disfunción hepática y/o renal.
4. Toma de hipolipemiantes, suplementos vitamínicos y antiinflamatorios esteroideos.
5. Abuso de alcohol y drogas.
6. Mujeres embarazadas o en periodo de lactancia.
7. Consumo de suplementos de antioxidantes.

4.1.5. Aspectos éticos

El proyecto fue desarrollado respetando los principios fundamentales y normativas vigentes para los estudios clínicos (declaración de Helsinki, 1967; el Convenido del Consejo de Europa relativo a los derechos humanos y la biomedicina, 1997; UNESCO, 1997; y la legislación vigente Española). Todos los participantes aceptaron su inclusión mediante la firma de su

Material y Métodos

consentimiento informado tras ser informados detalladamente sobre los objetivos, procedimientos experimentales y posibles riesgos del estudio. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba de acuerdo a los criterios y lineamientos de la Institución y las Guías de Buenas Prácticas Clínicas.

4.2. Diseño del estudio

Estudio transversal descriptivo donde los pacientes fueron clasificados según la severidad de su proceso en dos grupos, siguiendo la *The Unified Huntington's Disease Rating Scale* (UHDRS) (Huntington Study Group, 1996): grupo EH1: con una puntuación superior a 70 puntos; y grupo EH2: pacientes con una puntuación UHDRS menor o igual a 70 puntos. Asimismo, fueron incorporados al estudio 19 sujetos control (sanos y sin ninguna enfermedad neurológica) con edad y frecuencia de sexo similar al grupo de enfermos de Huntington.

Todos los participantes fueron sometidos a un exhaustivo historial médico, examen físico y análisis sanguíneo, constituido por una bioquímica de rutina y hematimetría.

4.1.4. Extracciones sanguíneas

A todos los sujetos del estudio, en un plazo nunca superior a las 72 horas tras su inclusión al mismo y después de 12 horas de ayuno, se les extrajo 40 ml de sangre venosa en tubos que contenían 1g/l^{-1} de EDTA como anticoagulante y

10 ml en tubos para suero (sin anticoagulante). Las muestras sanguíneas recogidas para la obtención de plasma fueron centrifugadas a 2500 rpm, 4°C, 15 min., mientras que las de suero lo fueron a 2500 rpm, 20°C, 20 min. Las distintas muestras (plasma y suero) se alicuotaron y guardaron a -80°C hasta la realización de las determinaciones, para evitar variaciones interensayo.

4.3. Metodología específica requerida para la cuantificación de las variables del estudio

4.3.1. Daño oxidativo y sistemas antioxidantes

4.3.1.1. Biomarcadores de estrés oxidativo/nitrativo

Proteínas carboniladas

La cuantificación del contenido en proteínas carboniladas fue realizado mediante la técnica descrita por Levine et al. (1990). El daño causado a las proteínas es un proceso irreversible, el cual puede incrementar el enrollamiento erróneo de las estructuras secundarias o la pérdida de la formación de las estructuras terciaria y cuaternaria. Esto es debido a que todos los residuos de aminoácido están sujetos a la agresión, oxidación, por OH•. La cuantificación de los niveles de estas proteínas oxidadas se realiza mediante lectura de la absorbancia a una longitud de onda 360 nm en un espectrofotómetro (UV-163 Shimadzu, Lyoto, Japón).

Productos de lipoperoxidación

Las concentraciones plasmáticas de lipoperóxidos valoradas como los niveles de malonaldehído y 4-hidroxi-alquenos (MDA+4-HDA) fueron determinados usando reactivos de la casa comercial Oxis internacional® (LPO-586 kit; Oxis International; Portland, OR, USA). Dicho kit incluyó un reactivo cromógeno que reacciona con los productos de peroxidación, permitiendo su cuantificación por lectura de la absorbancia de la muestra a una longitud de onda 586 nm en un espectrofotómetro (UV-163 Shimadzu, Lyoto, Japón).

Daño oxidativo al DNA

El daño oxidativo al DNA fue evaluado como 8-hidroxi-2-desoxiguanosina (8OHdG) mediante procedimiento ELISA, con el *kit* comercial 8-OHdG Checj ELISA Check-437-01222 comprado a JaICA (Japanese Institute for the Control Aging, Fukuroi, Shizuoka, Japón). El producto originado de la reacción se cuantificó a través de los niveles de su absorbancia a 490 nm de longitud de onda en un multilector de placas T-CAM DTX 880 Multimode Dector Beckman Coulter Inc (IZASA Distribuciones Técnicas S.A., Barcelona, España).

Nitrotirosina

Los niveles de nitrotirosina como indicador de estrés nitrosativo fueron evaluados a través del grado de nitración de tirosina mediante equipo *kit* ELISA (Nitrotyrosine-ELISA) comprado a Bioxytech S.A. (Oxis International; Portland, OR, USA), siendo su absorbancia cuantificada a 450 nm de longitud

de onda en un multilector de placas T-CAM DTX 880 Multimode Dectector Beckman Coulter Inc (IZASA Distribuciones Técnicas S.A., Barcelona, España).

Nitritos totales

Los nitritos totales (NO_x, nitritos+nitratos) fueron utilizados como marcador de los niveles de producción de óxido nítrico (NO) mediante el método de Griess (Ricart-Jané et al., 2002). En soluciones acuosas el óxido nítrico se degrada rápidamente a nitrito y nitrato. Así, en mediante reducci6n todo nitrato es transformado en nitrito, que en medio ácido es convertido en ácido nitroso. Éste último, reacciona con la sulfanilamida y seguidamente con el N-(1-naftil)-etilenediamino produciendo un crom6foro cuya absorbancia es medida a 540 nm de longitud de onda en un espectrofot6metro UV-1603 Shimadzu (Kyoto, Jap6n).

Óxido nítrico sintasa

La actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS) fue determinada mediante método colorimétrico, *kit* Ultrasensitive Colorimetric NOS Assay (Oxford Biomedical Research Inc, Oxford, MI, USA). La eactividad de dicha enzima fue valorada a través de su absorbancia a 540 nm de longitud de onda en un espectrofot6metro UV-1603 Shimadzu (Kyoto, Jap6n).

4.3.1.2. Sistemas antioxidantes

Potencial antioxidante total plasmático

El potencial antioxidante total plasmático o Capacidad antioxidante total (PAO) fue valorada mediante equipo KPA-050 adquirido de JaICA (Japanese Institute for the Control of Aging, Fukuroi, Shizuoka, Japón). El procedimiento se basa en la reacción de reducción de Cu^{+2} a Cu^{+} en presencia de antioxidantes. El producto cromático fue valorado por sus niveles de absorbancia a 490 nm de longitud de onda en un multilector de placas T-CAM DTX 880 Multimode Dectector Beckman Coulter Inc (IZASA Distribuciones Técnicas S.A., Barcelona, España).

Glutación reducido

El glutación reducido (GSH), principal antioxidante intracelular además de ser coenzima fundamental para diferentes enzimas antioxidantes, desempeña un papel fundamental en el sistema de defensa antioxidante. Sus concentraciones fueron determinadas mediante espectrofotometría usando reactivos adquiridos de Oxis Internacional (kit GSH-400, Pórtland, OR, USA). La absorbancia fue evaluada mediante un espectrofotómetro (UV-1603 Shimadzu, Kyoto, Japón) a una longitud de onda de 400nm.

Glutación total

Los niveles de glutación total (GT) abarca la suma de GSH y glutación oxidado (GSSG). Este método está fundamentado en la formación de un cromógeno

que presenta su máxima absorbancia a una longitud de onda de 420 nm. Para su cuantificación se utilizó el *kit* comercial GSH-420 suministrado por la casa Oxis Internatinal (Pórtland, OR; USA) y un espectrofotómetro UV-1603 Shimadzu (Kyoto, Japón).

Glutación oxidado y cociente GSH/GSSG

Los niveles del GSSG fueron calculado la fórmula $GSSG = GT - GSH$; y sirvieron junto con los valores de GSH para el cálculo del cocientes establecido entre las formas reducida y oxidada del tripéptido.

Tiorredoxina-1

Los niveles de tiorredoxina 1 (Trx-1) fueron cuantificados mediante procedimiento ELISA con el *kit* RLF-EK0122R adquirido de BioVendor Laboratorni Medicina, República Checa. La lectura final a se realizó una longitud de onda 450 nm en un multilector de placas T-CAM DTX 880 Multimode Dectector Beckman Coulter Inc (IZASA Distribuciones Técnicas S.A., Barcelona, España).

Glutación peroxidasa

La actividad de la enzima glutación peroxidasa (GPx) fue realizada siguiendo el procedimiento descrito por Flohé y Gunzler en 1984. Enzima perteneciente al grupo de la peroxidadas. Su cuantificación se basa en la oxidación de NADPH a NAD^+ , catalizada por una concentración limitante de glutación reductasa y

Material y Métodos

con una absorbancia máxima a 340 nm, leída en un espectrofotómetro UV-1603 Shimadzu (Kyoto, Japón).

Superóxido dismutasa

La actividad de superóxido dismutasa (SOD), una de las más importantes enzimas antioxidantes se realizó por método adquirido de BiVision (Mountain View, CA, USA). Para la lectura de su absorbancia se utilizó un multilector de placas T-CAM DTX 880 Multimode Dectector Beckman Coulter Inc (IZASA Distribuciones Técnicas S.A., Barcelona, España) a una longitud de onda de 450 nm.

Cociente SOD/GPx

Para evaluar de forma dinámica el correcto funcionamiento del principal eje de los sistemas antioxidantes enzimáticos se calculó el cociente (ratio) SOD/GPx. Este cociente informa sobre la eficiencia del sistema antioxidante enzimático y, su valoración, tiene una relevancia superior a la de las actividades enzimáticas individuales.

Tiorredoxina reductasa-1

La cantidad de tiorredoxina reductasa 1 (TrRd-1) fue cuantificada por enzimoimmunoanálisis RLF-EK0125R suministrado por BioVendor Laboratorni Medicina, República Checa. Procediéndose a la lectura de la reacción final a una longitud de onda 450 nm en un multilector de placas T-CAM DTX 880

Multimode Dectector Beckman Coulter Inc (IZASA Distribuciones Técnicas S.A., Barcelona, España).

4.3.2. Algoritmos para evaluar de forma dinámica el estrés oxidativo

Brecha antioxidante

La brecha antioxidante (GAP) fue calculada como se indica a continuación;

$$\text{GAP} = \text{PAO} - ([\text{albúmina} \times \text{TEAC}] + [\text{ácido úrico} \times \text{TEAC}])$$

donde TEAC son los equivalentes trolox. Este indicador evalúa la capacidad antioxidante plasmática de los antioxidantes minoritarios como alfa tocoferol, bilirrubina, transferrina, ácido ascórbico, y otros, excluyendo albúmina, ácido úrico y equivalentes trolox (Sánchez-Rodríguez et al., 2004).

Estrés oxidativo global

El estrés oxidativo global (GOS) es un método integral desarrollado por Berinstain-Pérez et al. (2006) para evaluar de forma conjunta el daño oxidativo. Este algoritmo (constructo) incluye tres marcadores del sistema antioxidante: GAP, PAO y cociente SOD/GPx; así como dos biomarcadores de estrés oxidativo: 8OHdG y proteínas carboniladas.

La combinación de estos datos origina cuatro situaciones posibles: i) normalidad: no existencia de incremento de estrés oxidativo, **sistema antioxidante eficiente** (EAS); ii) daño oxidativo elevado, caracterizado por

Material y Métodos

deficiencia de las enzimas antioxidantes (AEDN: \geq SOD/GPx; \geq GAP; \geq PAO; \geq proteínas carboniladas; \geq 8OHdG); iii) estrés oxidativo por **deficiencia antioxidante extracelular** (AEXD: \leq SOD/GPx; \leq GAP; \leq PAO; \geq proteínas carboniladas; \geq 8OHdG); y iv) daño oxidativo por **deficiencia global/generalizada de los sistemas antioxidantes** (ASGD: \geq SOD/GPx; \leq GAP; \leq PAO; \geq proteínas carboniladas; \geq 8OHdG).

Para ello y de acuerdo a la teoría de los criterios de normalidad, se establecieron como valores de referencia normales aquellos que para cada variable englobara al 90 % (percentil 90) de los sujetos estudiados como población control (sana).

Adicionalmente, siguiendo los las indicaciones desarrolladas por el grupo de Berinstain-Pérez, fue desarrollado algoritmo para estudiar de forma dinámica el daño oxidativo y que engloba el manejo 7 biomarcadores a los que de forma binaria y en base a la normalidad establecida se le da el valor 0 (normal) o 1 (alterado). Estas variables son: i) dos de daño oxidativo: 8OHdG y proteínas carboniladas en plasma; ii) tres biomarcadores de sistemas antioxidantes enzimáticos en eritrocitos: SOD, GPX y cociente SOD/GPx; y dos marcadores de sistemas antioxidantes no enzimáticos en plasma: PAO y GAP. Así, la suma de de los mismo oscila entre un mínimo de 0 puntos y un máximo de 7 puntos. En función del valor obtenido se establecieron las siguientes categorías de GOS: i) normal (sin estrés oxidativo): \leq 1 punto; ii)

GOS leve: ≤ 3 puntos; iii) GOS moderado: ≤ 5 puntos; y iv) GOS severo: ≤ 7 puntos.

4.3.3. Inflamación

Proteína C reactiva

Los niveles de proteína C reactiva (PCR) fueron obtenidos mediante equipo OSR6147 de la casa comercial Beckman Coulter Inc y evaluado en un analizador AU™ (IZASA Distribuciones Técnicas S.A., Barcelona, España).

Interleucina 6

Interleucina-6 (IL-6), una de las principales moléculas proinflamatorias fue evaluada con ayuda del *kit BioSource IL-6 ELISA Kit* comercial comprado a Europe SA (Nevilles, Bélgica). La lectura de la placa se realizó a 450 nm un multilector de placas T-CAM DTX 880 Multimode Dectector Beckman Coulter Inc (IZASA Distribuciones Técnicas S.A., Barcelona, España).

Mieloperoxidasa

La enzima mieloperoxidasa (MPO) tiene una importante función en el sistema de defensa y es generadora de especies reactivas. Ella es liberada por neutrófilos y monocitos como respuesta a su activación. Sus niveles plasmáticos fueron cuantificados mediante procedimiento ELISA (myeloperoxidase(MPO) ELISA) comprado a Bioxytech S.A. (Oxis International; Portland, OR, USA), y evaluados a la longitud de onda de 450 nm en un lector para microplaca T-CAM DTX 880 Multimode Dectector

Material y Métodos

Beckman Coulter Inc (IZASA Distribuciones Técnicas S.A., Barcelona, España), a una longitud de onda de 450 nm.

4.3.4. Factores Neurotróficos

Factor neurotrófico derivado del cerebro

Los niveles periféricos de factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) fueron cuantificados mediante procedimiento elisa con *kit* comercial suministrado por la casa Promega (Madison, WI, USA (BDNF Emax Immunoassay System). El resultado final fue leído en un lector para microplaca T-CAM DTX 880 Multimode Dectector Beckman Coulter Inc (IZASA Distribuciones Técnicas S.A., Barcelona, España), a una longitud de onda de 450 nm.

Factor neurotrófico derivado de células gliales

La concentración circulante plasmática de factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) fue determinada con el *kit* GDNF Emax Immunoassay System adquirido a Promega (Madison, WI, USA). La lectura de la placa fue realizada en un T-CAM DTX 880 Multimode Dectector Beckman Coulter Inc (IZASA Distribuciones Técnicas S.A., Barcelona, España), a una longitud de onda de 450 nm.

Factor de crecimiento nervioso

Las concentraciones sanguíneas del factor de crecimiento nervioso (NGF) fueron determinadas utilizando un *kit* de enzimo-inmunoanálisis (ELISA)

comprado a Promega (Madison, WI, USA). Los valores de lectura fueron obtenidos en un T-CAM DTX 880 Multimode Dectector Beckman Coulter Inc (IZASA Distribuciones Técnicas S.A., Barcelona, España), a una longitud de onda de 450 nm.

4.4. Análisis estadístico

El estudio estadístico se realizó con el paquete estadístico SPSS17.0® (SPSS Ibérica, Madrid, España) para Windows. Lo primero a que se procedió fue a valorar si las muestras seguían una distribución normal, para lo que se aplicó el test de Shapiro-Wilk.

Para la comparación entre tres grupos se aplicó el análisis de varianza de una vía (ANOVA) con la prueba de corrección de Bonferroni. Cuando ANOVA no mostró significancia estadística para la comparación de tres grupos se procedió a realizar comparación por parejas de grupos mediante la prueba “t” de Student para variables independientes. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con $P < 0,05$.

Por su parte, el estudio de la existencia de posibles correlaciones entre variable fue realizado mediante la prueba de Pearson.

Resultados

5. Resultados

Características demográficas de los sujetos de estudios

Tabla 1. Características clínicas de pacientes y controles.

Parámetros	Control (n=19)	EH (n=19)	EH1 (n=12)	EH2 (n=7)
Sexo (varón/femenino)	8/11	9/10	5/7	4/3
Edad (años)	26 – 58	24 – 64	30 – 64	24 – 63
Estatura (cm)	162.9 ± 7.4	168.9 ± 8.9	173.1 ± 6.4	157.3 ± 3.5
Peso (kg)	78.5 ± 9.19	70.9 ± 8.6	74.5 ± 8.6	64.6 ± 4.1
Inicio de los síntomas (años)		35.1 ± 12.2	31.4 ± 11.5	40.1 ± 11.2
Años de enfermedad		11.1 ± 8.1	5.0 ± 3.2	11.9 ± 8.9
Expansión del triplete CAG (Nº de repeticiones)		46.5 ± 4.8	44.6 ± 2.3	48.4 ± 3.9
Glucosa (mg/dL)	98.9 ± 17.5	91.1 ± 21.4	98.1 ± 25.5	80.5 ± 7.0
Colesterol (mg/dL)	208.5 ± 32.0	191 ± 45.7	192.8 ± 52.2	188.7 ± 41.5
Triglicéridos (mg/dL)	109.7 ± 32.0	78.0 ± 27.5	74.1 ± 25.8	83.7 ± 32.9
HDL (mg/dL)	57.8 ± 14.5	48.7 ± 12.6	48.0 ± 15.7	49.7 ± 7.8
LDL (mg/dL)	146.8 ± 30.0	126.4 ± 39.8	129.6 ± 41.8	121.5 ± 42.3

Los datos son expresados como la media ± ES o el rango (mínimo – máximo). EH: Enfermedad de Huntington. Grupo EH1: con una puntuación superior a 70 puntos; y grupo EH2: pacientes con una puntuación UHDRS menor o igual a 70 puntos según la escala *The Unified Huntington's Disease Rating Scale* (UHDRS) (Huntington Study Group, 1996).

Cambio en los biomarcadores de daño oxidativo

Tabla 2. Biomarcadores de daño oxidativo.

Todos los datos son expresados como la media \pm ES. EH: Enfermedad de Huntington. Grupo EH1: con una puntuación superior a 70 puntos; y grupo EH2: pacientes con una puntuación UHDRS menor o igual a 70 puntos según la escala *The Unified Huntington's Disease Rating Scale* (UHDRS) (Huntington Study Group, 1996).

A) Plasma.

	Plasma			
	Control	EH	EH1	EH2
Proteínas carboniladas (nM)	0.36 \pm 0.14	0.571 \pm 0.24 ^a	0.6 \pm 0.25	0.49 \pm 0.22 ^d
8-OHdG (ng/ml)	45.51 \pm 11.93	69.53 \pm 32.23 ^b	71.5 \pm 24.0	65.70 \pm 26.97
Potencial antioxidante total plasmático (mM)	1.07 \pm 0.20	0.83 \pm 0.08 ^b	0.83 \pm 0.085	0.82 \pm 0.08
GAP (mM)	1283.7 \pm 374.5	1017.5 \pm 200.97 ^c	996.2 \pm 216.1	1051 \pm 192
GSH (μ M)	30.19 \pm 4.84	24.63 \pm 7.44 ^a	24.03 \pm 8.47	24.68 \pm 5.27
GSSG (μ M)	9.95 \pm 5.9	13.06 \pm 8.11 ^c	13.73 \pm 9.32	11.59 \pm 5.06
Glutación total (μ M)	42.15 \pm 6.52	37.25 \pm 7.40	37.71 \pm 9.42	36.24 \pm 3.18
Cociente	2.98 \pm 1.75	1.73 \pm 0.97 ^c	1.55 \pm 1.04	2.10 \pm 0.83

^a P<0.001 vs control; ^b P<0.01 vs control; ^c P<0.05 vs control; ^d P<0.01 vs EH1; ^e P<0.05 vs EH1.

B) Eritrocitos

	Eritrocitos			
	Control	EH	EH1	EH2
Proteínas carboniladas (nM/g Hb)	0.46 ± 0.04	0.66 ± 0.19 ^a	0.71 ± 0.45	0.57 ± 0.15 ^e
Productos lipoperoxidación (μM/g Hb)	11.68 ± 3.73	15.75 ± 5.83 ^b	16.17 ± 5.8	14.82 ± 3.10
GSH (μM/g Hb)	141.5 ± 30.6	122.8 ± 14.87 ^a	126.2 ± 12.26	114.72 ± 18.8
GSSG (μM/g Hb)	42.47 ± 29.3	44.95 ± 15.29	46.19 ± 16.27	40.58 ± 15.74
Glutación total (μM)	184.1 ± 28.3	167.82 ± 18.2	172.45 ± 17.3	155.36 ± 16.2
Cociente	3.09 ± 1.62	2.73 ± 1.04	2.73 ± 1.04	2.82 ± 1.25
SOD (U/ml/g Hb)	2.24 ± 0.18	1.64 ± 0.21 ^c	1.29 ± 0.74	1.86 ± 0.78
GPx (U/ml/g Hb)	0.20 ± 0.1	0.60 ± 0.14 ^a	0.6 ± 0.01	0.5 ± 0.017

^a P<0.001 vs control; ^b P<0.01 vs control; ^c P<0.05 vs control; ^d P<0.01 vs EH1; ^e P< 0.05 vs EH1.

Tabla 3. Algoritmo para el estudio del déficit antioxidante existente.

A) Los niveles de referencia son establecidos en base al percentil 90 de los obtenidos en los sujetos sanos (controles) incorporados al estudio, estableciendo con ello el punto de corte. Los parámetros incorporados son estudios en plasma, excepto el cociente SOD/GPx que fue evaluado en eritrocitos.

Estado oxidativo	SOD/GPx	Potencial antioxidante e total plasmático (mM)	Brecha antioxidante (μ mol/L)	Proteínas carboniladas (nM)	8-OHdG (ng/ml)
Sin estrés oxidativo	≤ 24.1	≥ 0.87	≥ 1012.84	≤ 0.549	≤ 68.10
Estrés oxidativo con AEDN	≥ 24.1	≥ 0.87	≥ 1012.84	≥ 0.549	≥ 68.10
Estrés oxidativo con AEXD	≤ 24.1	≤ 0.87	≤ 1012.84	≥ 0.549	≥ 68.10
Estrés oxidativo con ASGD	≥ 24.1	≤ 0.87	≤ 1012.84	≥ 0.549	≥ 68.10

AEDN: deficiencia antioxidante enzimática; AEXD: deficiencia antioxidante extracelular; ASGD: deficiencia antioxidante global

B) Interpretación de los biomarcadores de daño oxidativo en los pacientes.

Grupos	SOD/GPx	Potencial antioxidante total plasmático (mM)	Brecha antioxidante ($\mu\text{mol/L}$)	Proteínas carboniladas (nM)	8-OHdG (ng/ml)
EH (EH1+EH2)	≤ 24.1	≤ 0.87	≤ 1012.84	≥ 0.549	≥ 68.10
EH2	≤ 24.1	≤ 0.87	≤ 1012.84	≤ 0.549	≤ 68.10
EH1	≤ 24.1	≤ 0.87	≤ 1012.84	≥ 0.549	≥ 68.10

Estos resultados avalan la hipótesis de una deficiencia en el sistema antioxidante extracelular en pacientes con enfermedad de Huntington.

Resultados

Figura 5. Correlación entre la severidad de la enfermedad (EH1 y EH2) y el nivel de proteínas carbonizadas en eritrocitos.

Enfermedad de Huntington (EH). Grupo EH1: con una puntuación superior a 70 puntos; y grupo EH2: pacientes con una puntuación UHDRS menor o igual a 70 puntos según la escala *The Unified Huntington's Disease Rating Scale* (UHDRS) (Huntington Study Group, 1996). R: 0.619; P< 0.01.

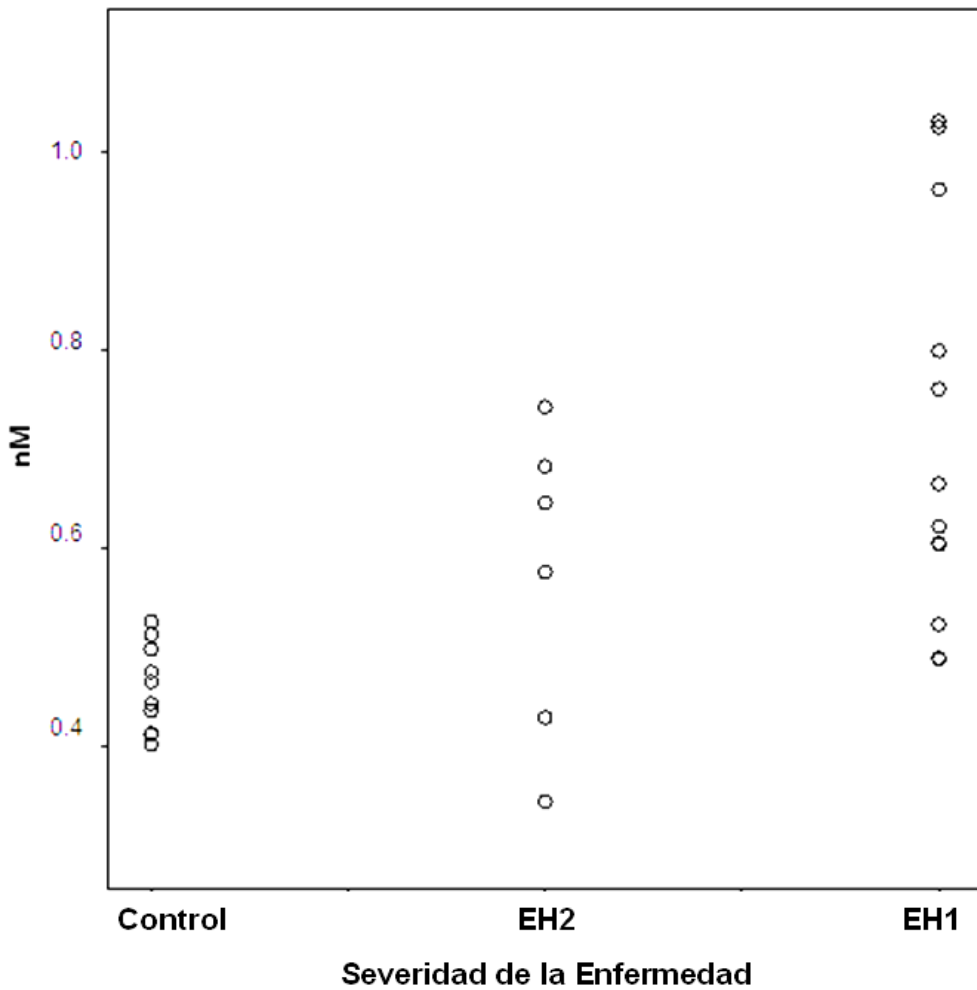
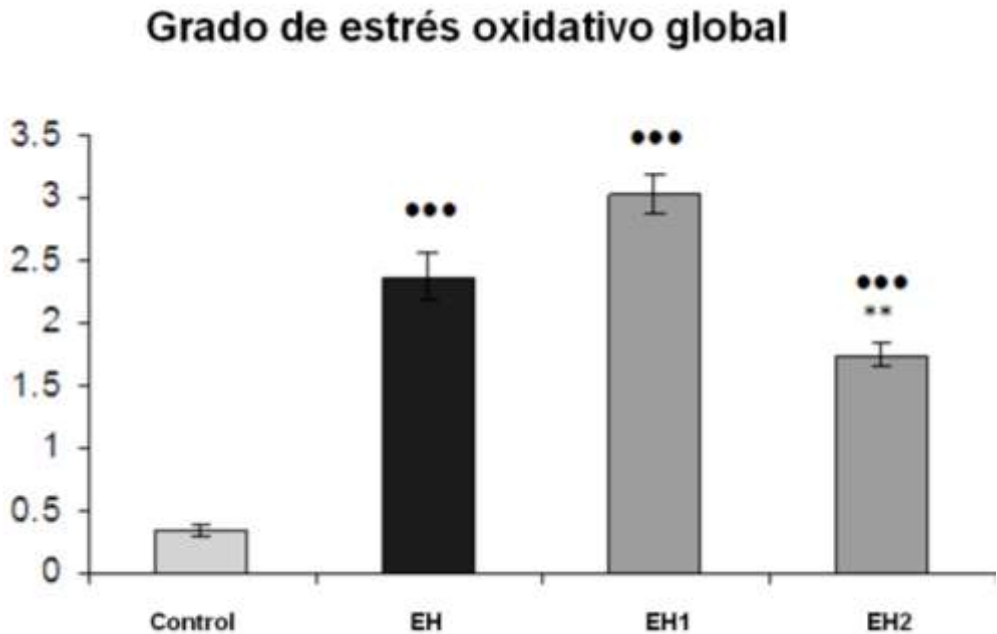


Figura 6. Grado de estrés oxidativo general, correlación con el grado de severidad de la enfermedad.

Enfermedad de Huntington (EH). Grupo EH1: con una puntuación superior a 70 puntos; y grupo EH2: pacientes con una puntuación UHDRS menor o igual a 70 puntos según la escala *The Unified Huntington's Disease Rating Scale* (UHDRS) (Huntington Study Group, 1996). Correlation, $r: 0.851$; $P < 0.01$. Las barras representa la media \pm ES. EH1 escala UHDRS > 70 and EH2 escala UHDRS < 70 . *** $P < 0.001$ vs control; ** $P < 0.05$ vs EH1. $r: 0.815$; $P < 0.01$



Niveles de tiorredoxina

Tabla 4. Niveles de tiorredoxina reductasa 1 y tiorredoxina en plasma y eritrocitos.

Todos los datos son expresados como la media \pm ES. EH: Enfermedad de Huntington. Grupo EH1: con una puntuación superior a 70 puntos; y grupo EH2: pacientes con una puntuación UHDRS.

A) Tiorredoxina reductasa-1

	Plasma ng/ml	Eritrocitos ng/gHb
Control	0.92 \pm 1.05	6.57 \pm 2.56
EH	0.54 \pm 0.04**	4.31 \pm 0.30 *
EH1	0.58 \pm 0.04**	4.46 \pm 0.45*
EH2	0.48 \pm 0.08**,#	4.40 \pm 0.47**

**P<0.01 vs control; * P<0.05 vs control; # P<0.05 vs HD1.

B) Tiorredoxina-1

	Plasma ng/ml	Eritrocitos ng/gHb
Control	5.25 \pm 3.44	37.04 \pm 25.06
EH	0.84 \pm 1.39**	6.51 \pm 10.92**
EH1	0.79 \pm 1.46**	6.43 \pm 12.02*
EH2	0.91 \pm 1.48*	6.65 \pm 10.81*

**P<0.01 vs control; * P<0.05 vs control.

Niveles en nitrotirosina (estrés nitrosativo)

Tabla 5. Óxido nítrico (como tritos totales), actividad óxido nítrico sintetasa y nitrotirosina.

Todos los datos son expresados como la media \pm ES. EH: Enfermedad de Huntington. Grupo EH1: con una puntuación superior a 70 puntos; y grupo EH2: pacientes con una puntuación UHDRS.

	Control	EH1	EH2
NOx (μ mol)	261.7 \pm 25.2	265.2 \pm 21.7	264.3 \pm 33.8
NOS			
(μ mol of NO/ μ g de proteínas/ Unidad de tiempo)	4.3 \pm 2.0	3.4 \pm 2.5	4.9 \pm 1.3
Nitrotirosina (nmol/L)	1.40 \pm 0.20	2.39 \pm 0.54 ^c	1.81 \pm 0.75

^cP<0.05 vs control

Modificaciones en factores neurotróficos y lactato deshidrogenasa

Tabla 6. Niveles plasmáticos de BDNF, GDNF y lactato deshidrogenasa (LDH).

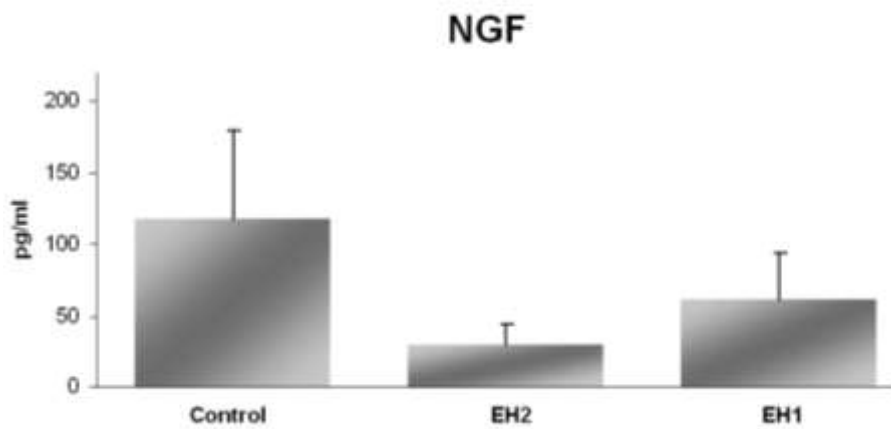
Todos los datos son expresados como la media \pm ES. EH: Enfermedad de Huntington. Grupo EH1: con una puntuación superior a 70 puntos; y grupo EH2: pacientes con una puntuación UHDRS.

	Control	EH1	EH2
BDNF (ng/mL)	2.471.0 \pm 549.7	2.383.61 \pm 484.54 ^a	2.647.5 5 \pm 742.87 ^a
GDNF(ng/mL)	844.24 \pm 308.86	428.18 \pm 126.48 ^a	484.98 \pm 180.73 ^a
LDH (U/mL)	311.33 \pm 38.36	418.33 \pm 106.38 ^b	374.16 \pm 68.36 ^c

^aP<0.001 vs control; ^bP<0.01 vs control; ^cP<0.05 vs control

Figura 7. Niveles periféricos del factor NGF.

Enfermedad de Huntington (EH). Grupo EH1: con una puntuación superior a 70 puntos; y grupo EH2: pacientes con una puntuación UHDRS menor o igual a 70 puntos según la escala *The Unified Huntington's Disease Rating Scale* (UHDRS) (Huntington Study Group, 1996).



Las barras representan la media \pm ES. *** $P < 0.001$ vs control; * $P < 0.01$ vs EH1. $r: 0.522$, $P < 0.032$.

Relación estrés oxidativo e inflamación

Tabla 7. Cambios en la concentración de de mieloperoxidasa (MPO) plasmática y del cociente con las células blancas sanguíneas (CBS).

Todos los datos son expresados como la media \pm ES. EH: Enfermedad de Huntington. Grupo EH1: con una puntuación superior a 70 puntos; y grupo EH2: pacientes con una puntuación UHDRS.

	Control	EH	EH1	EH2
MPO (ng/mL)	1.98 \pm 1.1	3.08 \pm 1.9	3.17 \pm 1.7	2.3 \pm 2.9
Células blancas sanguíneas (CBS, 10 ³ / μ L)	7.5 \pm 1.1	7.1 \pm 2.5	6.3 \pm 2.0	8.7 \pm 2.7
Cociente MPO/CBS	0.24 \pm 0.19	0.47 \pm 0.29 ^a	0.60 \pm 0.23 ^a	0.34 \pm 0.45 ^b

^a P<0.05 vs control; ^b P<0.05 vs EH1.

Figura 7. Niveles de proteínas C reactiva (PCR).

Los datos son expresados como la media \pm ES. Enfermedad de Huntington (EH). Grupo EH1: con una puntuación superior a 70 puntos; y grupo EH2: pacientes con una puntuación UHDRS menor o igual a 70 puntos según la escala *The Unified Huntington's Disease Rating Scale* (UHDRS) (Huntington Study Group, 1996) . **P<0.01 vs control; # P<0.05 vs EH1.

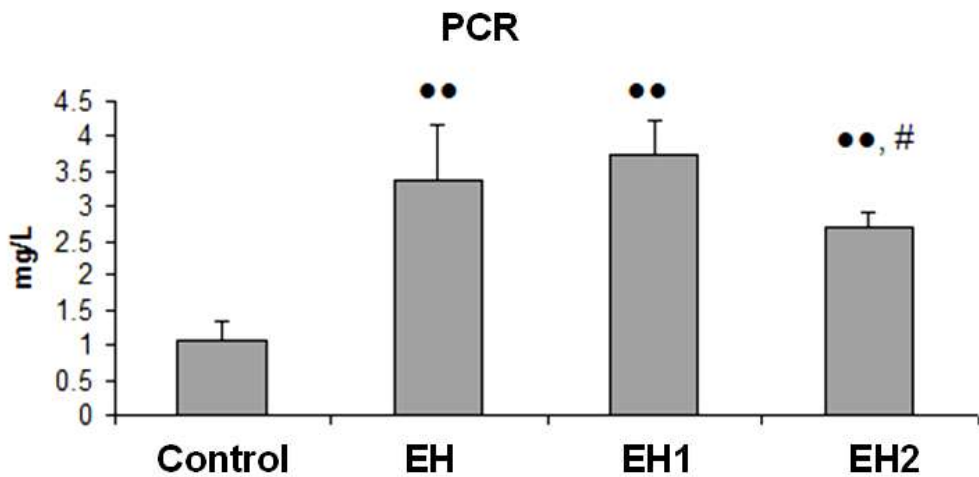
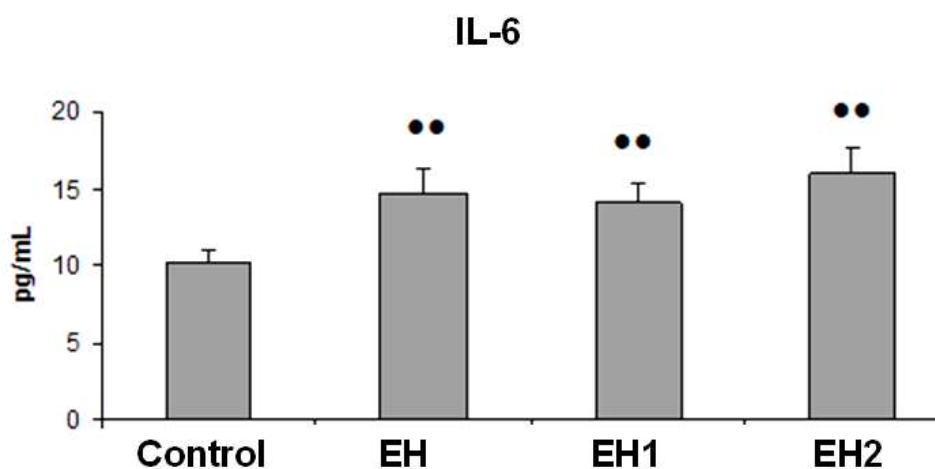


Figura 8. Interleucina-6 (IL-6).

Los datos son expresados como la media \pm ES. Enfermedad de Huntington (EH). Grupo EH1: con una puntuación superior a 70 puntos; y grupo EH2: pacientes con una puntuación UHDRS menor o igual a 70 puntos según la escala *The Unified Huntington's Disease Rating Scale* (UHDRS) (Huntington Study Group, 1996) . **P<0.01 vs control



Discusión

6. Discusión

6.1. Papel del estrés oxidativo en la enfermedad de Huntington

Los datos del presente estudio ponen de manifiesto la existencia de un intenso daño oxidativo sistémico (en sangre) en pacientes con HD comparados con sujetos sanos. Dicho daño se caracterizó por incremento en los niveles de oxidación de lípidos, proteínas y ADN. Asimismo, se revela la existencia de un mayor estrés oxidativo en los estados de mayor severidad de la enfermedad, alcanzado cotas de significación estadística y correlación para los niveles de proteínas carboniladas y el estrés oxidativo global (GOS) entre el estado de mayor severidad, HD1; y el de menor, HD2. Estos hallazgos están en concordancia con los comunicados por otros autores quienes observan la existencia de un mayor daño oxidativo en pacientes con HD respecto de los individuos sanos (Chen et al., 2007; Duran et al., 2010; Kumar et al., 2009; Sorolla et al., 2008). En esta línea, los estudios del grupo de Klepac y de Duran apreciaron en sendos estudios que los pacientes con HD asintomáticos presentaban un menor nivel de lipoperoxidación plasmática, junto con concentraciones menores de lactato (Duran et al., 2010; Klepac et al., 2007). En sintonía con estos resultados Long y col. encontraron incrementos en el daño al DNA cuantificados como 8OHdG, indicando su potencial como posible marcador en la progresión de la enfermedad (Long et

Discusión

al., 2012). Asimismo, fenómenos de *downregulation* han sido descritos para los genes reguladores de proteínas involucradas en la respuesta oxidativa y metabólica (AHCY1, ACO2, OXCT y CAP1) en pacientes con enfermedad de Huntington, indicando que pueden ser potenciales reguladores en el inicio y estados preclínicos de la enfermedad (Chang et al., 2012)

Los cambios apreciados en el grado de oxidación se acompañaron de alteraciones en los sistemas antioxidantes. Si bien los datos obtenidos en referencia al equilibrio redox del gutatión son semejantes a los previamente comunicados por Klepac y col. (2007), los referidos a las enzimas antioxidantes presentaron diferencias para algunas de ellas. La actividad de las enzimas antioxidantes presentes en los estudios publicados se presentan controvertidos y contradictorios. Así, algunos autores encuentran una disminución en la actividad de la SOD y GPx (Abraham et al., 2005; Bolzán et al., 1997; Chen et al., 2007; Durán et al., 2010; Vural et al., 2010), mientras que otros describen su incremento (Illic et al. 1998; Kharrazi et al., 2008; Schuessel et al., 2004; Sorolla et al., 2008). Por su parte, nosotros evidenciamos un incremento en la actividad GPx y una reducción en la de SOD. Esto puede ser debido, al menos en parte, a (Klepac eet al., 2007; Sorolla et al., 2008):

- i. Los diferentes grados de severidad mostrada por los pacientes estudiados.
- ii. La intensidad del daño oxidativo.

- iii. El medio biológico analizado y la metodología usada.
- iv. El protocolo de cuantificación utilizado.
- v. Las técnicas de manipulación de la muestra empleadas.

Son de especial interés los datos que muestran que la proteína huntingtina mutada altera la vía de señalización del factor de transcripción Nrf2 (regulador de la expresión de proteínas antioxidantes citoprotectoras de fase II), causando un incremento del daño oxidativo y una alteración de la dinámica y viabilidad mitocondrial (Jin et al., 2013).

Fue de gran relevancia el novedoso abordaje realizado, por primera vez en este tipo de pacientes según nuestro conocimiento, ya que evaluamos de forma dinámica y global el daño oxidativo. Habitualmente, los estudios dirigidos a analizar los cambios en biomarcadores de estrés oxidativo y sistemas antioxidantes son estáticos y evalúan los parámetros de manera independiente, tal que el estrés oxidativo es interpretado como el incremento en uno de los indicadores de daño oxidativo y/o la disminución en alguno de los sistemas antioxidantes. En el presente estudio quisimos examinar, como hemos indicado, de forma dinámica el equilibrio oxidativo, analizando para ello el estado oxidativo general o global de acuerdo con el algoritmo elaborado para tal efecto por el grupo de Sánchez-Rodríguez (Beristain-Pérez et al., 2006; Sánchez-Rodríguez et al., 2004).

El primer punto analizado fue el estado del sistema antioxidante enzimático, a través de sus dos principales proteínas, SOD y GPx, y la ratio

Discusión

SOD/GPx que éstos mantienen (Gaeta et al., 2002), teniendo presente que un cociente adecuado nos indicaría el mantenimiento de esta capacidad. Nuestros resultados revelaron que no existían cambios estadísticamente significativos en este cociente entre los diferentes estados de severidad, aunque de manera general se presentaban disminuidos respecto de los sujetos sanos. Estos datos apoyan la idea que el sistema antioxidante enzimático funciona de manera correcta a pesar del intenso estrés oxidativo. Por su parte, el análisis de la brecha antioxidante (variable que evalúa la situación de los sistemas antioxidante no enzimáticos, excluyendo los mayoritarios como ácido úrico, albúmina y trolox), mostró una reducción significativa entre los enfermos con Huntington y los controles sanos, planteando dos situaciones:

- i. Una deficiencia de moléculas antioxidantes minoritarias como ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E) y otros.
- ii. El importante papel jugado por la capacidad residual antioxidante plasmática en el control del daño oxidativo.

Estos resultados se encuentran en la línea de los previamente comunicados por Beristain-Pérez y col (2006) en pacientes con diabetes mellitus, hipertensión arterial y osteoartritis, y que indirectamente avalarían de igual forma el papel de la capacidad antioxidante plasmática minoritaria.

De acuerdo con estos hallazgos se decidió estudiar el estado oxidativo global (GOS) del paciente. Para ello, utilizamos el algoritmo previamente

descrito por Beristain-Pérez y col. en los estudios ya referidos (2006). La aplicación de este procedimiento a nuestros pacientes permitió apreciar la existencia de puntuaciones mucho mayores en los HD que en los controles. Situación que, adicionalmente, pudo ser asociada con la intensidad de la sintomatología clínica manifestada por el paciente.

Todos estos datos en su conjunto indican la existencia de un intenso estrés oxidativo asociado a HD y al estadio de la enfermedad, sugiriendo la producción y acúmulo de ROS intracelularmente que difundirían al espacio extracelular. Esta situación que se traduciría en 8-OHdG, proteínas carboniladas y lipoperóxidos, junto con una reducción significativa en la brecha antioxidante plasmática.

En el presente estudio, todos los fenómenos descritos en el párrafo anterior coinciden con el correcto y adecuado funcionamiento del eje enzimático antioxidante (evaluado como SOD/GPx) y el mantenimiento de la capacidad antioxidante total. Resultados que avalan la idea de una disminución de la capacidad antioxidante exógena (extracelular). Fenómeno, que a la luz de los datos, puede indicarse es progresivo.

Finalmente, debemos destacar la estrecha correlación apreciada entre el nivel de proteínas carboniladas y la gravedad de la enfermedad; así como entre la gravedad de la enfermedad y el GOS. Situación que junto a los cambios observados en otros parámetros cuantificados como GSH y malondialdehído (MDA), etc., indicarían que el nivel de carbonilación de

Discusión

proteínas y el GOS son las dos variables más sensibles a los cambios oxidativos asociados con la evolución de la HD. Estos hallazgos podrían apoyar su uso clínico como marcadores para el seguimiento de la evolución de la enfermedad.

6.2. Relación entre el estrés oxidativo y la inflamación en pacientes con enfermedad de Huntington

A la luz de las conclusiones obtenidas en relación al daño oxidativo y sus biomarcadores, y teniendo presente que los diferentes estudios muestran la existencia de una respuesta inmune a nivel periférico en pacientes con HD (Bjorqvist et al., 2008; Lebjhuber et al., 1988), hemos tratado de analizar si existía una relación entre ambos fenómenos.

Los resultados de este trabajo indican la presencia de una disminución significativa en los niveles de TrRd-1 y Trx-1 en plasma de pacientes con HD, acompañada por aumentos en los niveles circulantes de IL-6 y proteína C-reactiva (PCR, marcador inespecífico de inflamación). Estos hallazgos son similares a los encontrados por otros autores, que informan sobre el incremento en plasma de TNF- α , IL-6 e IL-8 en pacientes con HD (Bjorqvist et al., 2008; Hsiao et al., 2010), situación semejante a la acontecida en otros procesos neurodegenerativos como enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson (Galimberti et al., 2011; Hsiao et al., 2010; Miller et al., 2009).

Recientemente, Heilman y col. (2011) publicaron la relación entre los niveles de Trx-1 y la actividad del sistema inmune, indicando estos mismo autores, que la expresión del gen NF- κ B se encuentra asociada a los cambios en la actividad de Trx-1.

Por otro lado, los datos de nuestro trabajo no evidenciaron cambios significativos entre los grupos de estudio para los niveles de MPO y el número de células de la serie blanca (WBC, del inglés *white blood cells*). Sin embargo, cuando se estableció su ratio (MPO/WBC) encontramos como ésta era mayor en pacientes con HD comparados con sujetos sanos, siendo indicativo de una mayor actividad celular. Además, el estudio demostró la existencia de dos correlaciones:

- i. Positiva entre el ratio MPO/WBC y los niveles de GOS
- ii. Negativa entre el ratio MPO/WBC y la brecha antioxidante

Todo ello apoya la idea que la respuesta inflamatoria tiene una función relevante en la patogénesis y evolución de la HD, y que ésta es mediada por ERO y su consiguiente daño oxidativo, causando cambios en los biomarcadores a nivel sanguíneo. A éste nivel no encontramos cambios estadísticamente significativos para NO y NOS. Datos que en lo que se refiere a los niveles de NO difieren de los previamente publicados en la literatura científica (Boll et al., 2008). Esta diferencia de hallazgo puede obedecer a:

i) el método de medición utilizado, que en otros estudios fue HPLC mientras que nosotros utilizamos un método espectrofotométrico;

- ii) el número de pacientes y la severidad del proceso; y
- iii) el tipo de muestra biológica analizada.

6.3. Relación de los factores neurotróficos y el estrés nitrosativo en la enfermedad de Huntington

Según nuestro conocimiento el intento de relacionar o establecer una asociación entre el estrés nitrosativo y los cambios en los niveles circulantes de factores neurotróficos (NGF, BDNF y GDNF) en pacientes con HD, es novedoso y la primera vez que se intenta. Los resultados sugieren que:

- i. Los niveles de NGF, BDNF y GDNF son menores en pacientes con HD que en los controles.
- ii. La actividad LDH, los niveles de nitrotirosina y la ratio MPO/WBC son mayores en los pacientes.

Los pacientes de nuestro estudio mostraron concentraciones menores en los niveles plasmáticos de los factores neurotróficos estudiados, datos congruentes con los presentados por Lorigados y col. (1998) y otros grupos tanto en estudios con pacientes como con animales en esta y otras patologías neurodegenerativas (Ciammola et al., 2007; Scalzo et al., 2010; Takahashi et al., 2012; Teixeira et al., 2010).

Un hecho singular e interesante que llamó nuestra atención y observamos, fue que mientras los niveles de BDNF y GDNF tendían a disminuir con la severidad de la enfermedad, los niveles de NGF incrementaban de manera estadísticamente significativa, a pesar de mantenerse por debajo de los niveles mostrados por los sujetos sanos. Aunque, este suceso requiere un estudio de mayor profundidad, los datos presente apoyan la idea que al ser NGF producido y liberado por células diana de inervaciones colinérgicas, la alteración de éstas provocaría como mecanismo de respuesta el incremento en este factor neurotrófico (Aloe et al., 1997).

Los cambios encontrados en los factores neurotróficos podrían ser utilizados conjuntamente como marcadores del progreso y evolución de la enfermedad, así el declinar de ellos estaría sujeto al tipo de neurona lesionada y perdida. Hallazgos similares, que apoyan esta idea, han sido encontrados por diferentes autores en otros procesos neurodegenerativos como la enfermedad de Parkinson, la corea de Sydenham y el MSA (Chauhan et al., 2001; Conforti et al., 2008; Teixeira et al., 2010; Ubhi et al., 2010)

Teniendo presente el relevante papel jugado por el daño oxidativo en el curso y evolución de las enfermedades neurodegenerativas, puesto de manera evidente para la enfermedad de Huntington en la primera parte de esta discusión, y la importante función desarrollada por el NO en diferentes funciones fisiológicas fuera y dentro del SNC, así como en el desarrollo del denominado estrés nitrosativo (Beal et al., 1992; Klepac et al., 2007; Sorolla et

Discusión

al., 2008; Tabrizi et al., 1999). Quisimos analizar el posible rol jugado por las especies reactivas del nitrógeno .

Una vez realizadas las determinaciones pertinentes se obtuvieron niveles estadísticamente superiores de nitrotirosina (marcador de daño nitrosativo), junto con aumento de actividad plasmática de LDH (marcador del daño y necrosis celular). Estos datos están de acuerdo con los estudios que indican la presencia de incrementos en los niveles de nitrotirosina en HD (Matthews et al., 1998), así como con estudios previos del grupo que encuentran en modelos experimental de HD aumentos en los niveles de LDH plasmática y cerebral (Tunez et al., 2006). Estos mismos estudios indicaron que el daño oxidativo podría ser responsable, al menos en parte, del aumento del importante daño y muerte celular acontecido y evaluado entre otras formas por el incremento en los niveles de LDH. Hipótesis reforzada por el hecho experimental de la reducción de los niveles de LDH, así como de la pérdida neuronal tras la administración de agentes con actividad y capacidad antioxidantes (Antunes Wilhelm et al., 2013; Khalatbary, 2013; Kumar et al., 2009; Vamos et al., 2010; Túnez et al., 2006). Por otro lado, diferentes estudios establecieron una posible relación entre los niveles de NGF y el estrés nitrosativo, tal que la administración de este factor neurotrófico en modelos experimentales de HD induce la reducción en los niveles de nitrotirosina, ejerciendo un potente efecto, no solo antioxidante, sino también neuroprotector (Allen et al., 2013; Galpern et al., 1996; Maksimovic et al., 2002). En esta línea, los trabajos de Gao y col. muestran que además de lo ya

indicado, la administración de NGF protege frente al estrés oxidativo e induce proliferación celular (Gao et al., 2007).

Como se indicó anteriormente, existe una fuerte relación entre el estrés oxidativo, la actividad del sistema inmune y la producción de MPO. Tal que los niveles de ésta son asociados tanto a procesos degenerativos como el HD (Hsiao et al., 2010), como a otros tipos de alteraciones inflamatorias de naturaleza autoinmune como espondilitis anquilosante y artritis reumatoide (Feijóo et al., 2009). En el caso de HD ha sido encontrada una intensa relación entre el importante estrés oxidativo/nitrosativo y los niveles de MPO, datos que avalan una estrecha relación y participación con los procesos y respuestas inflamatorias (Bjorkqvist et al., 2008; Dalringle et al., 2007; Hsiao et al., 2010)

Los resultados obtenidos en nuestros estudios, están en consonancia con los hallazgos de trabajos previos, mostrando que un aumento en la relación MPO/leucocitos se asocia con un aumento del daño nitrosativo, caracterizado por niveles elevados de nitrotirosina. Esto apoyaría la hipótesis de que el daño oxidativo/nitrosativo es responsable de la reducción en los niveles de los factores neurotróficos apreciados en pacientes con HD. Esta idea, es favorecida y sustentada, indirectamente, por los datos que muestran mejoría en los procesos neurodegenerativos tratados con determinados factores neurotróficos (Zhang et al., 2010).

Conclusiones

7. Conclusiones

En base a nuestros resultados podemos concluir que:

1. Los pacientes con enfermedad de Huntington presentan un estrés oxidativo globalizado, caracterizado por incrementos en los biomarcadores de daño oxidativo/nitrativo: lipoperóxidos, proteínas carboniladas, 8-hidroxi-2-desoxiguanosina y nitrotirosina, así como un descenso en los sistemas antioxidantes: superóxido dismutasa, capacidad antioxidante total del plasma, redox del glutatión, sistema tiorredoxina.
2. La severidad de la enfermedad se correlaciona con un mayor grado de estrés oxidativo global y proteínas carboniladas.
3. Los pacientes con enfermedad de Huntington manifiestan una reducción en el sistema antioxidante no enzimático extracelular.
4. Los niveles plasmáticos de BDNF, GDNF y NGF son menores en pacientes con enfermedad de Huntington. Mientras que su reducción es más intensa a medida que el

proceso es más severo para BDNF y GDNF, guardando una correlación positiva para NGF.

5. Los pacientes con enfermedad de Huntington presentan un incremento en el cociente entre cantidad de mieloperoxidasa y número de células blancas sanguíneas, que correlaciona con el estrés oxidativo global.
6. El daño oxidativo tienen un papel relevante en la patogénesis y evolución de la enfermedad.
7. El nivel de proteínas carboniladas y el grado de estrés oxidativo global podrían ser biomarcadores útiles para el seguimiento de la evolución de la enfermedad, así como para evaluar la eficacia de la terapia aplicada.

Bibliografía

8. Bibliografía

Abe J, Berk, BC. Reactive oxygen species as mediators of signal transduction in cardiovascular disease. *Trends Cardiovas Med* 8:59-64; 1998.

Abe J, Takahaashi M, Ishida M, Lee J-G, Berk BC. c-Src is required for oxidative stress-mediated activation of big mitogen activated protein kinase (BMK1). *J Bio Chem* 33:20389-94; 1997.

Abraham S, Soundararajan CC, Vivekanandhan S, Behari M. Erythrocyte antioxidant enzymes in Parkinson's disease. *Indian J Med Res* 121: 111-5; 2005.

Allen SJ, Watson JJ, Shoemark DK, Barua UN, Patel NK. GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration. *Pharmacol Ther* 138: 155-75; 2013.

Aloe L, Micera A, Bracci-Laudiero L, Vigneti E, Turrini P. Presence of nerve growth factor in the thymus of prenatal, postnatal and pregnant rats. *Thymus* 24:221-31; 1997.

Antunes Wilhelm E, Ricardo Jesse C, Folharini Bartolatto C, Wayne Nogueira C. Correlations between behavioural and oxiditive parameters in a rat quinolinic acid model of Huntington's disease: Protective effect of melatonina. *Eur J Pharmacol* 701: 65-72; 2013.

Areanas J, Campos Y, Ribacob R, Martín MA, Rubio JC, Ablanedo P, et al. Complex I defect in muscle from patients with Huntington's disease. *Ann Neurol* 43: 397-400; 1998.

Bibliografia

Arrasate M, Mitra S, Schweitzer ES, Segal MR, Finkbeiner S. Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature* 431: 747-8; 2004.

Aylward EH, Liu D, Nopoulos PC, Ross CA, Pierson RK, Mills JA, et al. Striatal volume contributes to the prediction of onset of Huntington disease in incident cases. *Biol Psychiatry* 71: 822-9; 2012.

Aylward EH, Li Q, Stine OC, Ranen N, Sherr M, Barta PE, et al. Longitudinal change in basal ganglia volume in patients with Huntington's disease. *Neurology* 48: 394-9; 1997.

Aylward EH, Nopoulos PC, Ross CA, Langbehn DR, Pierson RK, Mills JA, et al. Longitudinal change in regional brain valumen inprodromal Huntington disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 82: 405-10; 2011.

Aziz NA, Pijil H, Frolich M, Mauritis van der Graaf AW, Roelfsema F, et al. Leptin secretion rate increases with higher CAG repeat number in Huntington's disease patients. *Clin Endocrinol* 73: 206-11; 2010.

Aziz NA, van der Burg JM, Ross RA, Maison P, Saleh N, Bachoud-Levi AC. High insulin like growth factor I is associated with cognitive decline in Huntington disease. *Neurology* 76: 675-6; 2011.

Battista N, Bari M, Traditi A. Severe deficiency of the fatty acid amide hydrolase (FAAH) activity segregates with the Huntington's disease mutation in peripheral lymphocytes. *Neurobiol Dis* 27: 108-16; 2007.

Battaglia G, Cannella M, Riozzi B, Orobello S, Maat-Schieman ML, Aronica E, et al. Early defect of transforming growth factor β 1 formation in Huntington's disease. *J Cell Mol Med* 15: 555-71; 2011.

Beal MF. Neurochemistry and toxin models in Huntington's disease. *Curr Opin Neurol* 7: 542-7; 1994.

Beal MF. Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illnesses? *Ann Neurol* 31:119-30; 1992.

Bédard C, Wallman MJ, Pourcher E, Gould PV, Parent A, Parent M. Serotonin and dopamine striatal innervation in Parkinson's disease and Huntington's chorea. *Parkinsonism Relat Disord* 17: 593-8; 2011.

Bechtel N, Scahill RI, Rosas HD, Acharya T, van den Bogaard SJ, Jauffret C, et al. Tapping linked to function and structure in premanifest and symptomatic Huntington's disease. *Neurology* 75:2150-60; 2010.

Bennett EJ, Shaler TA, Woodman B, Ryu KY, Zaitseva TS, Becker CH, et al. Global changes to the ubiquitin system in Huntington's disease. *Nature* 448: 704-8; 2007.

Beniczky S, Keri S, Antal A, Jakab K, Nagy H, Benedek G, et al. Somatosensory evoked potentials correlate with genetics in Huntington's disease. *Neuroreport* 13:2295-8; 2002.

Beristain-Pérez AS, Sánchez-Rodríguez MA, Ruiz-Ramos M, Mendoza-Núñez VM. Oxidative stress as a risk factor for the development of diabetes mellitus, osteoarthritis and hypertension in elderly. *Bioquímica* 31: 13-22; 2006.

Beste C, Saft C, Andrich J, Gold R, Falkenstein M. Stimulus-response compatibility in Huntington's disease: a cognitive-neurophysiological analysis. *J Neurophysiol* 99: 1213-23; 2008.

Bibliografía

Beste C, Willemsen R, Saft C, Falkenstein M. Error processing in normal aging and in basal ganglia disorders. *Neuroscience* 159: 143-9; 2009.

Björkqvist M, Petersén A, Bacos K, Isaacs J, Norlén P, Gil J, et al. Progressive alterations in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the R6/2 transgenic mouse model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 15: 1713-21; 2006.

Björkqvist M, Wild EJ, Thiele J, Silvestroni A, Andre R, Lahiri N, et al. A novel pathogenic pathway of immune activation detectable before clinical onset in Huntington's disease. *J Exp Med* 205: 1869-77; 2008.

Bogdanov MB, Andreassen OA, Dedeoglu A, Ferrante RJ, Beal MF. Increased oxidative damage to DNA in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *J Neurochem* 79: 1246-9; 2001.

Boll MC, Alcaraz-Zubeldia M, Montes S, Rios C. Free copper, ferroxidase and SOD1 activities, lipid peroxidation and NOx content in the CSF. A different marker profile in four neurodegenerative diseases. *Neurochem Res* 33: 1717-23; 2008.

Bolzan AD, Bianchi MS, Bianchi NO. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in human blood: influence of sex, age and cigarette smoking. *Clin Biochem* 30: 449-54; 1997.

Browne SE, Bowling AC, MacGarvey U, BAIk MJ, Berger SC, Muqit MM et al. Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia. *Ann Neurol* 41: 646-53; 1997.

Brouillet E, Jacquard C, Bizat N, Blum D. 3-nitropropionic acid: a mitochondrial toxin to uncover physiopathological mechanisms underlying striatal degeneration in Huntington's disease. *J Neurochem* 95: 1521-40; 2005.

Browne SE, Bowling AC, MacGarvey U, BAik MJ, Berger SC, Muqit MM et al. Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia. *Ann Neurol* 41: 646-53; 1997.

Browne SE, Beal MF. Oxidative damage in Huntington disease pathogenesis. *Antioxid Redox Signal* 8: 2061-73; 2006.

Bruyn GW. Huntington's chorea: historical, clinical and laboratory synopsis. In Vinken PJ, Bruyn GW, eds. *Handbook of clinical neurology*. Vol. 6. Amsterdam: North Holland Publishing; p. 298-378; 1968.

Cao Y, Liu JW, Yu YJ, Zheng PY, Zhang XD, Li T, et al. Synergistic protective effect of picoside II and NGF on PC12 cells against oxidative stress induced by H₂O₂. *Pharmacol Rep* 59:573-9; 2007.

Cattaneo E, Zuccato C, Tartari M. Normal huntingtin function: an alternative approach to Huntington's disease. *Nat Rev Neurosci* 6: 919-30; 2005

Cepeda C, Wu N, André VW, Cummings DM, Levine MS. The corticostriatal pathway in Huntington's disease. *Prog Neurobiol* 81: 253-71; 2007.

Chang KH, Chen YC, Wu YR, Lee WF, Chen CM. Downregulation of genes involved in metabolism and oxidative stress in the peripheral leukocytes of Huntington's disease patients. *Plos One* 7: e46492; 2012.

Chauhan NB, Siegel GJ, Lee JM. Depletion of glial cell line-derived neurotrophic factor in substantianigra neurons of Parkinson's disease brain. *J Chem Neuroanat* 21:277-88; 2001.

Chen CM, Wu YR, Cheng ML, Liu JL, Lee YM, Lee PW, et al. Increased oxidative damage and mitochondrial abnormalities in the peripheral blood of

Bibliografia

Huntington's disease patients. *Biochem Biophys Res Commun* 359: 335-40; 2007.

Ciammola A, Sassone J, Cannella M, Calza S, Poletti B, Frati L, et al. Low brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in serum of Huntington's disease patients. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 144B: 572-7; 2007.

Conforti P, Ramos C, Apostol BL, Simmons DA, Nguyen HP, Riess O, et al. Bloodlevel of brain-derived neurotrophic factor mRNA is progressively reduced in rodent models of Huntington's disease: restoration by the neuroprotective compound CEP-1347. *Mol Cell Neurosci* 39:1-7; 2008.

Cong WN, Cai H, Wang R, Daimon CM, Maudsley S, Raber K, et al. Altered hypothalamic protein expression in a rat model of Huntington's disease. *PLOS one* 7: e47240; 2012.

Costa V, Scorrano L. Shaping the role of mitochondria in the pathogenesis of Huntington's disease. *EMBO J* 31: 1853-64; 2012.

Cunha L, Oliveira CR, Diniz M, Amaral R, Conclaves AF, Pio-Abreu J. Homovanilic acid in Huntington's disease and Sydenham's chorea. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 44: 258-61; 1981.

Dalrymple A, Wild EJ, Joubert R, Sathasivam K, Bjorkqvist M, Petersen A, et al. Proteomic profiling of plasma in Huntington's disease reveals neuroinflammatory activation and biomarker candidates. *J Proteome Res* 6:2833-40; 2007.

de Tommaso M, de Carlo F, Druscolo O, Massafra R, Scirucchio V, Bellotti R. Detection of subclinical brain electrical activity changes in Huntington's disease using artificial neural networks. *Clinical Neurophysiology* 114: 1237-45; 2003.

Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82:47-96; 2002.

Dubinsky RM. No going home for hospitalized Huntington's disease patients. *Mov Disord* 20: 1316-22; 2005.

Duff K, Paulsen JS, Beglinger LJ, Langbehn DR, Stout, Predict-HD Investigators of the Huntington Study Group. Psychiatric symptoms in Huntington's disease before diagnosis: the predict-HD study. *Biol Psychiatry* 62: 1341-46; 2007.

Duran R, Barrero FJ, Morales B, Luna JD, Ramirez M, Vives F. Oxidative stress and plasma aminopeptidase activity in Huntington's disease. *J Neural Transm* 117: 325-32; 2010.

Esteve JM, Mompó J, García de la Asunción J, Sastre J, Asensi M, Boix J, et al. Oxidative damage to mitochondrial DNA and glutathione oxidation in apoptosis: studies in vivo and in vitro. *FASEB J* 13:1055-64; 1999

Feijoo M, Tunez I, Tasset I, Montilla P, Perez-Guijo V, Munoz-Gomariz E, et al. Infliximab reduces myeloperoxidase concentration in chronic inflammatory joint diseases. *Pharmacology* 83:211-6; 2009.

Flohé L, Günzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 105: 114-21; 1984.

Folstein MS, Folstein SE, McHugh PR. "Mini Mental State" a practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 12: 189-98; 1975.

Bibliografía

Forrest CM, Mackay GM, Stoy N, Spiden SL, Taylor R, Stone TW, et al. Blood levels of kynuremines, interleukin-23 and soluble human leucocyte antigen-G at different stages of Huntington's disease. *J Neurochem* 112: 112-22; 2010.

Frisard M, Ravussin E. Energy metabolism and oxidative stress: impact on the metabolic syndrome and the aging process. *Endocrine* 29:27-32; 2006.

Gaeta L M, Tozzi G, Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Determination of superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in blood of healthy pediatric subjects. *Clin Chem Acta* 322: 117-20; 2002.

Galimberti D, Scarpini E. Inflammation and oxidative damage in Alzheimer's disease: friend or foe? *Front Biosci* 3:252-66; 2011.

Galpern WR, Matthews RT, Beal MF, Isacson O. NGF attenuates 3-nitrotyrosine formation in a 3-NP model of Huntington's disease. *Neuroreport* 7:2639-42; 1996.

García-Ruiz PJ, Mena MA, Sánchez-Bernardos V, Díaz-Neira W, Giménez-Roldan S, Benítez J, et al. Cerebrospinal fluid homovanilic acid is reduced in untreated Huntington's disease. *Clin Neuropharmacol* 18: 58-63; 1995.

Gil JM, Rego AC. Mechanisms of neurodegeneration in Huntington's disease. *Eur J Neurosci* 27: 2803-20; 2008.

Gong B, Lim MC, Wanderer J, Wytenbach A, Morton AJ. Time-lapse analysis of aggregate formation in inducible PC12 cell model of Huntington's disease reveals time-dependent aggregate formation that transiently delays cell death. *Brain Res Bull* 75: 146- 57; 2008.

Guimaraes JS, Freire MA, Lima RR, Souza-Rodriguez RD, Costa AMR, Dos Santos CD, et al. Mecanismos de degeneración secundaria en el sistema nervioso central durante los trastornos neuronales agudos y el daño en la sustancia blanca. *Rev Neurol* 48: 304-10; 2009.

Hadju J, Wyss SR, Aebi H. Properties of human erythrocyte catalases after crosslinking with bifunctional reagents: symmetry of the quaternary structure. *Eur J Biochem* 80:199-207; 1977.

Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nut* 16, 3-50; 1996.

Hansson O, Petersen A, Leist M, Nicotera P, Castilho RF, Brundin P. Transgenic mice expressing a Huntington's disease mutation are resistant to quinolinic acid induced striatal excitotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 827-32; 1999.

Harris GJ, Pearlson GD, Payser CE, Aylward EH, Roberts J, Barta PE, et al. Putamen volume reduction on magnetic resonance imaging exceeds caudate changes in mild Huntington's disease. *Ann Neurol* 31: 69-75; 1992.

Hecimovic S, Keplac N, Vlastic J, Vojta A, Janko D, Skarpa-Prpic I, et al. Genetic background of Huntington disease in Croatia: Molecular analysis of CAG, CCG, and Delta2642 (E2642del) polymorphisms. *Hum Mutat* 20: 233; 2002.

Heilman JM, Burke TJ, McClain CJ, Watson WH. Transactivation of gene expression by NF κ B is dependent on thioredoxinreductase activity. *Free RadicBiol Med* 51:1533-42; 2011.

Bibliografija

Henley S, Bates GP, Tabrizi SJ. Biomarkers for neurodegenerative diseases. *Curr Opin Neurol* 18: 698-705; 2005.

Hersch SM, Gevorkian S, Marder K, Moskowitz C, Feigin A, Cox M, et al. Creatine in Huntington's disease is safe, tolerable, bioavailable in brain and reduces serum 8OH²dG. *Neurology* 66: 250-2; 2006.

Hobbs NZ, Henley SM, Wild EJ, Leung KK, Frost C, Barker RA, et al. Automated quantification of caudate atrophy by local registration of serial MRI: evaluation and application in Huntington's disease. *Neuroimage* 47: 1659-65; 2009.

Hsiao HY, Chern Y. Targeting glial cells to elucidate the pathogenesis of Huntington's disease. *Mol Neurobiol* 41:248-55; 2010.

Hsiao HY, Chern Y. Targeting glial cells to elucidate the pathogenesis of Huntington's disease. *Mol Neurobiol*. 41:248-55; 2010.

Huntington Study Group. Unified Huntington's disease rating scale: Reliability and consistency. *Mov Disor* 11: 136-42; 1996.

Ilic T, Jovanovic M, Jovicic A, Tomovic M. Oxidative stress and Parkinson's disease. *Vojnosanit Pregl* 55: 463-8; 1998.

Irani K, Xia Y, Zweier JL, Sollott SJ, Der CJ, Fearon ER, et al Mitogenic signalling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. *Science* 265:808-11; 1997.

Jin YN, Yu YV, Gundemir S, Jo C, Cui M, Tieu K, Johnson GV. Impaired mitochondrial dynamics and nrf2 signaling contribute to compromised responses to oxidative stress in striatal cells expressing full-length mutant huntingtin. *Plos One* 8: e57932; 2013.

Johri A, Beal F. Antioxidants in Huntington's disease. *Biochim Biophys Acta* 1822: 664-74; 2012.

Katsuno M, Adachi H, Sobue G. Getting handle on Huntington's disease: the case for cholesterol. *Nat Med* 15: 523-54; 2005.

Khalatbary AR. Olive oil phenols and neuroprotection. *Nutr Neurosci* (en prensa); 2013.

Kharrazi H, Vaisi-Raygani A, Rahimi Z, Tavilani H, Aminian M, Pourmotabbed T. Association between enzymatic and non-enzymatic antioxidant defence mechanism with apolipoprotein E genotypes in Alzheimer disease. *Clin Biochem* 41: 932-6; 2008.

Kiebertz K, MacDonald M, Shih CH, Feigin A, Steinberg K, Bordwell K, et al. Trinucleotide repeat length and progression of illness in Huntington's disease. *J Med Genet* 31: 872-4; 1994.

Kim JS, Kornhuber HH, Holzmüller B, Schmid-Burgk W, Mergner T, Krzepinski G. Reduction of cerebrospinal fluid glutamic acid in Huntington's disease and schizophrenic patients. *Arch Psychiatr Nervenkr* 228: 7-10; 1980.

Kimura Y, Lee WC, Littleton JT. Therapeutic prospects for the prevention of neurodegeneration in Huntington's disease and the polyglutamine repeat disorders. *Mini Rev Med Chem* 7: 99-106; 2007.

Klepac N, Relja M, Klepac R, Hecimovic S, Babic T, Trkulja V. Oxidative stress parameters in plasma of Huntington's disease patients, asymptomatic Huntington's disease gene carriers and healthy subjects. *J. Neurol.* 254: 1676-83; 2007.

Bibliografia

Kumar P, Kalonia H, Kumar A. Huntington's disease: pathogenesis to animal models. *Pharmacol Rep* 62: 1-14; 2010.

Kumar P, Kumar A. Possible neuroprotective effect of *Withaniasomnifera* root extract against 3-nitropropionic acid-induced behavioral, biochemical, and mitochondrial dysfunction in an animal model of Huntington's disease. *J Med Food* 12:591–600; 2009.

Kurlan R, Goldblatt D, Zaczek R, Jeffines K, Irvine C, Coyle J, et al. Cerebrospinal fluid homovanilic acid and parkinsonism in Huntington's disease. *Ann Neurol* 24: 282-44; 1988.

Landles C, Bates GP. Huntingtin and the molecular pathogenesis of Huntington's disease. *EMBO Rep* 5: 958-63; 2004.

Lafon-Cazal M, Pietri S, Culcasi M, Bockaert J. NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity. *Nature* 364: 535-7; 1993.

Langbehn DR, Brinkman RR, Falush D, Paulsen JS, Hayden MR. A new model for prediction of the age onset and penetrance for Huntington's disease based on CAG length. *Clin Genet* 65: 267-77; 2004.

Leblhuber F, Walli J, Jellinger K, Tilz GP, Widner B, Laccone F, et al. Activated immune system in patients with Huntington's disease. *Clin Chem Lab Med* 36:747-50; 1998.

Lee YJ, Han SB, Nam SY, Oh KW, Hong JT. Inflammation and Alzheimer's disease. *Arch Pharm Res* 33:1539-56; 2010.

Lee JM, Ramos EM, Lee JH, Gillis T, Mysore JS, Hayden MR, et al. CAG repeat expansion in Huntington disease determines age at onset in a fully dominant fashion. *Neurology* 78: 690-5; 2012.

Lefaucheur JP, Ménard-Lefaucheur I, Maison P, Baudic S, Cesaro P, Peschanski M, et al. Electrophysiological deterioration over time in patients with Huntington's disease. *Mov Disord* 21: 1350-4; 2006.

Leoni V, Mariotti C, Tabrizi SJ, Valenza M, Wild EJ, Henley SM, et al. Plasma 24S-hydroxycholesterol and caudate MRI in pre-manifest and early Huntington's disease. *Brain* 131: 2851-9; 2008.

Leznicki P. Aggregation and toxicity of the proteins with polyQ repeats. *Postepy Biochem* 51: 215-22; 2005.

Li SH, Li XJ. Huntingtin-protein interactions and the pathogenesis of Huntington's disease. *Trends Genet* 20: 164-54; 2004.

Liu CS, Cheng WL, Kuo SJ, Li JY, Soong BW, WEi YH. Depletion of mitochondrial DNA in leukocytes of patients with poly-Q diseases. *J Neurol Sci* 264: 18-21; 2008.

Long JD, Matson WR, Juhl AR, Leavitt BR, Paulsen JS and the PREDICT-HD Investigators and Coordinators of the Huntington Study Group. (OHdG as a marker for Huntington disease progression. *Neurobiol Dis* 46: 625-34; 2012.

Lorigados L, Pavon N, Serrano T, RobinsonMA. Nerve growth factor and neurological diseases. *Rev Neurol* 26:744-8; 1998.

Loscalzo J. The oxidative stress of hyperhomocysteinemia. *J Clin Invest* 98:5-7; 1996.

Maiorino M, Ursini F. Oxidative stress, spermatogenesis and fertility. *Biol Chem* 383:589-75; 2002

Bibliografía

Maksimovic ID, Jovanovic MD, Malicevic Z, Colic M, Ninkovic M. Effects of nerve and fibroblast growth factors on the production of nitric oxide in experimental model of Huntington's disease. *Vojnosanit Pregl* 59:119-23; 2002.

Markianos M, Panas M, Kalfakis N, Hatzimanolis J, Vassilopoulos D. Neuroendocrine evidence of normal hypothalamus-pituitary dopaminergic function in Huntington's disease. *Neuro Endocrinol Lett* 31: 359-62; 2012.

Markianos M, Panas M, Kalfakis N, Vassilopoulos D. Plasma testosterone, dehydroepiandrosterone sulphate, and cortisol in female patients with Huntington's disease. *Neuro Endocrinol Lett* 28: 199-203; 2007.

Markianos M, Panas M, Kalfakis N, Vassilopoulos D. Plasma homovanilic acid and prolactin in Huntington's disease. *Neurochem Res* 34: 917-22; 2009.

Markianos M, Panas M, Kalfakis N, Vassilopoulos D. Los plasma total cholesterol in patients with Huntington's disease and first-degree relatives. *Mol Genet Metab* 93: 341-6; 2008.

Markianos M, Panas M, Kalfakis N, Vassilopoulos D. Plasma testosterone in male patients with Huntington's disease: relation to severity of illness and dementia. *Ann Neurol* 57: 520-5; 2005.

Matthews RT, Yang L, Jenkins BG, Ferrante RJ, Rosen BR, Kaddurah-Daouk R, et al. Neuroprotective effects of creatine and cyclocreatine in animal models of Huntington's disease. *J Neurosci* 18:156-63; 1998.

Mattson MP. Accomplices to neuronal death. *Nature* 415: 377-9; 2002

Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Ann Rev Biochem* 52:711-760; 1983.

Menalled LB, Sison JD, Dragatsis Im, Zeitlin S, Chesselet MF. Time course of early motor and neuropathological anomalies in a knock-in mouse model of Huntington's disease with 140 CAG repeats. *J Comp Neurol* 465: 11-26; 2003.

Miller RL, James-Kracke M, Sun GY, Sun AY. Oxidative and inflammatory pathways in Parkinson's disease. *Neurochem Res* 34:55-65; 2009.

Mochel F, Benaich S, Rabier D, Durr A. Validation of plasma branched chain amino acids as biomarkers in Huntington's disease. *Arch Neurol* 68: 265-7; 2011.

Mochel F, Charles P, Seguin F, Barriatault J, Coussieu C, Perin L, et al. Early energy deficit in Huntington disease: identification of a plasma biomarker traceable during disease progression. *PLOS One* 2:e647; 2007.

Nasir J, Lafuente MJ, Duan K, Colomer V, Engelender S, Ingersoll R, et al. Human huntingtin-associated protein (HAP-1) gene: genomic organization and an intragenic polymorphism. *Gene* 254: 181-7; 2003

Nguyen I, Bradshaw JL, Stout JC, Croft RJ, Georgiou-Karistianis N. Electrophysiological measures as potential biomarkers in Huntington's disease: review and future directions. *Brain Res Rev* 64: 177-94; 2010.

Nopoulos OC, Aylward EH, Ross CA, Johnson HJ, Magnotta VA, Juhl AR, et al. Cerebral cortex structure in prodromal Huntington disease. *Neurobiol Dis* 40:544-54; 2010.

Nopoulos PC, Aylward EH, Ross CA, Mills JA, Langbehn DR, Johnson HJ, et al. Smaller intracranial volume in prodromal Huntington's disease: evidence for abnormal neurodevelopment. *Brain* 134: 137.42; 2011.

Bibliografía

Orr WC, Sohal RS. Extensión of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science* 263: 1128-30; 1994.

Palmer HJ, Paulson KE. Reactive oxygen species and antioxidants in signal transduction and gene expression. *Nutr Rev* 55:353-61; 1997.

Paulsen JS, Langbehn DR, Stout JC, Aylward E, Ross E, Nance CA, et al. Detection of Huntington's disease decades before diagnosis: the Predict-HD study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 79: 874-80; 2008.

Paulsen JS, Nopoulos PC, Aylward E, Ross CA, Johnson H, Magnotta VA, et al. *Brain Res Bull* 82: 201-7; 2010.

Pérez-De la Cruz V, Santamaría A. Integrative hypothesis for Huntington's disease: a brief review of experimental evidence. *Physiol Res* 56: 513-26; 2007.

Polidori MC, Mecocci P, Browne SE, Senin U, Beal MF. Oxidative damage to mitochondrial DNA in Huntington's disease parietal cortex. *Neurosci Lett* 272:53-6; 1999.

Popovic V, Svetel M, Djurovic M, Petrovic S, Doknic M, Pekic S, et al. Circulating and cerebrospinal fluid ghrelin and leptin: potential role in altered body weight in Huntington's disease. *Eur J Endocrinol* 151: 451-5; 2004.

Potenza RL, Tebano MT, Martire A, Domenici MR, Pepponi R, Armida M, et al. Adenosine A (2A) receptors modulate BDNF both in normal conditions and in experimental models of Huntington's disease. *Purinergic Signal* 3: 333-8; 2007.

Ramsey CP, Glass CA, Montgomery MB, Lindl KA, Ritson GP, Chia LA, et al. Expression of Nrf2 in neurodegenerative diseases. *J Neuropathol Exp Neurol* 66 :75-85; 2007.

Reilmann R, Rolf LH, Lange HW. Huntington's disease: The neuroexcitotoxin aspartate is increased in platelets and decreased in plasma. *J Neurol Sci* 127: 48-52; 1994.

Ribai P, Nguyen K, Hahn-Barma V, Gourfinkel-An I, Vidailhet M, Legout A, et al. Psychiatric and cognitive difficulties as indicators of juvenile Huntington disease on in 29 patients. *Arch Neurol* 64: 813-9; 2007.

Ricart-Jané D, Llobera M, López-Tejero MD. Anticoagulants and other preanalytical factors interfere in plasma nitrate/nitrite quantification by the Griess method. *Nitric Oxid* 6:178-85; 2002.

Rosas HD, Goodman J, Chen YI, Henkins BG, Kennedy DN, Makris N, et al. Striatal volume loss in HD as measured by MRI and the influence of CAG repeat. *Neurology* 47:1025-8; 2001.

Rosas HD, Koroshetz WJ, Chen YI, Skeuse C, Vangel M, Cudkowicz ME, et al. Evidence for more widespread cerebral pathology in early HD: an MRI-based morphometric analysis. *Neurology* 60:1615-20; 2003.

Rosas HD, Salat DH, Lee SY, Zaleta AK, Pappu V, Fischl B, et al. Cerebral cortex and the clinical expression of Huntington's disease: complexity and heterogeneity. *Brain* 131: 1057-68; 2008.

Ross CA, Tabrizi SJ. Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment. *Lancet Neurol* 10: 83-98; 2011.

Bibliografía

Ruiz C, Casarejos MJ, Gómez A, Solano R, de Yebener JG, Mena MA. Protection by glia-conditions medium in a cell model of Huntington disease. PLOS Curr 4: e4fbca54a2028b; 2012

Saleh N, Moutereau S, Durr A, Krystkowiak P, Azulay JP, Tranchant C, et al. Neuroendocrine disturbances in Huntington's disease. Plos ONE 4:e4962; 2009.

Sánchez-Rodríguez MA, Santiago-Osorio E, Vargas LA, Mendoza-Núñez VM. Propuesta de un constructo para evaluar integralmente el estrés oxidativo. Bioquímica 29: 81-90; 2004.

Santamaría A, Pérez-Severiano F, Rodríguez-Martínez E, Maldonado PD, Pedraza-Chaverri J, Ríos C, et al. Comparative analysis of superoxide dismutase activity between acute pharmacological models and a transgenic mouse model of Huntington's disease. Neurochem Res 26: 419-24; 2001.

Scalzo P, Kummer A, Bretas TL, Cardoso F, Teixeira AL. Serum levels of brain-derived neurotrophic factor correlate with motor impairment in Parkinson's disease. J Neurol 257:540-5; 2010.

Schuessel K, Leutner S, Cairns NJ, Müller WE, Eckert A. Impact of gender on upregulation of antioxidant defence mechanisms in Alzheimer's disease brain. J Neural Transm 111: 1167-82; 2004.

Shirbin CA, Chua P, Churchyard A, Hannan AJ, Lowndes G, Scout JC. The relationship between cortisol and verbal memory in the early stages of Huntington's disease. J Neurol (in press); 2012.

Sies H. Biochemistry of oxidative stress. Angew Chem Int Ed Engl 25, 1058-1071; 1986.

Soneson C, Fontes M, Zhou Y, Denivson V, Paulsen JS, Kirik D, et al. Early changes in the hypothalamic region in prodromal Huntington disease revealed by MRI analysis. *Neurobiol Dis* 40: 531-43; 2010.

Sorolla MA, Rodríguez-Colman MJ, Vall-Llaura N, Tamarit J, Ros J, Cabiscol E. Protein oxidativon in Huntington disease. *Biofactors* 38: 175-85; 2012.

Sorolla MA, Reverter-Branchat G, Tamarit J, Ferrer I, Ros J, Cabiscol E. Proteomic and oxidative stress analysis in human brain samples of Huntington disease. *Free Radic Biol Med* 45: 667-78; 2008.

Squitieri F, Orobello S, Cannella M, Martino T, Romanelli P, Giovacchini G, et al. Riluzole protects Huntington's disease patients from brain glucose hypometabolism and grey matter volume loss and increases production of neurotrophins. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 36: 1113-20; 2009.

Stahl SM, Thiemann S, Faull KF, Barchas JD, Berger PA. Neurochemistry of dopamine in Huntington's dementia and normal aging. *Arch Gen Psychiatry* 43: 161-4; 1986.

Steffan JS, Agrawal N, Pallos J, Rockabrand E, Trotman LC, Slepko N, et al. SUMO modification of Huntingtin and Huntington's disease pathology. *Science* 304: 100-4; 2004.

Stout JC, Paulsen JS, Queller S, Solomon AC, Whitlock KB, Campbell JC, et al. Neurocognitive signs in prodromal Huntington disease. *Neuropsychology* 25: 1-14; 2011.

Stoy N, Mackay GM, Forrest C M, Christofides J, Egerton M, Stone T W, et al. Tryptophan metabolism and oxidative stress in patients with Huntington's disease. *J Neurochem* 93: 611-23; 2005.

Bibliografía

Strong TV, Tagle DA, Valdes JM, Elmer LW, Boehm K, Swaroop M, et al. Widespread expression of the human and rat Huntington's disease gene in brain and nonneural tissues. *Nat Genet* 5: 259-65; 1993.

Sturrock A, Laule C, Decolongon J, Dar Santons R, Coleman AJ, Creighton S, et al. Magnetic resonance spectroscopy biomarkers in premanifest and early Huntington disease. *Nurology* 75: 1702-10; 2010.

Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Irani K, Finkel T. Requirements for generation of H₂O₂ for PDGF signal transduction. *Science* 270:296-99; 1995.

Suzuki YJ, Forman HJ, Sevanian A. Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radic Biol Med* 22:269-85; 1997.

Tabrizi SJ, Cleeter MW, Xuereb J, Taanman JW, Cooper JM, Schapira AH. Biochemical abnormalities and excitotoxicity in Huntington's disease brain. *Ann Neurol* 45:25-32; 1999.

Tabrizi SJ, Langbehn DR, Leavitt BR, Roos RA, Durr A, Caufurd D, et al. Biological and clinical manifestations of Huntington's disease in the longitudinal TRACK-HD study: cross-sectional analysis of baseline data. *Lancet Neurol* 8: 791-801; 2009.

Tabrizi SJ, Reilmann R, Roos RA, Durr A, Leavitt Bowen G., et al. Potential endpoints for clinical trials in premanifest and early Huntington's disease in the TRACK-HD study: analysis of 24 month observational data. *Lancet Neurol* 11: 42-53; 2012.

Tabrizi SJ, Workman J, Hart PE, Mangiarini L, Mahal A, Bates G., et al. Mitochondrial dysfunction and free radical damage in the Huntington R6/2 transgenic mice. *Ann Neurol* 47: 80-6; 2000.

Taherzadeh-Fard E, Saft C, Andrich J, Wieczorek S, Arning L. PGC-1-alpha as modifier of onset age in Huntington disease. *Mol Neurodegener* 4: 10; 2009.

Takahashi M, Ishikawa K, Sato N, Obayashi M, Niimi Y, Ishiguro T, et al. Reduced brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expresión and presence of BDNF-immunoreactive granules in the spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6) cerebellum. *Neuropathology* 32: 595-603; 2012.

Tasset I, Pérez de la Cruz V, Elinos-Calderón D, Carrillo-Mora P, González-Herrera IG, Luna-López A, et al. Protective effect of ter-butylhydroquinone on the quinolinic-acid induced toxicity in striatal slices: role of the Nrf2-antioxidant response element pathway. *Neurosignals* 18: 24-31; 2012.

Tasset I, Sánchez F, Túnez I. Bases moleculares de la enfermedad de Huntington: papel del estrés oxidativo. *Rev Neurol* 49: 424-9; 2009.

Terradez P, Asensi M, Lasso de la Vega MC, Puertes IR, Viña J, Estrela JM. Depletion of tumor glutathione in vivo by buthionine sulphoximine: modulation by the rate of cellular proliferation and inhibition of cancer growth. *Biochem J* 292: 477-83; 1993

Teixeira AL, Bretas TL, Kummer A, Melo LC, Baraldi A, Harsanyi E, et al. Serum levels of brain-derived neurotrophic factor in Sydenham's chorea. *Neurol Sci* 31:399-401; 2010.

Tunez I, Collado JA, Medina FJ, Pena J, Muñoz MC, Jimena I, et al. 17 beta-Estradiol may affect vulnerability of striatum in a 3-nitropropionic acid-induced experimental model of Huntington's disease in ovariectomized rats. *Neurochem Int* 48:367-73; 2006.

Bibliografía

Túnez I, Montilla P, Muñoz MC, Feijóo M, Salcedo M. Protective effect of melatonin on 3-nitropropionic acid-induced oxidative stress in synaptosomes in an animal model of Huntington's disease. *J Pineal Res* 37: 252-6; 2004.

Ubhi K, Rockenstein E, Mante M, Inglis C, Adame A, Patrick C, et al. Neurodegeneration in a transgenic mouse model of multiple system atrophy is associated with altered expression of oligodendroglial-derived neurotrophic factors. *J Neurosci* 30:6236-646; 2010.

Underwood BR, Broadhurst D, Dunn WB, Ellis DI, Michell AW, Vacher C, Mosedale DE, Kell DB, Barker RA, Grainger DJ, Rubinsztein DC. Huntington disease patients and transgenic mice have similar pro-catabolic serum metabolite profile. *Brain* 129: 877-86; 2006.

Vamos E, Voros K, Vecsei L, Klivenyi P. Neuroprotective effects of L-carnitine in a transgenic animal model of Huntington's disease. *Biomed Pharmacother* 64:282-6; 2010.

van der Hiele K, Jurgens CK, Vein AA, Reijntjes RH, Witjes-Ané MN, Ross RA, et al. Memory activation reveals abnormal EEG in preclinical Huntington's disease. *Mov Disord* 22: 690-5; 2007.

van Roon-Mom WM, Pepers BA, 't Hoen PA, Verwijmeren CA, Den Dunnen JT, Dorsman JC, et al. Mutant huntingtin activates Nrf2-responsive genes and impairs dopamine synthesis in a PC12 model of Huntington's disease. *BCM Mol Biol* 9: 9-84; 2008.

Vaughan M. Oxidative modification of macromolecules minireview series. *J Biol Chem* 272:18513; 1997.

Voetman AA, Loos JA, Roos D. Changes in the levels of glutathione in phagocytosing human neutrophils. *Blood* 55:741-747; 1980.

Vural H, Demirin H, Kara Y, Eren I, Delibas N. Alterations of plasma magnesium, copper, zinc, iron and selenium concentrations and some related erythrocyte antioxidant enzyme activities in patients with Alzheimer's disease. *J Trace Elem Med Biol* 24: 169-73; 2010.

Walker F. Huntington's disease. *Lancet* 369: 218-28; 2007.

Wang H, Yang G, Prabhakar NR, Boswell M, Katz DM. Secretion of brain-derived neurotrophic factor from PC12 cells in response to oxidative stress requires autocrine dopamine signalling. *J Neurochem* 96: 694-705; 2006.

Warner JP, Barron LH, Brock DJH. A new polymerase chain reaction (PCR) assay for the trinucleotide repeat that is unstable and expanded on Huntington's disease chromosomes. *Mol Cell Probes* 7: 235-39; 1993.

Weir DW, Sturrock A, Leavitt BR. Development of biomarkers for Huntington's disease. *Lancet Neurol* 10: 573-90; 2011.

Weiss A, Klein C, Woodman B, Sathasivam K, Bibel M, Réquillier E, et al. Sensitive biochemical aggregate detection reveals aggregation onset before symptom development in cellular and murine models of Huntington's disease. *J Neurochem* 104: 846-58; 2008.

Wexler NS, Young AB, Tanzi RE, Travers H, Starosta-Rubinstein S, Penney JB, et al. Homozygotes for Huntington's disease. *Nature* 326: 194-7; 1987.

Wild E, Björkqvist M, Tabrizi SJ. Immune markers for Huntington's disease? *Exp Rev Neurother* 8: 1779-81; 2008.

Bibliografía

Yang SH, Cheng PH, Banta H, Nitsche KP, Yang JJ, Cheng CH, et al. Towards a transgenic model of Huntington's disease in a non-human primate. *Nature* 453: 921-4; 2008.

Zuccato C, Cattaneo E. Role of brain-derived neurotrophic factor in Huntington's disease. *Prog Neurobiol* 81: 294-330; 2007.

Zhang DK, He FQ, Li TK, Pang XH, Cui de J, Xie Q, et al. Glial-derived neurotrophic factor regulates intestinal epithelial barrier function and inflammation and is therapeutic for murine colitis. *J Pathol* 222:213-22; 2010.

Anexos

Proteína) y hemos estudiado el papel de su interacción en la regulación de la muerte celular. XIAP es un miembro de la familia de inhibidores de la apoptosis que detiene la muerte celular bloqueando la acción de las caspasas (aspartato cisteína-proteasas). Nuestros resultados muestran mediante estudios de co-immunoprecipitación, la interacción de FAF1 con XIAP y el dominio específico de la interacción. Estos resultados se han confirmado con ensayos de inmunocitoquímica y colocalización celular. Se ha observado como la activación de la vía NF- κ B producida por estimulación TNF α o Lipopolisacárido, es reducida por la sobreexpresión de FAF1. Esta acción se lleva a cabo por la interacción y secuestro citoplasmático del factor NF- κ B p65. El incremento de XIAP en estas condiciones bloquea la acción de FAF1 sobre la vía NF- κ B. De igual forma hemos observado la acción contrapuesta en la activación de la vía caspasa-dependiente. Hemos observado mediante citometría de flujo el papel citoprotector de XIAP en el proceso apoptótico y su regulación debida a FAF1. El estudio del balance entre estos dos factores XIAP/FAF1 ayudará al conocimiento de su papel en los procesos neurodegenerativos en los que se encuentran involucrados.

Agradecimientos: este trabajo ha sido financiado por la Fundación Mutua Madrileña de Investigación Médica y la Consejería de Sanidad de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha

P 157 EL INHIBIDOR X-LINKED INHIBITOR OF APOPTOSIS PROTEIN (XIAP) BLOQUEA LA RESPUESTA APOPTÓTICA AL ESTRÉS DEL RETÍCULO ENDOPLÁSMÁTICO

Navarro-Suiz RM¹, Yunta M¹, López-Rodríguez M¹, Nieto-Díaz M¹, Reigada D¹, Pita-Thomas DV¹, Lindholm D², Maza RM¹

1. Laboratorio de Neuroprotección Molecular, Dpto. de Neurología Experimental, Hospital Nacional de Parapléjicos, SESCAM, Toledo; 2. The Minerva Foundation Institute for Medical Research, Neuroscience Unit, Finland

La respuesta al estrés del retículo endoplasmático consiste en un conjunto de mecanismos adaptativos que buscan restablecer la homeostasis del retículo cuando este se ve alterado. Cuando el estrés del RE persiste, se desencadena la muerte celular programada (apoptosis). Reticulons son un grupo de proteínas transmembrana que se caracterizan por conservar un alto nivel de homología en su dominio C-terminal, localizándose principalmente en el retículo endoplasmático (RE). El presente estudio se centró en el papel desempeñado por reticulon-1C (RTN1C) en el proceso apoptótico inducido por estrés del RE. RTN1C ha sido identificado como una proteína de unión de XIAP utilizando cultivos de levadura (two-hybrid) y genoteca procedente del cerebro fetal humano. XIAP pertenece a la familia de proteínas inhibidoras de apoptosis que actúan como bloqueantes naturales de caspasas. La interacción RTN1C/XIAP fue confirmada por co-immunoprecipitación, inmunocitoquímica seguida de co-localización. La sobreexpresión de RTN1C en las células de neuroblastoma humano (SH5YSY), conduce a apoptosis debida al estrés-RE. Cuando se combinan, sobreexpresión de Rtn1C y estrés-RE produce la estimulación de la vía apoptótica caspasa-dependiente observándose la activación de la caspasa-12, la caspasa-9 y caspasa-3. Esta activación de la vía caspasa-dependiente conduce a una mayor muerte celular observada con citometría de flujo (Annexin V y tinción DAPI). En estas condiciones la sobreexpresión de XIAP reduce tanto el porcentaje de células apoptóticas así como la activación de las caspasas. Al igual que XIAP es capaz de regular la acción de otros factores pro-apoptóticos (caspase3 o SMAC / Diablo) mediante ubiquitinación, hemos observado como RTN1C es un sustrato del proceso de ubiquitinación debida a XIAP. Estos resultados ponen de manifiesto que esta nueva interacción entre Rtn1C y XIAP podría modular la respuesta de supervivencia de la célula ante estímulos citotóxicos que producen estrés-RE.

Agradecimientos: este trabajo ha sido financiado por la Fundación Mutua Madrileña de Investigación Médica y la Consejería de Sanidad de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha

P 158 PPAR- α KNOCK-OUT MICE PRESENT A SUBSTANTIA NIGRA REDUCED IN SIZE AND LOW LEVELS OF ANTIOXIDANT ENZYMES, AND THE PPAR- α AGONIST OLEOYLETHANOLAMIDE PROTECTS THE NIGRO-STRIATAL CIRCUIT OF PARKINSONIAN MICE AGAINST MPTP

González-Agarcía R, Fernández-Espejo E

Departamento de Fisiología Médica y Biofísica, Universidad de Sevilla, 41009 Sevilla

First, activation of the nuclear receptors PPAR- α has a neuroprotective effect in the parkinsonian MPTP model in mice, through inhibition of inflammation, oxidative stress and/or apoptosis, and the absence of functional PPAR- α in mice leads to increased inflammatory responses. The objective was to study the effects of PPAR- α deletion on the levels of antioxidant enzymes and nitric oxide in WT and PPAR- α knock-out C57BL/6 mice. The results revealed that mutant mice showed a lower number of substantia nigra dopamine neurons relative to WT mice ($p < 0.05$), although TH density was similar in both groups. Basal anti-oxidant enzyme levels (glutathione peroxidase, glutathione S transferase, superoxide dismutase) were significantly reduced in the substantia nigra of KO mice ($p < 0.05$). Second, oleoylethanolamide (OEA), an agonist of nuclear PPAR- α receptors/antagonist of vanilloid TRPV1 receptors, has been reported to show cytoprotective properties, and studies in the lab have shown its partial neuroprotective efficacy against oxidative stress on culture dopamine neurons as well as in vivo after local treatment in parkinsonism. In this study, the potentially neuroprotective efficacy of systemic OEA has been tested in a parkinsonian model based on MPTP-induced degeneration of substantia nigra dopamine neurons. All mice were treated with systemic OEA (0, 0.5, 1, and 5 mg/kg IP) two hours before and after acute MPTP administration (40 mg/kg IP). One week after treatment, animals were sacrificed, and following TH immunostaining, striatal and nigral TH-ir was quantified with the Scion programme. The findings revealed that 5 mg/kg OEA was able to significantly reduce loss of striatal TH-ir fibers, and nigral TH-ir neurons. Interestingly, the neuroprotective effect on striatal TH density was also found in PPAR- α knock-out mice, suggesting that OEA protective effects are not mediated by its agonistic action upon PPAR- α receptors at the level of the striatum. To sum up, systemic 5 mg/kg OEA seems to exert neuroprotective effects in parkinsonian mice, and nigral but not striatal effects seem to be mediated by PPAR- α receptors.

Supported by grants to EFE from Junta de Andalucía, Spain (BIO127, and Proyectos de Excelencia, EXC2006/CV1127-1716), Spanish Network for addictive disorders (Instituto Carlos III, RD06/0001), Red TerCel (Instituto Carlos III), and Fundació La Marató de TV3 de Catalunya. We thank Dr. Isaac Tunes (University of Córdoba) for ELISA measurements

P 159 DAÑO OXIDATIVO AL DNA EN PACIENTES CON LA ENFERMEDAD DE HUNTINGTON

Tassat J¹, Sánchez F², Fernández R³, Sánchez FM⁴, Agüera E², Tunes I^{1*}

1. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Córdoba, Córdoba; 2. Servicio de Neurología, Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba, Córdoba; 3. Servicio de Neurología, Hospital Universitario Nuestra Señora de Valme, Sevilla; 4. Instituto Maimónides de Investigaciones Biomédicas de Córdoba (IMBIC), Córdoba

El objetivo de nuestro estudio fue determinar el daño oxidativo al DNA en pacientes con enfermedad de Huntington (EH). Para alcanzarlo, se seleccionaron 19 pacientes con EH (10 mujeres y 9 varones) y 15 sujetos sanos (tabulados según edad y sexo). Se determinó el daño oxidativo al DNA (8-OHdG) en el plasma de los sujetos incorporados al estudio, así como otros biomarcadores de estrés oxidativo (proteínas carboniladas; GSH; PAO y SOD). Nuestros datos muestran la existencia de estrés oxidativo en pacientes con EH caracterizado por incrementos significativos en los

was 53.7 for HC, 46.3 for PD and 50 for HD. For HD subjects, the mean UHDRS motor score was 10 and mean total functional capacity was 13. For PD subjects mean UHDRS total score was 10.3 and mean Hoehn and Yahr score was 1.3, and duration of diagnosis was < 2 years for all subjects. The mean 18F-FPET striatal/dorsal ratio was 2.9 (HD), 5.4 (HC) and 5.4 (PD). **CONCLUSIONS/RELEVANCE:** 18F-FPET is a promising PET radiotracer for evaluating rCBF with excellent characteristics for human imaging. Preliminary data from this ongoing study suggests that 18F-FPET PET uptake is reduced in striatal and neocortical regions in early HD subjects. Additional studies are ongoing to evaluate 18F-FPET in later stages of PD and HD and the potential role of rCBF in PD related dysfunction. **Supported by:** Michael J Fox Foundation.

Disclosure: Dr. Aronow has nothing to disclose. Dr. Hariz holds stock and/or stock options in Molecular Neuroimaging, which sponsored research in which Dr. Hariz was involved as an investigator. Dr. Razouk has received personal compensation for activities with Molecular Neuroimaging as an employee. Dr. Bawa has received personal compensation for activities with Molecular Neuroimaging as an employee. Dr. Razouk has received personal compensation for activities with Molecular Neuroimaging as an employee. Dr. Bawa has received personal compensation for activities with Molecular Neuroimaging as an employee. Dr. Hariz has received personal compensation for activities with Molecular Neuroimaging as an employee. Dr. Hariz has received personal compensation for activities with Molecular Neuroimaging as an employee. Dr. Hariz has received personal compensation for activities with Molecular Neuroimaging as an employee. Dr. Hariz has received personal compensation for activities with Molecular Neuroimaging as an employee.

P05.027

Off Test for Patients Treated with Globus Pallidus Internus Deep Brain Stimulation for Huntington's Disease

Victoria Gonzalez-Martinez, Laura Cif, Brigitte Boffé, Ana María Muñoz, Hassan El Ferit, Philippe Coubes, Montpellier, France

OBJECTIVE: To evaluate the clinical response to off tests (stimulation) among patients treated by bilateral Globus Pallidus internus (GPi) Deep Brain Stimulation (DBS) for Huntington's Disease. **BACKGROUND:** Eight patients with Huntington's disease have been treated in our center with GPi DBS since 2003. Preliminary results show sustained effect on chorea, high frequency stimulation (30Hz) led to reduction of the UHDRS chorea item of 36.4(%) at 12 months, 54.4(%) at last follow up visit. **DESIGN/METHODS:** Six of the patients underwent off test in the follow up (two of them had been operated more than 2 years before). Patients were videotaped before and after turning off stimulation. **RESULTS:** Average time after surgery (TAS) was: 26.5 ± 17.47 months. Two patients (average TAS: 37 months) had immediate and severe worsening of generalized chorea, and steady gait, without any change in dystonia. The test could not be prolonged further than 1 hour because of severe worsening. Choreo diminished gradually within 15 minutes after turning on stimulation, with complete recovery after 1 hour. In two other patients (average TAS 10 months) had progressive worsening evident after 3 hours. c) Slow worsening of chorea, and steady gait, without any change in dystonia. The test could not be prolonged further than 1 hour because of severe worsening. Choreo diminished gradually within 15 minutes after turning on stimulation, with complete recovery after 1 hour. In two other patients (average TAS 10 months) had progressive worsening evident after 3 hours. **CONCLUSIONS/RELEVANCE:** GPi DBS leads to a reversible effect on chorea. Immediate worsening was only seen in patients with a shorter follow-up. Different results could explain more progressive worsening seen in patients with a longer follow-up.

Disclosure: Dr. Gonzalez-Martinez has nothing to disclose. Dr. Cif has nothing to disclose. Dr. Boffé has nothing to disclose. Dr. Muñoz has nothing to disclose. Dr. El Ferit has nothing to disclose. Dr. Coubes has received personal compensation for activities with Medtronic Inc., as a consultant.

P05.028

Upper Face Chorea in Huntington Disease

Robert Jankovic, Houston, TX

OBJECTIVE: To characterize upper facial chorea in patients with Huntington disease (HD). **BACKGROUND:** Facial involuntary movements are associated in a variety of disorders including tardive dyskinesia, cerebral dystonia, and HD. Because of some overlapping clinical features there is a need to better characterize the phenomenology of the movements, particularly those involving the upper face, which may aid in the differential diagnosis of the facial dyskinesias. **DESIGN/METHODS:** Patient database at the Parkinson's Disease and Movement Disorders Center was queried for active patients with the diagnosis of HD whose examination was videotaped. Video of 25 patients with confirmed diagnosis of HD and their medical records were reviewed and scored on the following scale, adapted from the Jankovic Rating Scale (Jankovic et al. *Mov Disord* 2009;24:407-13): Eye Closing (0-4), Eye Opening (0-4), Protrusion/Retraction (0-3). In addition, the UHDRS scores for items 1, 2, 3, and UHDRS motor total score were entered into the database. **RESULTS:** Average age was 62 years, average age at initial evaluation 50 years. 62% were male and average CAQ (epid) length was 44. Of the 25 patients evaluated, 79% exhibited intermittently witnessed palpebral fissures associated with frontal contractions. Periods of continuous repetitive blinking were observed in 14% and 8% had spasms of the orbital periorbital or the orbicularis oculi muscles. Protrusion and retraction supercilii contractions were noted in 32% of all patients and were rated as frequent in 24%, continuous in 30%, and rare in 12% of the patients. **CONCLUSIONS/RELEVANCE:** Based on rating of video from 25 patients with HD, upper facial chorea was present in 88% and was manifested chiefly by frontal contractions and widening of palpebral fissures. This phenomenological characterization may

be used in the differential diagnosis of facial dyskinesias. **Supported by:** See disclosures below.

Disclosure: Dr. Jankovic has nothing to disclose. Dr. Anderson has received personal compensation for activities with Allergan, Inc., Bayer, Michael J. Fox Foundation, Merit Pluram, Lundbeck Inc., and Teva Neuroscience as a consultant. Dr. Anderson received personal compensation in an advisory capacity for MedLife, Neurologix. Jankovic has received research support from Allergan, Inc., Boehringer Ingelheim, Inc., Novartis, Inc., Cognate Inc., Chiron International, Inpa Pharmaceuticals, Inc., Linnat, Medtronic, Inc., New Phospha, St. Jude Medical, and Teva Neuroscience.

P05.029

Impact of Caffeine Intake on Huntington's Disease (HD) Course

Cécile Duru, Amiens, France, Catherine Siméon, Florence Richard, Pascale Huetter, Julie Sallmann, Lilla, France, Perrine Charles, Paris, France, Karim Youssef, Créteil, France, Sylvie Barnoof, Lille, France, Jean-Philippe Arnaud, France, Christophe Vercy, Angers, France, Christophe Tranchesi, Strasbourg, France, Cyril Guinet, Bordeaux, France, Luc Delbecq, Bernard Sabatier, Maurice Rivoux, Luc René, Philippe Amoyal, Lille, France, Olivier Godefroy, Amiens, France, Alexandra Diot, Paris, France, Anne-Catherine Bachon, Crotail, France, David Blum, Lille, France, Pierre Krathmann, Amiens, France

OBJECTIVE: To determine whether in HD, the age at onset (AAO), the time to diagnosis (T2D), and the rates of functional, motor and cognitive decline (secondary endpoints) are influenced by caffeine intake. **BACKGROUND:** Currently, HD progression cannot be predicted by any neurobiological treatment despite major advances in the understanding of the pathogenesis. The relationship between the AAO and the length of the CAG repeat expansion remains to be mostly unclear whereas the 40% of remaining would be due to other genetic and environmental factors. Caffeine is a non-selective A2 adenosine (A2A) receptor antagonist which are selectively localized on striatal medium-sized neurons expressing dopamine and dopamine D2 receptors, known to be the most vulnerable in HD. **DESIGN/METHODS:** 82 HD patients were included from a Huntington French Speaking Network who over a six-month period, information about caffeine consumption was collected with one validated questionnaire. All patients were evaluated twice a year (at least 1 year between 2 assessments) using the Unified Huntington's Disease Rating Scale. Factors influencing AAO were examined using a stepwise regression analysis. **RESULTS:** The comparative rates of functional decline and demographic characteristics with other published studies suggest that our study population was representative of HD patients. The mean daily caffeine intake from all sources for the period of the last 10 years was 229 mg/day. We found a significant correlation between AAO and caffeine intake ($P=0.041$, $r=0.018$), so high caffeine intake was associated with later AAO. However, we failed to demonstrate a relation between caffeine intake and the rate of the functional, motor and cognitive decline. **CONCLUSIONS/RELEVANCE:** Our findings could have a great therapeutic impact because they suggest that caffeine could be the first environmental modifier of AAO in HD. Consequently, the modulation of A2A receptors may represent new therapeutic approaches of HD.

Disclosure: Dr. Duru has nothing to disclose. Dr. Richard has nothing to disclose. Dr. Huetter has nothing to disclose. Dr. Sallmann has nothing to disclose. Dr. Charles has nothing to disclose. Dr. Youssef has nothing to disclose. Dr. Barnoof has nothing to disclose. Dr. Arnaud has nothing to disclose. Dr. Vercy has nothing to disclose. Dr. Tranchesi has nothing to disclose. Dr. Guinet has nothing to disclose. Dr. Delbecq has nothing to disclose. Dr. Sabatier has nothing to disclose. Dr. Rivoux has nothing to disclose. Dr. René has nothing to disclose. Dr. Godefroy has nothing to disclose. Dr. Diot has nothing to disclose. Dr. Bachon has nothing to disclose. Dr. Blum has nothing to disclose. Dr. Krathmann has nothing to disclose.

P05.030

Increases of 8-Hydroxy-2-Deoxyguanosine Plasma Levels in Patients with Huntington's Disease

Inés Tóvez, Inmaculada Tassó, Eduardo Aguirre-Cerdoba, Spain, Francisco Sánchez, Ricardo Fernández-Rodríguez, Sevilla, Spain, Fernando Sánchez-López, Córdoba, Spain

OBJECTIVE: This study sought to determine oxidative damage in HD patients with Huntington's disease (HD). **BACKGROUND:** The oxidation of different molecules such as lipids (especially membrane phospholipids) and proteins and nucleic acids are involved in the pathogenesis of various neurodegenerative diseases as HD, Alzheimer's disease, Parkinson's disease and other. **DESIGN/METHODS:** For this purpose, 10 patients with HD (10 females, 9 males) and 10 healthy subjects (matched by age and sex) were selected. Oxidative damage to DNA (marker: 8-hydroxy-2-deoxyguanosine, 8-OHdG) was measured in the plasma of study subjects along with other biomarkers of oxidative stress such as, carbonylated proteins, reduced glutathione (GSH), antioxidant power (APO) and antioxidant gap (GAP) reflects the oxidized activity of plasma antioxidants are not (ascorbic acid or uric acid). In addition, lipid peroxidation products (LPO) were determined in erythrocytes. LPO and GSH were determined by the purchased in Biacore's S.A. and FAO and 8-OHdG kits were purchased in Deltalab S.A. and JALCA, respectively. **RESULTS:** Results confirm oxidative stress in HD patients, evident in a significant increase in 8-OHdG in erythrocytated plasma and in lipid peroxidation products, accompanied by a reduction in GSH levels, APO and GAP. **CONCLUSIONS/RELEVANCE:** These results confirm the existence of intense oxidative damage to DNA, accompanied by generalized oxidative stress. These findings support the hypothesis that oxidative stress plays a major role in the pathogenesis

THURSDAY,
APRIL 15

Póster-Grupo Radicales Libres

PO163 - Natalizumab reduce el daño oxidativo en pacientes con esclerosis múltiple

Inmaculada Tasset, Eduardo Agüera, Fernando Sánchez, Rosa Olmo, Ana Isabel Giraldo, Felix Gascón, Antonio Hinojosa, Montserrat Feijóo, Isaac Túnez
Dpto. Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, MIBIC/Universidad de Córdoba

La terapéutica para esclerosis múltiple recurrente-remitente (EM-RR) está actualmente dirigida hacia la modulación de la respuesta inmune, hay crecientes evidencias de que el estrés oxidativo juega un papel importante en la patogénesis de EM-RR. Así, el ambiente inflamatorio en la lesión desmielinizante conduce irremediablemente a la generación de EROs/ERNs. Por otro lado, el primer ejemplo satisfactorio de fármaco diseñado para el tratamiento de EM-RR es el natalizumab (Tysabri®; Biogen Idec/Elian). Se trata de un anticuerpo monoclonal humano contra integrinas α 4- β 1, componente de VLA (very late antigen-4) presente en leucocitos. Teniendo presente el efecto de natalizumab sobre el sistema inmune, el presente estudio tiene como objetivo analizar el efecto de esta terapia biológica sobre biomarcadores de estrés oxidativo. Para nuestro estudio tomamos muestras sanguíneas de 8 pacientes con EM-RR que cumplieron los requisitos para entrar en el tratamiento con anticuerpo monoclonal. Las muestras se tomaron inmediatamente antes de iniciar el tratamiento con natalizumab (300 mg en infusión intravenosa cada cuatro semanas) y tras catorce meses (antes de recibir la 14ª dosis). Para alcanzar nuestros objetivos evaluamos los niveles de proteínas carboniladas (PC), el coeficiente GSH/GSSG, la actividad de las enzimas glutatión peroxidasa (GPx) y SOD. Nuestros datos ponen de manifiesto como el tratamiento con el anticuerpo induce decrementos significativos en PC ($P < 0.023$); SOD ($P < 0.03$) y GPx ($P < 0.035$), mientras que el cociente GSH/GSSG no experimentó cambios estadísticamente significativos. En base a lo expuesto podemos concluir que natalizumab muestra un posible efecto antioxidante, que probablemente este asociado a su efecto beneficioso.

PO165 - Daño oxidativo en el hígado de animales de experimentación expuestos a níquel y berilio

Carlos Santiago Romero, Fernando de Jesús, Sandra Guerrero, Elena Pérez Izquierdo, César Tejiño, Rosa Olmo
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid

El efecto que ejercen metales en tejidos como el hígado, puede ser debido a daños en el material genético, a peroxidación lipídica y a la oxidación de grupos sulfhidrílicos en las proteínas. Los metales como el níquel y el berilio pueden producir la generación de radicales de oxígeno que puede conllevar peroxidación lipídica; cuando este proceso se descontrola pueden ocasionarse cambios en la composición química y deterioro en la organización ultraestructural de las membranas celulares, por ello esta peroxidación está implicada en diversos trastornos como son la aterosclerosis, diabetes, y diversas enfermedades hepáticas. Otro de los efectos más importantes de los radicales libres se produce sobre el DNA, este daño oxidativo conduce a mutaciones y pérdidas en el control celular. Por ello en este trabajo de investigación se analiza si existe peroxidación lipídica y/o daño oxidativo en el DNA en el hígado de ratas Wistar, como consecuencia de la exposición a níquel y berilio durante 1 mes. Las dosis administradas están relacionadas con la dosis a la que los seres humanos están expuestos debido a que se produce una liberación desde las amalgamas dentales que se fabrican con ambos metales entre otros componentes. Los resultados obtenidos indican que se produce una alta peroxidación lipídica en hígado, y un daño en el DNA, lo que concuerda con un descenso de las defensas antioxidantes (SOD, catalasa) y por tanto con un aumento de la presencia de radicales de oxígeno; además, en también se ven alterados los niveles de las transaminasas, y los estudios histológicos indican que existen alteraciones estructurales.

Agradecimientos: MICINN Proyecto EUI2008-00163
Ministerio de Ciencia e Innovación, MICINN Proyecto EUI2008-00163

PO164 - Respuesta oxidativa en *C. albicans*: efecto del antifúngico miconazol

Carmen Michan Doña, Carmen Puyo de la Cuesta
Universidad de Córdoba

En los últimos años, el número y la gravedad de las infecciones fúngicas han aumentado de forma alarmante. Esto es debido a la capacidad de los hongos para generar infecciones sistémicas en personas que tienen su sistema inmunitario deprimido, aunque cada vez con mayor frecuencia se observan también en personas inmunocompetentes. El hongo *Candida albicans* es un comensal de numerosos mamíferos, y también es el causante de la mayoría de estas infecciones en humanos, debido a su gran versatilidad para adaptarse a distintos hábitats y condiciones de crecimiento. El organismo infectado es capaz de defenderse de *C. albicans* mediante la respuesta inmunitaria. Las células del sistema inmune fagocitan las células de *Candida* y las someten a un ambiente hostil generando compuestos oxidativos y nitrosativos para matar a estos agentes patógenos. Tiorredoxinas y glutatión junto con otras proteínas asociadas, forman los sistemas responsables de mantener el equilibrio tiorredoxina intracelular. Las flavohemoglobinas protegen frente al estrés nitrosativo. Estamos estudiando la respuesta de estos sistemas en *C. albicans* a: (1) oxidantes, y (2) miconazol, un antifúngico que además de inhibir la síntesis del ergosterol genera ROS que inducen la muerte celular del hongo. Se han determinado, a diversas dosis del fármaco y en presencia de peróxido de hidrógeno, en la especie silvestre y en mutantes reguladores relacionados con estrés oxidativo y/o morfogénesis: tasas de crecimiento, supervivencia, niveles de glutatión total intracelulares, niveles de ROS y niveles de enzimas relacionadas con las defensas oxidativas como la glutatión reductasa y la catalasa.

Junta de Andalucía, Universidad de Córdoba

PO166 - Actividad indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) en células tumorales tratadas con inhibidor de la tiorredoxina

Monica Cavia Saiz, Marta Herreros-Villanueva, Carlos García-Giron, Mª Jesús Corra del Corral, Pilar Muñoz Rodríguez
Universidad de Burgos

En la actualidad es sabido que, distintos factores determinan la evolución de las células cancerosas como el estado redox y la inmunomodulación. Un ambiente reductor intracelular reduce la eficacia de los tratamientos anticancerígenos inductores de apoptosis cuyo mecanismo de acción este mediado por la presencia de radicales libres. Por otra parte, en los últimos años moléculas inmunomoduladoras como la indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) se presenta como un importante regulador de la respuesta inmunitaria jugando un papel importante en el escape tumoral en estadios avanzados. En la actualidad se conocen diferentes tipos de inhibidores del sistema TrxR. Entre ellos los inhibidores de la actividad de la tiorredoxina reductasa como el DNCB y el donador de óxido nítrico (NONOate). El objetivo de este estudio fue evaluar la respuesta al tratamiento con inhibidores de la tiorredoxina de líneas celulares de cáncer colorrectal (Caco, HT-29 y SW680) sobre la molécula inmunosupresora IDO. Los resultados muestran que, a una concentración 5 μ M la mayor inhibición se obtiene en la línea tumoral HT-29 que se corresponde con un incremento en la actividad IDO y la menor actividad TrxR se obtuvo en las Caco correspondiendo con una menor incremento en la actividad IDO. Los resultados obtenidos con el inhibidor NONOate, muestran que a 100 μ M el porcentaje de inhibición de la actividad TrxR es similar en las tres líneas celulares, correspondiéndose también con un incremento en la actividad IDO.

Fundación Mutua Madrileña (Ayudas Investigación 2009) y Caja Burgos (Ayuda Investigación Clínica 2009)

P07.091**Clinical and Neuropsychological Differences between Very Mild Parkinson's Disease Dementia and Dementia with Lewy Bodies** *Mariya Petrova, Margarita Raycheva, Latchezar Traykov, Sofia, Bulgaria*

OBJECTIVE: To determine the specific differences in clinical and neuropsychological profiles between very mild Dementia with Lewy bodies (DLB) and Parkinson's disease dementia (PDD) in order to find the early clinical and neuropsychological markers for the differentiation of both diseases. **BACKGROUND:** Dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease with dementia often associated similar extrapyramidal and neuropsychological features in moderate and advanced stages of both diseases. However, the specific profile of PDD and DLB in the earliest stage of dementia is still unclear and subject of considerable controversy. **DESIGN/METHODS:** We investigated 28 PDD patients (MDS criteria) and 21 patients with DLB in very early stage of dementia (MMSE \geq 24). All patients underwent a comprehensive clinical, neuropsychological and psychiatric assessment. **RESULTS:** Compared to PDD, patients with DLB demonstrated significantly lower scores on MCST ($p<0.03$), Stroop test part 3 ($p<0.03$) and digit span backward ($p<0.02$). However, there was not a significant difference between both groups in Mini Mental Parkinson and DHS, as well as in Fries and Cued Selective Reminding Test, digit span forward, TMT, Boston naming test, Clock drawing test and copy of complex designs. In motor evaluation related to DLB, PDD patients showed significant higher score in UPDRS III ($p<0.001$) and H&Y stage ($p<0.001$), although the PDG motor subtype was the predominant motor subtype in both groups. Psychiatric evaluation did not show significant differences between PDD and DLB in the scales for the evaluation of apathy, depression and disinhibition. **CONCLUSIONS:** We found that in DLB the development of the very early dementia is related with more profound cognitive deterioration in some aspect of attention/executive functions, including working memory, concept-formation and inhibitor control compare to PDD, while in PDD the dementia development is related with more significant motor deficit. Supported by: A grant from the Medical University Sofia, Bulgaria.

Disclosure: Dr. Petrova has nothing to disclose. Dr. Raycheva has nothing to disclose. Dr. Traykov has nothing to disclose.

Movement Disorders: Huntington's Disease, Tics, and Tourette's Syndrome

P07.092**Correlation between Global Oxidative Stress (GOS) and Severity of Disease in Patients with Huntington Disease: A Possible Biomarker** *Inmaculada Tasset, Isaac Tunes, Cordoba, Spain, Ricardo Fernandez-Bolanos, Francisco Manuel Sánchez, Sevilla, Spain, Eduardo Agüero, Fernando Sánchez, Cordoba, Spain*

OBJECTIVE: To evaluate the global oxidative stress (GOS) in patients with Huntington's disease (HD). **BACKGROUND:** It is known that oxidative stress is involved in the pathogenesis of HD. Although the role plays of reactive oxygen species and oxidative damage have not clearly been established. **DESIGN/METHODS:** The study population comprised 15 healthy subjects and 19 patients; was performed in 34 subjects (19 patients with HD and 15 healthy subjects, tabulated by age and sex). At the time of the study all patients were divided into two groups: a) 12 moderate severity (HD1) patients and b) 7 mild severity (HD2) patients according to the accepted criteria that define of HD. In addition, GOS was evaluated using 7 parameters: i) two markers of oxidation damage; ii) three antioxidant enzymatic biomarkers; and iii) two antioxidant non-enzymatic markers. The value 0 or 1 was assigned to each parameter on the basis of its normality or not, respectively. Thus, the score was established by plus of all items with a maximum of 7 points and minimum of 0 points. **RESULTS:** Results confirmed an increase of GOS, showing a significant and positive correlation with severity stage of disease. **CONCLUSIONS:** Our results revealed that: i) patients with HD present a intensity oxidative stress; ii) GOS is correlated with severity of disease; and iii) GOS could be a clinical biomarker to evaluate the development of HD.

Disclosure: Dr. Tasset has nothing to disclose. Dr. Tunes has nothing to disclose. Dr. Fernandez-Bolanos has nothing to disclose. Dr. Sánchez has nothing to disclose. Dr. Agüero has nothing to disclose. Dr. Sánchez has nothing to disclose.

P07.093**Comorbidity of Tic Disorders and Autism Spectrum Disorder: A Prevalence Study** *Tamara Pringsheim, Tracy Hammer, Bonnie Mushenko Mitchell, Calgary, AB, Canada*

OBJECTIVE: To determine the prevalence of autism spectrum disorder (ASD) in children with tic disorders. **BACKGROUND:** Tic disorders and ASD are distinct, complex, behaviorally defined disorders. Data on the prevalence of ASD in children with tics is scarce. **DESIGN/METHODS:** All newly referred patients for evaluation of tic disorders over 18 months completed two validated screening tools for ASD, the Social Responsiveness

Survey (SRS), and the Social Communication Questionnaire (SCQ). Children screening positive on these instruments were formally evaluated by a psychologist using the Autism Diagnostic Interview-Revised (ADI-R) and the Autism Diagnostic Observation Schedule (ADOS). We compared the prevalence of ASD in our sample to national population data. We used linear regression to determine if tic severity could be predicted by ASD, and logistic regression to determine if children with ASD were more likely to be treated for tics. **RESULTS:** 116 children were evaluated for tic disorders (mean age 10.3 years). Mean total tic severity on the Yale Global Tic Severity Scale was 17.1/50. 21.6% required treatment for tics. 8 children had been previously diagnosed with ASD. 16 children screened positive for ASD on the SRS and SCQ; 15 were formally evaluated using the ADI-R and ADOS. 6 of the 15 children met diagnostic criteria for ASD. Asperger's disorder subtype. The estimated proportion of the study population with a comorbid ASD was 0.1207 (95%CI 0.0733, 0.1924). This is significantly higher than the estimated proportion of the general population with ASD of 0.0110 (95% CI 0.0091,0.0132) ($p<0.05$). The diagnosis of ASD did not predict tic severity or the need for treatment of tics. **CONCLUSIONS:** This study found a prevalence of comorbid tic disorder and ASD of 12.1%. Tic severity and the need for treatment are not associated with an ASD diagnosis. Children referred for assessment of tics should be screened for ASD given the high rate of comorbidity.

Disclosure: Dr. Pringsheim has received personal compensation for attention with Pfizer Inc and Shire Pharmaceuticals as a speaker. Dr. Hammer has nothing to disclose. Dr. Mushenko Mitchell has nothing to disclose.

P07.094**Elucidating the Nature and Mechanism of Tic Remission in Tourette Syndrome Using Magnetic Resonance Imaging** *David Shprecher, Whitsey Pitts, Nivedita Agarwal, Xianfeng Shi, Andrew Prescott, Jeff Anderson, Salt Lake City, UT*

OBJECTIVE: We aimed to gather preliminary data about rate and neuroimaging features of remission and persistent tics in our population. **BACKGROUND:** Tourette syndrome (TS) is a movement disorder characterized by onset of chronic motor and vocal tics in childhood. While half of individuals report "virtual remission" of symptoms by young adulthood, tics recognizable by an expert observer are generally still present. **DESIGN/METHODS:** 10 males aged 19-32, with previous social or academic impairment from TS (previously assessed in TS Association Genetics Consortium research) and 9 neurologically normal controls were enrolled. Subjects were off tic suppressing drugs for at least 6 months. Structural/volumetric MRI, MR spectroscopy (MRS), resting state functional MRI (rs-fMRI) sequences were obtained using a 3T scanner. rs-fMRI correlation was calculated for 6770 pairs of 116 regions from the AAL brain atlas. **RESULTS:** Mean change in Yale Global Tic Severity Scale (YGTSS) was -36.1% (total) and -24.6% (YGTSS motor+vocal). Only two subjects professed remission, with drops from mean 45 to 16.5 (YGTSS total) and 39 to 11.5 (YGTSS motor+vocal). The anterior cingulate cortex (ACC) was used as a MRS region of interest, and showed increased ratio of N-acetylaspartate to creatine in subjects relative to controls. rs-fMRI showed significant increased connectivity between occipital regions ($p=0.016$, 2-tailed t-test). Throughout the brain, regions that were closer together ($r=0.15$) and more correlated ($r=0.3$) showed greater increases in correlation for TS subjects. Connections between ipsilateral caudate and putamen were higher in ($p=0.038$, 2-tailed t-test). **CONCLUSIONS:** Tic remission may be common than previously described in individuals meeting or DSM-IV criteria. Persistent TS may be characterized by increased density in ACC. Previously published data showing anti-connectivity in cortex of TS adult males (Schlaggar et al) are rep and now extended to include the striatum. Supported by: Univ of Utah Radiology Department.

Disclosure: Dr. Shprecher has nothing to disclose. Dr. Pitts has nothing to disclose. Dr. Agarwal has nothing to disclose. Dr. Shi has nothing to disclose. Dr. Prescott has nothing to disclose. Dr. Anderson has nothing to disclose.

P07.095**Coexistence of Huntington's Disease and Amyotrophic Lateral Sclerosis: Clinicopath Study** *Mari Tada, Niigata, Japan, Elizabeth A. Cion, I MN, Alexander P. Osmond, Knoxville, TN, Patricia A. Ki City, IA, Wayne Martin, Marguerite Wieler, Edmondson, ada, Henry Paulson, Ann Arbor, MI*

OBJECTIVE: We report the clinical and neuropathological features of patients with both Huntington's disease (HD) and amyotrophic lateral sclerosis (ALS). **BACKGROUND:** HD is an inherited neurodegenerative disorder caused by a polyglutamine expansion of disease proteins and neurodegenerative disorder recently recognized as a TDP-43 protein. They usually differ in their clinical presentations, reflecting the degeneration of different neuronal populations in each disease. On of HD concomitant with sporadic ALS is very rare. **DESIGN/METHODS:** We described clinical features of three patients with genetically confirmed HD and sporadic ALS. We pathologically examined the brain and used a unique method to detect active aggregation formation. **RESULTS:** Patients manifested involuntary movements as an initial symptom of their HD, followed by bulbar palsy or upper limb weakness as a symptom of ALS at the ages of 62 and 59. The other patient, who was genetically diagnosed as having HD, developed only the bulbar type of ALS at the age of 56. In all of the patients, muscle weakness progressed rapidly as in the case of ALS. Pathologic examination revealed severe neuronal loss in the



Nº Certificado: 110385

La Secretaria de la
SOCIEDAD ESPAÑOLA DE NEUROLOGÍA

Dra. Eva López Valdés

CERTIFICA

que el / la

**Dr./Dra. Agüera Morales, Eduardo; Tasset Cuevas, Inmaculada; Sánchez López,
Fernando; Sánchez Bolaños, Ricardo ; Sánchez Caballero, Francisco Manuel;
Túnez Fiñana, Isaac**

Ha presentado durante la

LXIII REUNIÓN ANUAL SOCIEDAD ESPAÑOLA NEUROLOGÍA

Barcelona, del 15 al 19 de Noviembre de 2011

El siguiente póster

**Título: ESTRÉS OXIDATIVO GENERALIZADO EN PACIENTES CON
ENFERMEDAD DE HUNTINGTON: POSIBLE USO CLÍNICO COMO
BIOMARCADOR**

Lo que firmo a petición de los interesados y a los efectos oportunos, en Barcelona a
21 de Noviembre de 2011.

Eva López Valdés
Secretaria de la Junta Directiva de la
Sociedad Española de Neurología

Important Role of Oxidative Stress Biomarkers in Huntington's Disease

Isaac Túnez,^{*,†} Fernando Sánchez-López,[†] Eduardo Agüera,[†] Ricardo Fernández-Bolaños,[§] Francisco Manuel Sánchez,[§] and Inmaculada Tasset-Cuevas[†]

[†]Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC)/Universidad de Córdoba, Córdoba, Spain

[§]Servicio de Neurología, IMIBIC/Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba, Córdoba, Spain

[§]Servicio de Neurología, Hospital Universitario Nuestra Señora de Valme, Sevilla, Spain

ABSTRACT: This study examined global oxidative stress (GOS) and antioxidant system and their correlation with disease stage in 19 patients with HD. The results revealed an increase in oxidative stress biomarkers and a reduction in antioxidant systems in HD patients. The effects were more intense in HD1 than in HD2 patients. Additionally, carbonylated proteins and GOS were correlated with disease stage. These findings suggest that oxidative stress plays an important role in the pathogenesis of HD.

INTRODUCTION

Huntington's disease (HD) is an autosomal dominant genetic disease characterized by mutant huntingtin protein deposits.^{1,2} Different studies have postulated that oxidative stress is involved in the pathogenesis of HD.^{3–6} These studies have reported an intense oxidative stress in HD patients compared to healthy subjects.^{4–7} Oxidative stress is characterized by an imbalance between reactive oxygen species (ROS) and antioxidant systems. Interestingly, Chen et al.⁸ detected a correlation between lipid peroxidation products in plasma and degree of severity in patients with HD and proposed this biomarker as a potential marker for evaluating treatment efficacy. However, existing data are not conclusive.

In view of the foregoing, the main aim of this study was to show the existence of global oxidative stress and antioxidant system deficiency in peripheral samples of patients with HD. All these data were stratified by degree of severity to clarify the role of oxidative stress in Huntington's disease and to evaluate their possible use as biomarkers.

RESULTS

The demographic features of the study groups are presented in Table 1. Table 2 presents the oxidative stress biomarkers obtained in 90% of healthy subjects and the interpretation of oxidative stress markers based on normal cutoff points for our study population of healthy subjects. The correlation between age and oxidative stress biomarkers was also analyzed, but no significant differences were observed (data not shown). In view of these findings, the influence of age on levels of oxidative damage in this clinical study may be excluded.

Changes in Oxidative Stress Biomarkers in HD Patients versus Controls. The results showed that HD patients presented intense oxidative stress characterized by the following:

- (1) Oxidative damage. (i) In plasma, HD patients displayed important increases in carbonylated proteins ($P < 0.001$) (Table 3A) and DNA oxidation ($P < 0.01$) (Table 3A).

(ii) In erythrocytes, changes were characterized by significant increases in protein and lipid peroxidation ($P < 0.001$ and $P < 0.01$, respectively) (Table 3B).

- (2) GSH redox balance. (i) In plasma, HD patients exhibited decreases in reduced glutathione (GSH) content ($P < 0.001$) (Table 3A), increases in oxidized glutathione (GSSG) content ($P < 0.05$) (Table 3A), and decreases in GSH/GSSG ratio ($P < 0.05$) (Table 3A). (ii) In erythrocytes, significant decreases were observed in GSH content ($P < 0.001$) (Table 3B). No significant changes were observed in GSSG and GSH/GSSG ratio (Table 3B).
- (3) Antioxidant systems. (i) In plasma, levels of total antioxidant capacity and antioxidant gap were significantly lower in HD patients compared to those in the control group ($P < 0.01$ and $P < 0.05$, respectively) (Table 3A). Moreover, the global oxidative stress marker revealed mild oxidative stress (Figure 2). (ii) In erythrocytes, enzymes showed significant changes characterized by decreases in superoxide dismutase (SOD) ($P < 0.05$) (Table 3B) and increases in glutathione peroxidase (GPx) ($P < 0.001$) (Table 3B).

Changes in Oxidative Stress Biomarkers in Moderate Severity (HD1) or Mild Severity (HD2) versus Controls. Different changes were observed when HD patients were divided according to degree of severity into HD1 (UHDRS > 70) and HD2 (UHDRS < 70) and compared with the control group. Thus, when patients in the HD2 group were compared with controls, significant increases were observed in levels of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG) in plasma ($P < 0.05$) and carbonylated proteins in erythrocytes ($P < 0.05$) (Table 3). In contrast, total antioxidant capacity ($P < 0.05$) (Table 3A) and GSH content decreased in plasma and erythrocytes, respectively ($P < 0.05$) (Table 3B).

Patients in the HD1 group presented significant increases in 8-OHdG levels in plasma ($P < 0.01$) compared to controls

Received: February 10, 2011

Published: June 16, 2011

Table 1. Subject Characteristic and Clinical Ratings of the Huntington's Disease Patients and the Controls^a

parameter	controls (n = 19)	HD (n = 19)	HD1 (n = 12)	HD2 (n = 7)
gender (male/female)	8/11	9/10	5/7	4/3
age (years)	26–58	24–64	30–64	24–63
height (cm)	162.9 ± 7.4	168.9 ± 8.9	173.1 ± 6.4	157.3 ± 3.5
weight (kg)	78.5 ± 9.19	70.9 ± 8.6	74.5 ± 8.6	64.6 ± 4.1
age at symptom onset (years)		35.1 ± 12.2	31.4 ± 11.5	40.1 ± 11.2
disease duration (years)		11.1 ± 8.1	5.0 ± 3.2	11.9 ± 8.9
expanded CAG repeat no		46.5 ± 4.8	44.6 ± 2.3	48.4 ± 3.9
glucose (mg/dL)	98.9 ± 17.5	91.1 ± 21.4	98.1 ± 25.5	80.5 ± 7.0
cholesterol (mg/dL)	208.5 ± 32.0	191 ± 45.7	192.8 ± 52.2	188.7 ± 41.5
triglycerides (mg/dL)	109.7 ± 32.0	78.0 ± 27.5	74.1 ± 25.8	83.7 ± 32.9
HDL (mg/dL)	57.8 ± 14.5	48.7 ± 12.6	48.0 ± 15.7	49.7 ± 7.8
LDL (mg/dL)	146.8 ± 30.0	126.4 ± 39.8	129.6 ± 41.8	121.5 ± 42.3

^a Values are expressed as the mean ± SD (range, minimum–maximum).

Table 2

(A) Oxidative Stress Biomarkers in Control Subjects Obtained in 90% of Our Population of Healthy Subjects and Interpretation of Oxidative Stress Markers Based on Normal Cutoff Points According to Our Studied Population of Healthy Subjects ^a					
oxidative status	SOD/GPx	total antioxidant capacity (nM)	antioxidant gap (μmol/L)	carbonylated protein (nM)	8-OHdG (ng/mL)
without oxidative stress	≤24.1	≥0.87	≥1012.84	≤0.549	≤68.10
oxidative stress with AEDN	≥24.1	≥0.87	≥1012.84	≥0.549	≥68.10
oxidative stress with AEXD	≤24.1	≤0.87	≤1012.84	≥0.549	≥68.10
oxidative stress with ASGD	≥24.1	≤0.87	≤1012.84	≥0.549	≥68.10

(B) Interpretation of Oxidative Stress Markers in our HD Patients: ^b HD1 (n = 12), HD2 (n = 7) (24)					
group	SOD/GPx	total antioxidant capacity (nM)	antioxidant gap (μmol/L)	carbonylated protein (nM)	8-OHdG (ng/mL)
HD (HD1 + HD2)	≤24.1	≤0.87	≤1012.84	≥0.549	≥68.10
HD2	≤24.1	≤0.87	≤1012.84	≤0.549	≤68.10
HD1	≤24.1	≤0.87	≤1012.84	≥0.549	≥68.10

^a SOD/GPx was analyzed in erythrocytes and the rest of parameters in plasma. AEDN, antioxidant enzymatic deficiency; AEXD, antioxidant extracellular deficiency; ASGD, antioxidant system global deficiency. ^b These data supported the hypothesis of a reduction of AEXD in total HD patients and HD1 patients, whereas the HD2 group shows an important drop in PAO and GAP without increases in PC and 8-OHdG markers, indicating the presence of imbalance in oxidant/antioxidant equilibrium.

(Table 3A). Significant decreases were also observed in total antioxidant capacity ($P < 0.05$) (Table 3A). Protein carbonyls and lipid peroxides in erythrocytes presented significant increases ($P < 0.001$ and $P < 0.05$, respectively), whereas GSH levels and the GSH/GSSG ratio displayed significant decreases ($P < 0.05$ and $P < 0.05$, respectively) (Table 3B).

Changes in Oxidative Stress Biomarkers in HD1 versus HD2. When HD2 and HD1 patients are compared, the differences described above were also observed for an increase in oxidative stress characterized by increases in protein carbonyl content ($P < 0.01$) (Table 3). Along the same lines, positive and statistically significant correlations were only observed between carbonylated proteins and the study groups (control, HD2 and HD1; $r = 0.487$ in plasma and $r = 0.619$ in erythrocytes, $P < 0.01$; Figure 1). Global oxidative stress also increased with disease intensity (controls, 0.33; HD2, 1.75; HD1, 3.03), revealing a significant and positive correlation ($r = 0.851$; $P < 0.01$; Figure 2).

DISCUSSION

This study describes the existence of peripheral oxidative stress in HD patients. The findings also showed that molecular

oxidative damage was greater in HD1 patients, coinciding with more severe pathology. These results coincide with those published in scientific literature describing the presence of oxidative stress in HD patients^{3,9} and in subjects with other neurodegenerative processes such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, or multiple sclerosis.^{5,8,10} In our study, oxidative stress in HD patients was characterized by lipid, protein, and DNA damage; protein carbonylation was more intense in HD1 than in HD2 patients, while no significant differences were observed for the other two markers in HD1 or HD2 patients. These results coincide in part with the findings of other research groups reporting greater oxidative stress in the central nervous system and in plasma in HD patients compared to healthy subjects, as well as between one another depending on process severity.^{5,8,10} In line with Klepac et al.,⁴ Duran et al.¹⁰ detected higher lipid oxidation levels in symptomatic HD patients than in asymptomatic HD patients, accompanied by increases in levels of lactate (used as a mitochondrial dysfunction marker).

The increases in the oxidation biomarkers analyzed were accompanied by alterations in antioxidant systems. Although the results obtained in this study for glutathione balance coincided

Table 3

(A) Levels of Oxidative Stress Biomarkers in Plasma of Patients with Huntington's Disease and Control Subjects (Control) ^a				
biomarker	plasma			
	control (n = 19)	HD (n = 19)	HD1 (n = 12)	HD2 (n = 7)
carbonylated proteins (nM)	0.36 ± 0.14	0.571 ± 0.24 ^b	0.6 ± 0.25	0.49 ± 0.22 ^c
8-OHdG (ng/mL)	45.51 ± 11.93	69.53 ± 32.23 ^c	71.5 ± 24.0	65.70 ± 26.97
PAO (mM)	1.07 ± 0.20	0.83 ± 0.08 ^c	0.83 ± 0.085	0.82 ± 0.08
GAP (mM)	1283.7 ± 374.5	1017.5 ± 200.97 ^d	996.2 ± 216.1	1051.4 ± 192.4
GSH (μM)	30.19 ± 4.84	24.63 ± 7.44 ^d	24.03 ± 8.47	24.68 ± 5.27
GSSG (μM)	9.95 ± 5.9	13.06 ± 8.11 ^d	13.73 ± 9.32	11.59 ± 5.06
GT	42.15 ± 6.52	37.25 ± 7.40	37.71 ± 9.42	36.24 ± 3.18
ratio	2.98 ± 1.75	1.73 ± 0.97 ^d	1.55 ± 1.04	2.10 ± 0.83

(B) Levels of Oxidative Stress Biomarkers in Erythrocytes of Patients with Huntington's Disease and Control Subjects (Control) ^a				
biomarker	erythrocytes			
	control	HD	HD1	HD2
carbonylated protein (nM/g Hb)	0.46 ± 0.04	0.66 ± 0.19 ^b	0.71 ± 0.45	0.57 ± 0.15 ^c
LPO (μM/g Hb)	11.68 ± 3.73	15.75 ± 5.83 ^c	16.17 ± 5.8	14.82 ± 3.10
GSH (μM/g Hb)	141.5 ± 30.6	122.8 ± 14.87 ^b	126.2 ± 12.26	114.72 ± 18.8
GSSG (μM/g Hb)	42.47 ± 29.3	44.95 ± 15.29	46.19 ± 16.27	40.58 ± 15.74
GT	184.1 ± 28.3	167.82 ± 18.2	172.45 ± 17.3	155.36 ± 16.2
ratio	3.09 ± 1.62	2.73 ± 1.04	2.73 ± 1.04	2.82 ± 1.25
SOD ((U/mL)/g Hb)	2.24 ± 0.18	1.64 ± 0.21 ^d	1.29 ± 0.74	1.86 ± 0.78
GPx ((U/mL)/g Hb)	0.20 ± 0.1	0.60 ± 0.14 ^b	0.6 ± 0.01	0.5 ± 0.017

^a Expresses as the mean ± SD. ^b P < 0.001 vs control. ^c P < 0.01 vs control. ^d P < 0.05 vs control. ^e P < 0.01 vs HD1. ^f P < 0.05 vs HD1.

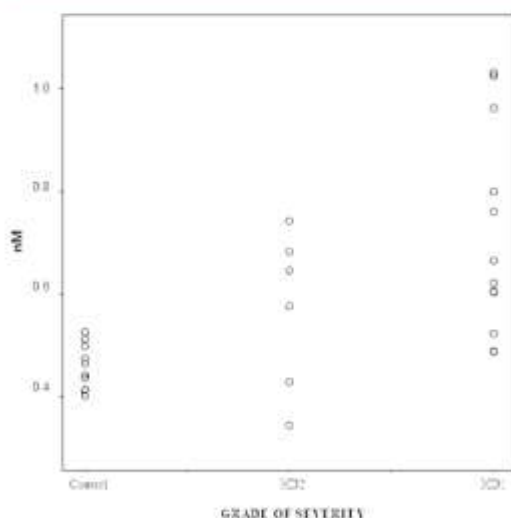


Figure 1. Correlation between levels of carbonylated proteins in erythrocytes and disease stage in patients with HD (HD1 and HD2) and healthy subject (controls). HD1 score is UHDRS > 70. HD2 score is UHDRS < 70. $r = 0.619$; $P < 0.01$.

with those reported elsewhere,⁴ contradictory and controversial results were obtained for antioxidant enzyme activity; some authors

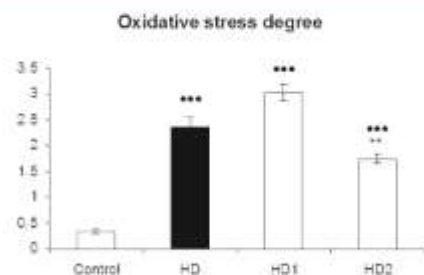


Figure 2. Oxidative stress degree in patients with different stage of disease, showing significant and positive correlation ($r = 0.851$; $P < 0.01$). Bar indicates \pm SD. HD1 score is UHDRS > 70. HD2 score is UHDRS < 70. ●●●, $P < 0.001$ vs control. ***, $P < 0.05$ vs HD1.

have reported decreases in SOD and GPx antioxidant enzyme activity,^{8,10–13} while others have observed increases.^{5,14–16} This may be at least partly due to (i) the different degrees of severity displayed by the patients studied, (ii) oxidative damage intensity, (iii) the medium analyzed and methodology used, (iv) the quantification protocols used, and/or (v) the sample handling techniques employed.^{4,5}

Changes in oxidative stress biomarkers are normally analyzed and evaluated on an isolated and static basis, and the existence of oxidative stress is interpreted as an increase in oxidative damage indicators and/or a decrease in antioxidant systems. This study therefore aimed to examine and dynamically analyze general oxidative balance, evaluating overall oxidative status.^{17,18} The

ratio between SOD/GPx¹⁹ enzymes in HD patients decreased in line with normal levels. Such decreases were observed in HD1 and HD2 patients; no statistically significant changes were observed between both groups. These results would initially suggest that antioxidant enzyme system capacity remained intact in the patients studied, probably indicating that these systems were functioning properly despite the presence of oxidative stress.

The study of changes in antioxidant gap revealed a decrease in this marker in HD patients with respect to the controls. This supported the hypothesis that residual plasmatic antioxidant capacity had decreased significantly. These findings reveal two possible scenarios: (i) a deficiency in molecules such as ascorbic acid, α -tocopherol, and other minority elements and (ii) the importance of these molecules with antioxidant capacity in oxidative stress development and intensity in HD patients. These results coincide with those reported by Beristain-Pérez et al.¹⁸ in processes such as diabetes mellitus, high blood pressure, and osteoarthritis, characterized by decreases in antioxidant gap and their important role in triggered oxidative symptoms and in the evolution of the clinical process, indirectly confirming the results described here and the aforementioned hypothesis.

On the basis of these results, global oxidative stress was evaluated in the patients studied using the construct established by Beristain-Pérez et al.¹⁸ This construct showed that HD patients presented higher scores than the controls, suggesting the presence of global oxidative stress in these patients. Global oxidative stress levels were also higher in HD1 than in HD2 patients, associated with the intensity of clinical symptoms.⁴

HD patients displayed alterations in antioxidant gap, total antioxidant capacity, carbonylated proteins, and oxidized DNA, suggesting increased production of intracellular ROS, causing ROS to increase and accumulate. These radicals would have an oxidative effect at the intra- and extracellular levels. At the intracellular level, they would trigger DNA, intracellular protein, and membrane lipid oxidation. Their diffusion into the extracellular medium would induce extracellular protein and lipid oxidation, generally resulting in increased levels of lipid peroxidation products, 8-OHdG and carbonylated proteins, accompanied by a relevant and significant decrease in the antioxidant gap, i.e., in minority plasmatic antioxidants (vitamin C, α -tocopherol, etc.). All these phenomena coincide with the correct functioning of the primary axis of antioxidant enzyme systems (evaluated as SOD/GPx) and the maintenance of total antioxidant capacity. All these results would support the hypothetical decrease in exogenous antioxidant capacity. It may also be postulated that this phenomenon is progressive because the HD2 patients displayed significant reductions in total antioxidant capacity and antioxidant gap, whereas carbonylated proteins and 8-OHdG levels did not exceed normal cutoff points. Nevertheless, HD1 patients displayed increases in carbonylated proteins and 8-OHdG, accompanied by decreases in total antioxidant capacity and antioxidant gap.

Finally, a close correlation was observed between carbonylated proteins and disease severity and between disease severity and global oxidative stress. These correlations, together with the statistically significant changes in the other oxidative stress variables analyzed (GSH, malondialdehyde (MDA), etc.), would indicate that carbonylated proteins and global oxidative stress are the two variables most sensitive to oxidative changes associated with the evolution of HD. These findings could support their clinical use as markers to monitor the evolution of the disease.

CONCLUSIONS

It may be concluded that (i) HD patients presented a global oxidation status, (ii) global oxidative stress was more intense in HD1 than in HD2 patients, (iii) HD patients exhibited decreases in nonenzymatic extracellular antioxidant systems, and (iv) carbonylated proteins and global oxidative stress may be two useful biochemical oxidative stress markers for monitoring the evolution of HD patients. Nevertheless, further research is necessary in this area to clarify and resolve all doubts regarding the relevance and diagnostic—clinical use of individual and combined (constructs of antioxidant gap and global oxidative stress) oxidative stress biomarkers in HD.

MATERIALS AND METHODS

Patients. The study was conducted with 19 patients from the Departments of Neurology at Reina Sofia University Hospital in Cordoba (13) and Valme Hospital in Seville (6). Their diagnoses were confirmed genetically by the Department of Genetics at both hospitals. The patients were divided into two groups based on disease severity rated according to the Unified Huntington's Disease Rating Scale (UHDRS):²⁰ (i) HD1 (UHDRS > 70); (ii) HD2 (UHDRS < 70). Nineteen healthy subjects (controls at age 42.23 \pm 9.24; 8 men/11 women) were recruited, matched according to age and sex. Inclusion and exclusion criteria were fulfilled by 19 patients (age 43.50 \pm 10.62; 9 men/10 women). Inclusion criteria were the following: informed consent; CAG trinucleotide expansion (35–49 repeats); age, 24–64 years; >25 score in mini mental state examination (MMSE);²¹ age at symptom onset, 31.42 \pm 11.51 years; disease duration, 11.18 \pm 8.10 years; total cholesterol concentration, 191.0 \pm 45.7 mg/dL; triglyceride concentration, 78.0 \pm 27.5 mg/dL; HDL concentration, 48.7 \pm 12.6 mg/dL; LDL concentration, 126.4 \pm 39.8 mg/dL. Exclusion criteria were the following: chronic inflammatory disease, infectious illness 3 days before beginning the study, diabetes mellitus, chronic heart disease, anemia, vitamin or antioxidant supplement intake, smoking, drinking (alcohol and exciting).

Extraction was performed between 09:00 and 10:00 a.m. Blood samples were obtained from the antecubital vein and collected in tubes containing 1 mg/mL EDTA-K₂ as anticoagulant, after 12 h of fasting. Immediately after, plasma was separated from red cells by centrifugation at 2500 rpm at 4 °C for 15 min and the fraction was frozen in aliquots and stored at -85 °C for later study.

Biochemical Parameters. The amount of carbonylated proteins in plasma and erythrocytes was evaluated using the method described by Levine et al.²² Lipid peroxidation products (MDA + 4-HDA) were estimated in erythrocytes using the method described by Eldemeyer et al.²³ Oxidative DNA adduct 8OHdG (8-OHdG Check-437-01222) and total antioxidant capacity (PAO, KPA-050) were assayed in plasma using kits purchased from JaiCA (Japanese Institute for the Control of Aging, Fukuroi City, Shizuoka, Japan). Total glutathione (GSSG + GSH) and GSH levels in plasma and erythrocytes were evaluated using the Bioxytech GSH-420 and GSH-400 kits, respectively (Oxis International, Portland, OR, U.S.). GSSG levels were calculated by subtracting GSH from total glutathione, and the GSH/GSSG ratio was determined. Antioxidant enzyme activity was measured in red blood cells: GPx activity was evaluated by the Flohé and Gunzler method (1984), and SOD activity was evaluated using a colorimetric assay kit purchased from BioVision (Mountain View, CA, U.S.). The SOD/GPx ratio was calculated as the correct functioning of the main axis of enzymatic antioxidant systems. This ratio indicates antioxidant enzyme system efficiency, and its evaluation is more important than absolute enzymatic activity.

The antioxidant gap was calculated using the following equation: gap = total antioxidant capacity - ([albumin \times TEAC] + [uric acid \times TEAC]). This indicator consists of evaluating the antioxidant activity

in plasma of ascorbic acid, α -tocopherol, bilirubin, transferrin, and other minority antioxidant compounds, excluding albumin, uric acid, and Trolox equivalent. Sánchez-Rodríguez et al.¹⁸ designed an integral method for analyzing oxidative damage that includes different oxidative stress and antioxidant system parameters: SOD/GPx ratio, total antioxidant capacity, antioxidant gap, and two oxidative damage biomarkers (lipid peroxidation products and 8-OHdG). The same design was used in this study, although lipid peroxidation products were substituted with carbonylated proteins because these are more sensitive oxidative stress markers. These data may produce four possible scenarios: (i) no oxidative stress, (ii) antioxidant enzyme deficiency (AEDN), (iii) antioxidant extracellular deficiency (AEXD), and (iv) antioxidant system global deficiency (ASGD) (Table 2).

The modified construct described by Beristain-Pérez et al.¹⁸ was used to calculate global oxidative stress. This construct incorporated seven parameters: (i) two oxidation damage markers (lipid and DNA oxidation in plasma) (protein oxidation in plasma was used instead of lipid); (ii) three enzymatic antioxidant biomarkers in erythrocytes (SOD, GPx, and SOD/GPx ratio); (iii) two nonenzymatic antioxidant markers in plasma (total antioxidant capacity and antioxidant gap). A value 0 or 1 was assigned to each parameter depending on whether it was normal or not normal, respectively. Normality was defined as the value including 90% of controls for each variable. Thus, the score was established by adding all items, with a maximum of 7 points and a minimum of 0 points: no oxidative stress, ≤ 1 point; mild oxidative stress, ≤ 3 points; moderate oxidative stress, ≤ 4 points; severe oxidative stress, ≤ 6 points.

Statistical Analysis. Statistical evaluation was carried out using the SPSS17.0 statistical software package (SPSS Iberica, Madrid, Spain) for Windows. The Shapiro–Wilk test did not show significant departures from normality in the distribution of variance values. Statistical significance was measured using the one-way analysis of variance (one-way ANOVA), corrected with the Bonferroni test. Pearson's correlation analysis was used to evaluate the correlation between variables. $P < 0.05$ was considered significant. Data are presented as the mean \pm SD. Normal values were determined with the base of 90% of healthy subjects.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Phone: +34 957218268. Fax: +34957 218229. Email: fm2tufiq@uco.es.

ABBREVIATIONS USED

AEDN, antioxidant enzymatic deficiency; AEXD, antioxidant extracellular deficiency; ASGD, antioxidant system global deficiency; GSH, reduced glutathione; GSSG, oxidized glutathione; GPx, glutathione peroxidase; HD, Huntington's disease; HD1, Huntington's disease with moderate severity; HD2, Huntington's disease with mild severity; MDA, malondialdehyde; MMSE, mini mental state examination; 8-OHdG, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine; ROS, reactive oxygen species; SOD, superoxide dismutase; TEAC, Trolox equivalent antioxidant capacity; UHDRS, Unified Huntington's Disease Rating Scale

REFERENCES

- Gonzalez-Alegre, P.; Afifi, A. K. Clinical characteristics of childhood-onset (juvenile) Huntington disease: report of 12 patients and review of the literature. *J. Child Neurol.* 2006, 21, 223–229.
- Walker, F. Huntington's disease. *Lancet* 2007, 369, 218–228.
- Tasset, I.; Sánchez, F.; Tünez, I. The molecular bases of Huntington's disease: the role played by oxidative stress. *Rev. Neurol.* 2009, 49, 424–429.

- Klepac, N.; Relja, M.; Klepac, R.; Hecimovic, S.; Babic, T.; Trkulja, V. Oxidative stress parameters in plasma of Huntington's disease patients, asymptomatic Huntington's disease gene carriers and healthy subjects. *J. Neurol.* 2007, 254, 1676–1683.
- Sorolla, M. A.; Reverte-Branchat, G.; Tamarit, J.; Ferrer, I.; Ros, J.; Cabisco, E. Proteomic and oxidative stress analysis in human brain samples of Huntington disease. *Free Radical Biol. Med.* 2008, 45, 667–678.
- Stoy, N.; Mackay, G. M.; Forrest, C. M.; Christofides, J.; Egerton, M.; Stone, T. W.; Darlington, L. G. Tryptophan metabolism and oxidative stress in patients with Huntington's disease. *J. Neurochem.* 2005, 93, 611–623.
- Boll, M. C.; Alcaraz-Zubeldia, M.; Montes, S.; Rios, C. Free copper, ferroxidase and SOD1 activities, lipid peroxidation and NOx content in the CSF. A different marker profile in four neurodegenerative diseases. *Neurochem. Res.* 2008, 33, 1717–1723.
- Chen, C. M.; Wu, Y. R.; Cheng, M. L.; Liu, J. L.; Lee, Y. M.; Lee, P. W.; Soong, B. W.; Chiu, D. T. Increased oxidative damage and mitochondrial abnormalities in the peripheral blood of Huntington's disease patients. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007, 359, 335–340.
- Kumar, P.; Kalonia, H.; Kumar, A. Huntington's disease: pathogenesis to animal models. *Pharmacol. Rep.* 2010, 62, 1–14.
- Duran, R.; Barrero, F. J.; Morales, B.; Luna, J. D.; Ramirez, M.; Vives, F. Oxidative stress and plasma aminopeptidase activity in Huntington's disease. *J. Neural Transm.* 2010, 117, 325–332.
- Abraham, S.; Sundararajan, C. C.; Vivekanandhan, S.; Behari, M. Erythrocyte antioxidant enzymes in Parkinson's disease. *Indian J. Med. Res.* 2005, 121, 111–115.
- Vural, H.; Demirin, H.; Kara, Y.; Eren, I.; Delibas, N. Alterations of plasma magnesium, copper, zinc, iron and selenium concentrations and some related erythrocyte antioxidant enzyme activities in patients with Alzheimer's disease. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2010, 24, 169–173.
- Bolán, A. D.; Bianchi, M. S.; Bianchi, N. O. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in human blood: influence of sex, age and cigarette smoking. *Clin. Biochem.* 1997, 30, 449–454.
- Schuessel, K.; Leutner, S.; Cairns, N. J.; Müller, W. E.; Eckert, A. Impact of gender on upregulation of antioxidant defence mechanisms in Alzheimer's disease brain. *J. Neural Transm.* 2004, 111, 1167–1182.
- Ilic, T.; Jovanovic, M.; Jovicic, A.; Tomovic, M. Oxidative stress and Parkinson's disease. *Vojnosanit. Pregl.* 1998, 55, 463–468.
- Kharrazi, H.; Valisi-Raygani, A.; Rahimi, Z.; Tavilani, H.; Aminian, M.; Pourmotabbed, T. Association between enzymatic and non-enzymatic antioxidant defence mechanism with apolipoprotein E genotypes in Alzheimer disease. *Clin. Biochem.* 2008, 41, 932–936.
- Sánchez-Rodríguez, M.; Santiago-Osorio, E.; Vargas, L. A.; Mendoza-Núñez, V. M. Propuesta de un constructo para evaluar integralmente el estrés oxidativo. *Bioquímica* 2004, 29, 81–90.
- Beristain-Pérez, A. S.; Sánchez-Rodríguez, M. A.; Ruiz-Ramos, M.; Mendoza-Núñez, V. M. Oxidative stress as a risk factor for the development of diabetes mellitus, osteoarthritis and hypertension in elderly. *Bioquímica* 2006, 31, 13–22 (Spanish article).
- Gaeta, L. M.; Tozzi, G.; Pastore, A.; Federici, G.; Bertini, E.; Piemonte, F. Determination of superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in blood of healthy pediatric subjects. *Clin. Chem. Acta* 2002, 322, 117–120.
- Huntington Study Group. Unified Huntington's disease rating scale: reliability and consistency. *Mov. Disord.* 1996, 11, 136–142.
- Folstein, M. S.; Folstein, S. E.; McHugh, P. R. "Mini-mental state": A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J. Psychiatr. Res.* 1975, 12, 189–198.
- Levine, R. L.; Garland, D.; Oliver, C. N.; Amici, A.; Climent, I.; Lenz, A. G.; Ahn, B. W.; Shaltiel, S.; Stadtman, E. R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 1990, 186, 464–478.
- Eldermeier, I.; Gerard-Monnier, D.; Hayn, J. C.; Chaudierem, J. Reactions of N-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Mechanistic aspects of the colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chem. Res. Toxicol.* 1998, 11, 1184–1194.



Short communication

NGF and nitrosative stress in patients with Huntington's disease

Inmaculada Tasset ^{a,1}, Fernando Sánchez-López ^{b,1}, Eduardo Agüera ^b, Ricardo Fernández-Bolaños ^c, Francisco Manuel Sánchez ^c, Antonio Cruz-Guerrero ^d, Felix Gascón-Luna ^d, Isaac Túnez ^{a,*}

^a Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMBIC)/Universidad de Córdoba, Córdoba, Spain

^b Servicio de Neurología, Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMBIC)/Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba, Córdoba, Spain

^c Servicio de Neurología, Hospital Universitario Nuestra Señora de Valme, Sevilla, Spain

^d Servicio de Análisis Clínicos, IGC Laboratorio Clínico ASNC-IEA, Hospital General "Valle de los Pedroches", IMBIC, Córdoba, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 September 2011

Received in revised form 20 December 2011

Accepted 23 December 2011

Available online 16 January 2012

Keywords:

Huntington's disease

NGF

BDNF

GDNF

Neurodegeneration

Basal ganglia

ABSTRACT

Introduction: Huntington's disease (HD) is a neurodegenerative genetic disorder caused by expansion of poly-glutamine repeats in the huntingtin gene and characterised by the loss of striatal and cortical neurons. Few studies to date have focussed on peripheral neurotrophic-factor levels in patients with HD.

Objective: To measure plasma NGF levels in Huntington's disease and investigate their correlation with disease intensity.

Materials and methods: Nineteen patients with HD and nineteen age- and sex-matched healthy subjects took part in this cross-sectional study. Plasma levels of NGF, BDNF, GDNF, nitrotyrosine, and myeloperoxidase (MPO) were measured; lactate dehydrogenase (LDH) levels were determined and white blood cell (WBC) counts were evaluated.

Results: NGF levels were significantly lower, nitrotyrosine levels were higher and LDH activity was greater in HD patients than in healthy subjects. There was no significant difference in MPO levels or WBC counts, whereas the MPO/WBC ratio was considerably higher in HD patients. The data obtained suggested that biochemical and haematological changes correlated with disease severity.

Conclusion: NGF levels are lower in HD patients than in healthy subjects. However, further research is required to confirm the role of NGF in HD.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Neuronal degeneration and cell death, in both humans and other mammals, take place during development of the nervous system, during ageing and in the course of neuropathological disorders. Changes in the synthesis and release of neurotrophic factors have been observed in all these events. Neurotrophic factors are endogenous soluble peptides involved in the long-term regulation of neuronal survival and differentiation, as well as in the stimulation and control of neuronal plasticity and neurogenesis [1].

Relatively little research has addressed peripheral neurotrophic-factor levels in patients with HD, the most widely-studied neurotrophin being brain-derived neurotrophic factor (BDNF). A number of studies have highlighted a reduction in BDNF levels in brain tissue and plasma both in animal models and in samples from humans with HD [2,3]. Research has also shown that peripheral neurotrophic-factor levels are a reliable indicator of levels in the brain [4–6].

However, as yet there appear to be no published data on peripheral nerve growth factor (NGF) levels in HD patients. The present study sought to test the hypothesis that plasma NGF levels are altered in symptomatic HD patients, and that the extent of alteration reflects disease intensity.

2. Methods

2.1. Patients

Nineteen patients from the Neurology Departments at the Reina Sofía University Hospital in Córdoba (13) and the Valme Hospital in Seville (6) took part in this study. The diagnosis of HD was confirmed genetically by the Genetics Departments at the two hospitals. Patients were divided into two groups on the basis of disease severity, using the Unified Huntington's Disease Rating Scale (UHDRS) [7]: i) Group HD1 (UHDRS score >70); and ii) Group HD2 (UHDRS score <70). 19 Nineteen healthy age- and sex-matched subjects were recruited as controls. Inclusion criteria: informed consent, CAG trinucleotide expansion >35 repeats, age 18–70, score >25 in mini mental state examination (MMSE) [8]. Exclusion criteria: chronic inflammatory disease, infectious illness three days before beginning the study.

* Corresponding author at: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Córdoba, Av. Menéndez Pidal s/n, 14004 Córdoba, Spain. Tel.: +34 957218268; fax: +34 957 218229.

E-mail address: fm2tulli@uco.es (I. Túnez).

¹ Both authors have contributed at the same firm.

diabetes mellitus, chronic heart disease, anaemia and vitamin or antioxidant supplement intake.

2.2. Blood samples

Blood samples were collected from all patients between 8 and 11 a.m. in tubes containing 1 mg/ml EDTA-K3 as anticoagulant, after 12 h fasting. Immediately afterwards, plasma was separated from red cells by centrifuging at 2500 rpm, 4 °C, 15 min.

2.3. Biochemical parameters

Plasma NGF, BDNF and GDNF levels were measured using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (NGF, BDNF and GDNF Emax Immunoassay System, Promega, Madison, WI). Lactate dehydrogenase levels were determined using a kit purchased from Linear Chemicals S. L. (Montgat, Barcelona, Spain). Plasma myeloperoxidase (MPO) and nitrotyrosine levels were assayed using reagents purchased from Oxis International (Portland, OR, USA), and the number of white blood cells was quantified.

2.4. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the SPSS17.0® statistical software package (SPSS Iberica, Madrid, Spain) for Windows. The Shapiro-Wilk test showed no significant departure from normality in the distribution of variance values, indicating normal data distribution. Statistical significance was measured by one-way analysis of variance (one-way ANOVA), corrected with the Bonferroni test to compare the results among 3 groups (HD1, HD2 and controls). Pearson's correlation analysis was used to evaluate correlations between variables. Data are expressed as means \pm SD.

3. Results

Patient clinical and demographic characteristics are shown in Table 1. Patients with HD displayed a significant decrease in BDNF, GDNF (Table 2) and NGF levels (50.40 ± 31.47 HD vs. 117.39 ± 62.34 control; $P < 0.001$; Fig. 1). They also exhibited a significant increase in plasma LDH activity (Table 2). No significant differences were found for MPO levels (2.93 ± 2.03 HD vs. 2.99 ± 2.33 control) or WBC counts (7.10 ± 2.45 HD vs. 7.55 ± 1.13 control).

Moreover, MPO/WBC ratios were higher in HD patients (0.43 ± 0.27 HD vs. 0.23 ± 0.11 control; $P < 0.05$), as were nitrotyrosine levels (2.19 ± 0.71 HD vs. 1.40 ± 0.20 control; $P < 0.01$; Table 2).

When patients were divided on the basis of HD severity (HD1 vs. HD2), the two groups displayed the same significant differences with respect to controls for neurotrophic factor levels and LDH activity (Fig. 1 and Table 2). While there was no significant difference in MPO levels or WBC counts, the MPO/WBC ratio was significantly higher in HD1 than in controls (0.47 ± 0.27 HD1 vs. 0.23 ± 0.11 control; $P < 0.05$), whereas no significant differences were found between

Table 1

Subject characteristic and clinical ratings of the Huntington's disease (HD) patients and the controls. Values are expressed as means \pm SD (range; minimum–maximum). HD (HD1, HD2); HD1 score UHDRS > 70 and HD2 score UHDRS < 70 .

Parameters	Controls (n = 19)	HD1 (n = 12)	HD2 (n = 7)
Gender (male/female)	8/11	5/7	4/3
Expanded CAG repeat No		44.6 ± 2.3	48.4 ± 3.9
Age (years)	26–58	30–64	24–63
Height (cm)	162.9 ± 7.4	173.1 ± 6.4	157.3 ± 3.5
Weight (kg)	78.5 ± 9.19	74.5 ± 8.6	64.6 ± 4.1
Age at symptom onset (years)		31.4 ± 11.5	40.1 ± 11.2
Disease duration (years)		5.0 ± 3.2	11.9 ± 8.9

Table 2

Levels of BDNF, GDNF, LDH, MPO/WBC and nitrotyrosine (NT) in plasma of patients with Huntington's disease (HD) and control subjects (control). Represent means \pm SD. HD (HD1, HD2); HD1 score UHDRS > 70 and HD2 score UHDRS < 70 .

	Controls (n = 19)	HD1 (n = 12)	HD2 (n = 7)
BDNF (ng/ml)	$2.471.0 \pm 549.7$	$2.383.61 \pm 484.54^*$	$2.647.55 \pm 742.87^*$
GDNF (ng/ml)	844.24 ± 308.86	$428.18 \pm 126.48^*$	$484.98 \pm 180.73^*$
LDH (U/ml)	311.33 ± 38.30	$418.33 \pm 106.38^{**}$	$374.16 \pm 68.36^{***}$
MPO/WBC (ng/WBC)	0.23 ± 0.11	$0.47 \pm 0.10^{***}$	$0.16 \pm 0.27^{****}$
NT (nmol/l)	1.40 ± 0.20	$2.39 \pm 0.54^{***}$	1.81 ± 0.75

* $P < 0.001$ vs control.

** $P < 0.01$ vs control.

*** $P < 0.05$ vs control.

**** $P < 0.05$ vs HD1.

HD2 and controls; the same was true of nitrotyrosine concentrations (2.39 ± 0.75 HD1 vs. 1.40 ± 0.20 control; $P < 0.01$) (Table 2).

Comparison of results for HD1 vs. HD2 revealed a significant increase in NGF levels in HD1 with respect to HD2 (60.88 ± 32.72 HD1 vs. 29.42 ± 14.89 HD2; $P < 0.01$, and $r = 0.522$; $P < 0.032$) (Fig. 1), while levels of BDNF and GDNF tended to be lower in HD1. No significant inter-group differences were found for LDH activity, MPO concentrations (3.07 ± 1.99 HD1 vs. 2.54 ± 2.39 HD2) or nitrotyrosine levels (2.39 ± 0.75 HD1 vs. 1.8 ± 0.54 HD2), but WBC counts were lower and the MPO/WBC ratio higher in HD1 (6.32 ± 1.98 HD1 vs. 8.68 ± 2.70 HD2, $P < 0.05$ and 0.47 ± 0.27 HD1 vs. 0.16 ± 0.10 HD2, $P < 0.05$, respectively) (Table 2).

4. Discussion

To the authors' knowledge, this was the first attempt to simultaneously evaluate plasma NGF, BDNF, GDNF, LDH, MPO and nitrotyrosine levels in patients with HD. Results suggest that: i) NGF, BDNF and GDNF levels are lower in patients with HD than in healthy controls; and ii) LDH activity, nitrotyrosine levels and the MPO/WBC ratio are all greater in patients with HD.

Although patients with HD displayed lower NGF levels than healthy subjects, a finding also reported by Lorigados et al. [9], NGF levels increased with disease severity, a fact that requires closer analysis. NGF is produced and released by cells in cholinergic-innervations target areas [10], supporting the view that the cholinergic-innervation response may trigger an increase in NGF levels.

The results obtained here for BDNF and GDNF are similar to those reported in other published studies using various animal models and in human patients with HD [11] as well as in other brain disorders [12,13].

Taken in conjunction, these data indicate a marked, statistically-significant reduction in circulating neurotrophic factor levels in HD

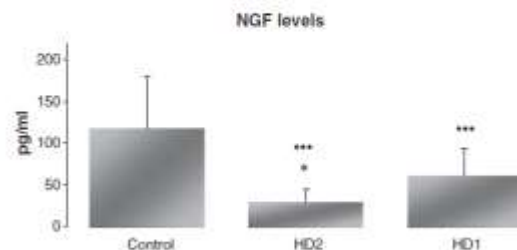


Fig. 1. Levels of NGF in plasma of patients with Huntington's disease and control subjects (controls). Bar represent means \pm SD. HD (HD1, HD2); HD1 score UHDRS > 70 and HD2 score UHDRS < 70 . *** $P < 0.001$ vs control; ** $P < 0.01$ vs HD1. $r = 0.522$, $P < 0.032$.

patients; the extent of that reduction – which becomes more marked as the disease progresses – may serve as an indicator of disease severity. The decline in neurotrophic factor levels would appear to be linked to the neuronal loss characteristic of HD. Similar conclusions have been reached by other authors, in HD, Sydenham's chorea and other neurodegenerative diseases (e.g. Parkinson's disease and MSA), in which basal ganglia are usually affected [13–15]. Moreover, the changes observed here in peripheral neurotrophic-factor levels were similar to those reported in the nervous system in experimental studies and following autopsy [6].

A secondary aim of this study was to examine changes indicative of nitrosative stress. Oxidative/nitrosative stress is known to play a crucial role in the mechanisms underlying aggression and neuronal death in a range of neuropsychiatric-degenerative disorders [16,17], including HD [18,19]. Here, an increase was observed in levels of both nitrotyrosine (a marker for oxidative/nitrosative damage) and MPO (and hence, WBC counts), together with enhanced plasma LDH activity (a marker for cell damage and necrosis).

High nitrotyrosine levels have been reported by a number of authors, both in experimental studies of HD [20], and in earlier research demonstrating intense cell damage characterised by increased peripheral and brain LDH activity [21]. These studies also noted considerable oxidative damage that might be responsible, at least in part, for increased LDH activity. Research suggests that the administration of antioxidant molecules blocks, reverses and prevents deterioration and molecular changes in both chemically-induced and transgenic animal models [22,23]. Studies using experimental HD models have shown that treatment with NGF lowers nitrotyrosine levels, indicating that NGF exerts a neuroprotective effect on striatum neurons [24,25]. Additionally, Cao et al. have highlighted the therapeutic potential of nerve growth factor, noting that NGF administration causes a reduction in oxidative damage and enhances the capacity for cell proliferation and ROS scavenging [26]. Recent findings by the present authors have underlined the major role of peripheral oxidative stress in HD patients, drawing attention to its participation in nerve tissue damage; indeed, oxidative stress appears to be a key factor in the pathogenesis of the disease, and has been identified as a new therapeutic target and a diagnostic biomarker for disease evaluation.

As indicated earlier, there is a strong link between oxidative stress, the activity of the immune system – particularly phagocyte burst – and production of MPO, a pro-oxidant enzyme present in polymorphonuclear WBCs, which is able to generate reactive species that damage lipids and proteins; MPO has been linked to neurodegenerative processes [27] and other kinds of autoimmune-inflammatory disorder including ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis [28].

The marked inflammatory response found in HD [27] is characterised by oxidative stress, intense phagocyte activity [29,30] and an increase in MPO levels. Given the links between these three components, MPO levels and the ratio of MPO to circulating WBCs were measured here. At the same time, and since increased MPO has been associated with increased nitrotyrosine levels, the latter were also measured with a view to establishing a chain of events that might clarify the mechanism underlying both neuronal death and the drop in neurotrophic factor levels. The results obtained agreed with the findings of earlier studies showing that an increase in the MPO/WBC ratio was associated with an increase in oxidative damage marked by elevated nitrotyrosine levels. This would support the hypothesis that oxidative damage is responsible – at least in part – for neuronal death, prompting a drop in the neuron population; this may be the cause of reduced production and release of neurotrophic factors in patients with HD.

The putative link between changes in the MPO/WBC ratio, changes in nitrotyrosine levels and reduced production of neurotrophic factors is indirectly strengthened by reports that the administration of certain neurotrophic factors prompts an improvement in several neurodegenerative disorders: Zhang et al. (2010), using an experimental

colitis model, found that administration of GDNF inhibited MPO activity and improved symptoms [31].

In conclusion, the present findings indicate that: i) patients with HD display lower plasma NGF levels and higher levels of nitrosative stress in blood than healthy controls; ii) NGF levels correlate positively with HD severity; and iii) plasma BDNF and GDNF levels are lower in HD patients. These data support the view that both neurotrophic factors and nitrosative/oxidative stress play a major role in the pathogenesis of HD. However, further research is required to confirm the role played by NGF in HD and to explore in greater depth the link between nitrosative/oxidative stress and inflammation.

Conflicts of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

References

- [1] Binder DK, Scharfman HE. Brain-derived neurotrophic factor. *Growth Factors* 2004;22(3):123–31.
- [2] Zuccato C, Cattaneo E. Role of brain-derived neurotrophic factor in Huntington's disease. *Prog Neurobiol* 2007;81(5–6):294–330.
- [3] Zuccato C, Marullo M, Conforti P, MacDonald ME, Tartari M, Cattaneo E. Systematic assessment of BDNF and its receptor levels in human cortices affected by Huntington's disease. *Brain Pathol* 2008;18(2):225–30.
- [4] Dell'Osso L, Del Debbio A, Veltri A, Bianchi C, Roncaglia I, Carlini M, et al. Associations between brain-derived neurotrophic factor plasma levels and severity of the illness, recurrence and symptoms in depressed patients. *Neuropsychobiology* 2010;62(4):207–12.
- [5] Piccini A, Manzini D, Del Debbio A, Bianchi C, Roncaglia I, Mannari C, et al. Diurnal variation of plasma brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in humans: an analysis of sex differences. *Chronobiol Int* 2008;25(5):819–26.
- [6] Conforti P, Ramos C, Apostol BL, Simmons DA, Nguyen HP, Riess O, et al. Blood level of brain-derived neurotrophic factor mRNA is progressively reduced in rodent models of Huntington's disease: restoration by the neuroprotective compound CEP-1347. *Mol Cell Neurosci* 2008;39(1):1–7.
- [7] Unified Huntington's Disease Rating Scale: reliability and consistency. Huntington Study Group. *Mov Disord* 1996;11(2):136–42.
- [8] Folstein MF, Folstein FE, McHugh PR. "Mini-mental state": A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 1975;12(3):129–138.
- [9] Lorigados L, Pavon N, Serrano T, Robinson MA. Nerve growth factor and neurological diseases. *Rev Neurol* 1998;26(153):744–8.
- [10] Aloe L, Micera A, Bracci-Laudiero L, Vignetti E, Turrini P. Presence of nerve growth factor in the thymus of prenatal, postnatal and pregnant rats. *Thymus* 1997;24(4):221–31.
- [11] Ciannella A, Sessone J, Cannella M, Calza S, Poletti B, Frati L, et al. Low brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in serum of Huntington's disease patients. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2007;144B(4):574–7.
- [12] Scalzo P, Kummer A, Bretas TL, Cardoso F, Teixeira AL. Serum levels of brain-derived neurotrophic factor correlate with motor impairment in Parkinson's disease. *J Neurol* 2010;257(4):540–5.
- [13] Teixeira AL, Bretas TL, Kummer A, Melo LC, Baraldi A, Hansanyi E, et al. Serum levels of brain-derived neurotrophic factor in Sydenham's chorea. *Neurosci Sci* 2010;31(3):399–401.
- [14] Chaaban NB, Siegel GJ, Lee JM. Depletion of glial cell line-derived neurotrophic factor in substantia nigra neurons of Parkinson's disease brain. *J Chem Neuroanat* 2001;21(4):277–88.
- [15] Ubhi K, Rockenstein E, Manie M, Inglis C, Adame A, Patrick C, et al. Neurodegeneration in a transgenic mouse model of multiple system atrophy is associated with altered expression of oligodendroglial-derived neurotrophic factors. *J Neurosci* 2010;30(18):6236–46.
- [16] Beal MF. Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illnesses? *Ann Neurol* 1992;31(2):119–30.
- [17] Tabrizi SJ, Cleeter MW, Xueereb J, Tannan JW, Cooper JM, Schapira AH. Biochemical abnormalities and excitotoxicity in Huntington's disease brain. *Ann Neurol* 1999;45(1):25–32.
- [18] Klepac N, Relja M, Klepac R, Hecimovic S, Babic T, Trkulja V. Oxidative stress parameters in plasma of Huntington's disease patients, asymptomatic Huntington's disease gene carriers and healthy subjects: a cross-sectional study. *J Neurol* 2007;254(12):1676–83.
- [19] Somija MA, Reverte-Branchat G, Tamant J, Ferrer I, Ros J, Cabisco E. Proteomic and oxidative stress analysis in human brain samples of Huntington disease. *Free Radic Biol Med* 2008;45(5):667–78.
- [20] Matthews RT, Yang L, Jenkins BG, Ferrante RJ, Rosen BR, Kadlurah-Daouk R, et al. Neuroprotective effects of creatine and cyclocreatine in animal models of Huntington's disease. *J Neurosci* 1998;18(1):156–63.
- [21] Tunes I, Collado JA, Medina FJ, Pena J, Del Muñoz MC, Jimena I, et al. 17 beta-Estradiol may affect vulnerability of striatum in a 3-nitropropionic acid-induced experimental model of Huntington's disease in ovariectomized rats. *Neurochem Int* 2006;48(5):367–73.

- [22] Kumar P, Kumar A. Possible neuroprotective effect of *Withania somnifera* root extract against 3-nitropropionic acid-induced behavioral, biochemical, and mitochondrial dysfunction in an animal model of Huntington's disease. *J Med Food* 2009;12(3):591–600.
- [23] Vamos E, Voros K, Vecsei L, Kilvenyi P. Neuroprotective effects of L-carnitine in a transgenic animal model of Huntington's disease. *Biomed Pharmacother* 2010;64(4):282–6.
- [24] Galpern WR, Matthews RT, Beal MF, Isacson O. NGF attenuates 3-nitrotyrosine formation in a 3-NP model of Huntington's disease. *Neuroreport* 1996;7(15–17):2639–42.
- [25] Maksimovic ID, Jovanovic MD, Malicevic Z, Colic M, Ninkovic M. Effects of nerve and fibroblast growth factors on the production of nitric oxide in experimental model of Huntington's disease. *Vojnosanit Pregl* 2002;59(2):119–23.
- [26] Cao Y, Liu JW, Yu YJ, Zheng PY, Zhang XD, Li T, et al. Synergistic protective effect of picroside II and NGF on PC12 cells against oxidative stress induced by H2O2. *Pharmacol Rep* 2007;59(1):573–9.
- [27] Hsiao HY, Chern Y. Targeting glial cells to elucidate the pathogenesis of Huntington's disease. *Mol Neurobiol* 2010;41(2–3):248–55.
- [28] Feijoo M, Tomez I, Tasset L, Montilla P, Perez-Gueto V, Munoz-Gomariz E, et al. Infliximab reduces myeloperoxidase concentration in chronic inflammatory joint diseases. *Pharmacology* 2009;83(4):211–6.
- [29] Dalrymple A, Wild EJ, Joubert R, Sathasivam K, Bjorkqvist M, Petersen A, et al. Proteomic profiling of plasma in Huntington's disease reveals neuroinflammatory activation and biomarker candidates. *J Proteome Res* 2007;6(7):2833–40.
- [30] Bjorkqvist M, Wild EJ, Thiele J, Silvestroni A, Andre R, Lahiri N, et al. A non-pathogenic pathway of immune activation detectable before clinical onset Huntington's disease. *J Exp Med* 2008;205(8):1869–77.
- [31] Zhang DK, He FQ, Li TK, Pang XH, Cui de J, Xie Q, et al. Glial-derived neurotrophic factor regulates intestinal epithelial barrier function and inflammation and therapeutic for murine colitis. *J Pathol* 2010;222(2):213–22.

Oxidative stress and inflammation biomarkers in the blood of patients with Huntington's disease

Fernando Sánchez-López^{*1}, Inmaculada Tasset^{*2}, Eduardo Agüera¹,
Montserrat Feijóo², Ricardo Fernández-Bolaños³, Francisco M. Sánchez³,
María C. Ruiz², Antonio H. Cruz⁴, Félix Gascón⁴, Isaac Túnez²

¹Servicio de Neurología, Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC)/Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba, Córdoba, España, ²Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, IMIBIC/Universidad de Córdoba, España, ³Servicio de Neurología, Hospital Universitario Nuestra Señora de Valme, Sevilla, España, ⁴Servicio de Análisis Clínicos, UGC Laboratorio Clínico ASNC-FEA, Hospital Comarcal 'Valle de los Pedroches', IMIBIC, Córdoba, España

Objectives: Huntington's disease (HD) is a neurodegenerative disorder for which there is no effective treatment. Oxidative stress and inflammation are known to be involved in HD, but the precise relationship between the two remains unclear. The aim of this study was to analyze oxidative stress and inflammation biomarkers in blood of patients with HD with a view to identifying potential links between them.

Methods: Blood samples were collected from 13 patients with HD and from 10 age- and sex-matched controls, and the following were measured: C-reactive proteins, myeloperoxidase (MPO)/white blood cell (WBC) ratio, interleukin-6 (IL-6), thioredoxin reductase-1 (TrRd-1), thioredoxin-1 (Trx-1), total nitrites (NOx), nitric oxide synthase (NOS) and nitrotyrosine.

Results: Results showed that HD is associated to a reduction of TrRd-1 and Trx-1 levels in plasma and erythrocytes, and with an increase in the MPO/WBC ratio. A positive correlation was observed between global oxidative stress (GOS) and MPO/WBC. No changes were found in NOS and Nox levels with respect to controls.

Conclusion: Oxidative damage may be linked to the inflammatory response in HD, via a peripheral immune response.

Keywords: Biomarkers, Immune system, Huntington disease, Oxidative stress

Introduction

Huntington's disease (HD) is a rare neurodegenerative disorder of the central nervous system for which there is no effective treatment. It is an autosomal dominant disease characterized by choreatic movements, behavioral and psychiatric disturbances, dementia, and weight loss. HD causes neuronal death in the striatum and cerebral cortex.¹

A number of studies have shown that HD is characterized by dysregulation of the immune system both within and outside the central nervous system,^{2,3} marked by an increase in interleukins (ILs), TNF-alpha, immunoglobulins sTNF-R, and complement C3.^{2,4} Recently, Andrich *et al.*⁵ reported that the prevalence

of gastroesophageal inflammation was more common in HD than might be indicated by patients' complaints.

Attention has been drawn to the role of oxidative stress in HD, characterized by an imbalance between the production of ROS and reactive nitrogen species and/or an impairment of antioxidant systems.⁶⁻¹¹ The authors have recently confirmed the presence of global oxidative stress in peripheral blood samples from HD patients, noting a decline in non-enzymatic extracellular antioxidant systems.¹²

Research in other neurodegenerative disorders, for example Alzheimer's disease and Parkinson's disease, has identified both inflammation and oxidative stress as potential therapeutic targets.^{13,14} Oxidative stress and the neuroinflammatory response are known to exert both detrimental and beneficial influences on nerve tissue.¹⁵

On the basis of these data, the present study sought to examine possible links between the immune

*These authors contributed equally in this work.

Correspondence to: I. Túnez, Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Córdoba, Av. Menéndez Pidal s/n, 14004-Córdoba, Spain. Email: tm2tufi@uco.es

response and oxidative damage in patients with HD, analyzing the role played by myeloperoxidase (MPO), an enzyme involved in the bactericidal action and inflammatory response of white blood cells (WBC).

Methods

Thirteen patients from the Neurology Department of the Reina Sofía Teaching Hospital (Córdoba, Spain) and the Valme Hospital (Seville, Spain) took part in the study. Diagnosis of HD was confirmed genetically by the Genetics Departments at the two hospitals. The patients were divided into two groups as a function of disease severity, using the Unified Huntington's Disease Rating Scale (UHDRS):¹⁶ Group HD1 (UHDRS>70) and Group HD2 (UHDRS<70). Ten healthy age- and sex-matched controls were recruited. Inclusion criteria: informed consent, CAG trinucleotide expansion >35 repeats, aged 18–70 years, >25 score in mini mental state examination.¹⁷ Exclusion criteria: chronic inflammatory disease, infectious illness three days prior to the start of the study, diabetes mellitus, chronic heart disease, anaemia and vitamin or antioxidant supplement intake. The study was conducted according to Helsinki Declaration and was approved by the local Ethics Committee.

Blood samples were obtained of each patient. These samples blood was collected between 8 and 11 a.m. in tubes containing 1 mg/ml EDTA-K3 as anticoagulant, after 12 hours of fasting. Immediately after, plasma was separated from red cells by centrifugation at 2500 rpm, 4°C, 15 minutes. In all subjects a complete blood count, routine biochemical analyses were performed.

Plasma C-reactive protein levels were measured using an assay kit (OSR6147, CRP; Olympus, Orlando, FL, USA), and MPO plasma concentrations were assayed using reagents purchased from Oxis International (Portland, OR, USA). Individual MPO/WBC ratios were calculated. Thioredoxin reductase-1 (TrRd-1) and thioredoxin-1 (Trx-1) ELISA kits were purchased from BioVendor-Laboratorni medicina a.s., Brno, Czech Republic (RLF-EK0122R and RLF-EK0125R, respectively), IL-6 was determined using BioSource IL-6 ELISA Kit purchased from Europe SA (Nivelles, Belgium). Nitric oxide synthase (NOS) was determined by Ultrasensitive Colorimetric NOS Assay purchased from Oxford Biomedical Research Inc. (Oxford, MI, USA). Total nitrites (nitres and nitrates) were used as a marker of nitric oxide (NO) levels and assayed following the Griess method.¹⁸

Statistical evaluation was carried out with the SPSS17.0[®] statistical software package (SPSS Iberica, Madrid, Spain) for Windows. The Shapiro-Wilk test showed no a significant departure from normality in the distribution of variance values. Statistical significance was measured using the one-way ANOVA,

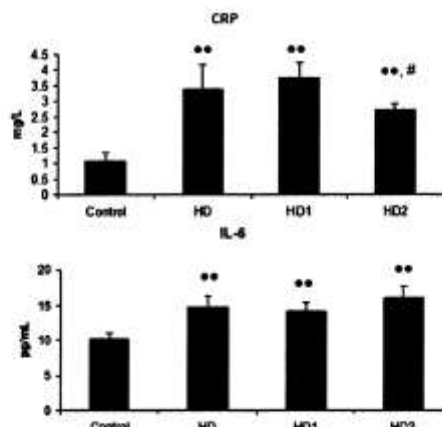


Figure 1 Levels of CRP and IL-6 in plasma of patients with HD and healthy subjects (controls). Bar represent means \pm SD. HD (HD1, HD2); HD1 score UHDRS>70 and HD2 score UHDRS<70. * P <0.01 versus control; # P <0.05 versus HD1.

corrected with the Bonferroni test to compare the data among three groups (HD1, HD2, and control), while the Student's *t*-test was used to compare two groups (HD versus control). Data are presented as means \pm SD.

Results

Patient demographic data are shown in Table 1. Patients with HD displayed a significant increase in the inflammatory markers CRP, IL-6 (Fig. 1), and MPO/WBC ratio in plasma (Table 2), and a significant decrease in TrRd-1 and Trx-1 levels compared with healthy controls (Tables 3 and 4).

When patients were divided on the basis of HD severity (HD1 versus HD2), the two groups displayed the same significant differences with respect to controls.

CRP levels were significantly higher in HD1 than in HD2 (Fig. 1), as were TrRd-1 levels (Table 3) and the MPO/WBC ratio (Table 2); there was no significant difference between the two groups for IL-6 or Trx-1 levels (Fig. 1 and Table 4, respectively).

No statistically significant intergroup differences were found in NOS and NOx levels in peripheral blood samples (Table 2).

Table 1 Demographic characteristics of the HD patients and the controls: values are expressed as means \pm SD

Parameters	Controls (n=10)	HD (n=13)
Age (years)	39 \pm 12.51	42 \pm 10.65
Gender (male/female)	8/11	6/7
Height (cm)	162 \pm 7	168 \pm 8
Weight (kg)	76 \pm 8	71 \pm 7
Expanded CAG repeat no.		47 \pm 5
Age at symptom onset (years)		35 \pm 12
Disease duration (years)		10 \pm 8

Previous research by the authors¹² in HD patients has shown that global oxidative stress (GOS) increases with disease intensity, a significant positive correlation being observed between the two parameters, and that the antioxidant gap and reduced glutathione (GSH) levels are significantly lower in HD patients than in healthy controls, whereas there is no significant difference in the GSH/GSSG ratio.

The present study only found a correlation between these variables and the MPO/WBC ratio: the correlation was positive for GOS ($r: 0.634; P<0.05$) and negative for GAP ($r: 0.844; P<0.001$).

Discussion

A number of studies have highlighted the existence of a peripheral immune response in patients with HD^{2,4} and previous research by the present authors has confirmed a positive correlation between the extent of global oxidative stress at peripheral level and disease severity.¹²

The results of the present study indicated a significant decline in TrRd-1 and Trx-1 levels in HD patients, accompanied by increased levels of IL-6 and CRP, a nonspecific marker of inflammation. Similar findings are reported by other authors, who note a significant increase in plasma TNF-alpha, IL-6, and IL-8 in HD patients,^{2,19} as well as similar changes in other neurodegenerative processes including Alzheimer's disease and Parkinson's disease.^{14,20,21} A recent study has reported a link between Trx-1 levels and immune system activity, indicating that NF-kappabeta gene expression is associated with changes in Trx-1 activity.²²

There was a significant increase in the MPO/WBC ratio in HD patients compared to healthy controls, although not in WBC counts, suggesting an increase in WBC activity rather than numbers. Furthermore,

analysis of possible correlations between the inflammatory response and oxidative stress in HD patients indicated a positive correlation between the MPO/WBC ratio and GOS, and a negative correlation between the MPO/WBC ratio and the antioxidant gap. Taken in conjunction, these findings support the view that the inflammatory response plays a key role in the pathogenesis of HD, and that this role is mediated by the production of reactive species and the ensuing oxidative damage.

These data suggest that inflammatory processes and oxidative damage in the nerve tissue of patients with this autosomal neurodegenerative disease may trigger changes in blood marker levels.

No statistically significant differences in NOx and NOS levels were observed between HD patients and healthy controls. Moreover, no correlation was found between either NOx or NOS levels and disease severity (HD1 or HD2), although other studies report an increase in NOx in HD patients.⁹ This disparity in findings may be due to: (i) the method used to measure NOx levels (HPLC); (ii) the number of patients and the severity of disease; and (iii) the type of sample studied.

To summarize: (i) HD was associated with a reduction in plasma and erythrocytes of TrRd-1 and Trx-1 levels; (ii) patients with HD displayed an increase in the plasma MPO/WBC ratio; and (iii) a positive correlation was observed between GOS and the MPO/WBC ratio. These findings suggest a link between oxidative damage and the inflammatory response in HD. However, further research is required in order to obtain detailed information regarding the biochemical and molecular mechanisms involved, and their potential use both as a therapeutic target and as a biomarker for monitoring disease progression.

Table 2 Oxidative stress biomarkers of the HD patients and the controls: values are expressed as means \pm SD; HD (HD1, HD2); HD1 score UHDRS > 70 and HD2 score UHDRS < 70

Parameters	Controls (n=10)	HD (n=13)	HD1 (n=8)	HD2 (n=5)
NOS (μ mol of NO/ μ g of protein/unit time)	4.3 \pm 2.0	4.0 \pm 2.2	3.4 \pm 2.5	4.9 \pm 1.3
NOx (μ mol)	261.7 \pm 25.2	264.9 \pm 24.4	265.2 \pm 21.7	264.3 \pm 33.8
WBC (10^3 / μ l)	7.5 \pm 1.1	7.1 \pm 2.5	6.3 \pm 2.0	8.7 \pm 2.7
MPO (ng/ml)	1.96 \pm 1.1	3.08 \pm 1.9	3.17 \pm 1.7	2.3 \pm 2.9
MPO/WBC ratio	0.24 \pm 0.19	0.47 \pm 0.29*	0.60 \pm 0.23*	0.34 \pm 0.45*

Note: * $P<0.05$ versus control; * $P<0.05$ versus HD1.

Table 3 Levels of TrRd-1 in plasma and erythrocytes of HD patients and healthy subjects (controls)

TrRd-1	Plasma (ng/ml)	Erythrocytes (ng/gHb)
Control	0.92 \pm 1.05	6.57 \pm 2.56
HD	0.54 \pm 0.04**	4.31 \pm 0.30*
HD1	0.58 \pm 0.04**	4.46 \pm 0.45*
HD2	0.46 \pm 0.08***	4.40 \pm 0.47**

Note: Data represent means \pm SD. HD (HD1, HD2); HD1 score UHDRS > 70 and HD2 score UHDRS < 70. ** $P<0.01$ versus control; * $P<0.05$ versus control; *** $P<0.05$ versus HD1.

Table 4 Levels of Trx-1 in plasma and erythrocytes of HD patients and healthy subjects (controls)

Trx-1	Plasma (ng/ml)	Erythrocytes (ng/gHb)
Control	5.25 \pm 3.44	37.04 \pm 25.06
HD	0.84 \pm 1.39**	6.51 \pm 10.92**
HD1	0.79 \pm 1.46**	6.43 \pm 12.02*
HD2	0.91 \pm 1.48*	6.65 \pm 10.81*

Note: Data represent means \pm SD. HD (HD1, HD2); HD1 score UHDRS > 70 and HD2 score UHDRS < 70. ** $P<0.01$ versus control; * $P<0.05$ versus control.

References

- 1 Vonsattel JP, Myers RH, Stevens TJ, Ferrante RJ, Bird ED, Richardson EP Jr. Neuropathological classification of Huntington's disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1985;44:559-77.
- 2 Björkqvist M, Wild EJ, Thiele J, Sövestrom A, Andre R, Lahiri N, et al. A novel pathogenic pathway of immune activation detectable before clinical onset in Huntington's disease. *J Exp Med*. 2008;205:1869-77.
- 3 Wild E, Björkqvist M, Tabrizi SJ. Immune markers for Huntington's disease? *Expert Rev Neurother*. 2008;8:1779-81.
- 4 Leblhuber F, Walli J, Jellinger K, Titz GP, Widner B, Laccone F, et al. Activated immune system in patients with Huntington's disease. *Clin Chem Lab Med*. 1988;36:747-50.
- 5 Andrich JE, Wobben M, Klotz P, Goette O, Saft C. Upper gastrointestinal findings in Huntington's disease: patients suffer but do not complain. *J Neural Transm*. 2009;116:1667-11.
- 6 Mancuso MF, Coppede L, Migliore L, Siciliano G, Muri L. Mitochondrial dysfunction, oxidative stress and neurodegeneration. *J Alzheimers Dis*. 2006;10:59-73.
- 7 Klepac N, Relja M, Klepac R, Hecimovic S, Babic T, Trkulja V. Oxidative stress parameters in plasma of Huntington's disease gene carriers and healthy subjects. *J Neurol*. 2007;254:1676-83.
- 8 De Vries HE, Witte M, Hondius D, Rozemuller AJ, Drakarch B, Hoozemans J, et al. Nrf2-induced antioxidant protection: a promising target to counteract ROS-mediated damage in neurodegenerative disease? *Free Radic Biol Med*. 2008;45:1375-83.
- 9 Boll MC, Alcazar-Zubeldia M, Montes S, Ríos C8. Free copper, ferroxidase and SOD1 activities, lipid peroxidation and NOx content in the CSF. A different marker profile in four neurodegenerative diseases. *Neurochem Res*. 2008;33:1717-23.
- 10 Sorolla MA, Reverter-Branchat G, Tamarit J, Ferrer I, Ros J, Cabiscol E. Proteomic and oxidative stress analysis in human brain samples of Huntington disease. *Free Radic Biol Med*. 2008;45:667-78.
- 11 Tüzet I, Sánchez F, Tüzet I. The molecular bases of Huntington's disease: the role played by oxidative stress. *Rev Neurol*. 2009;49:424-9.
- 12 Tüzet I, Sánchez-López F, Agüera E, Fernández-Bolaños R, Sánchez FM, Tüzet-Cuevas I. Important role of oxidative stress biomarkers in Huntington's disease. *J Med Chem*. 2011;54:5602-6.
- 13 Galasko D, Montine TJ. Biomarkers of oxidative damage and inflammation in Alzheimer's disease. *Biomark Med*. 2010;4:27-36.
- 14 Miller RL, James-Kracke M, Sun GY, Sun AY. Oxidative and inflammatory pathways in Parkinson's disease. *Neurochem Res*. 2009;34:55-65.
- 15 Agostinho P, Cunha RA, Oliveira C. Neuroinflammation, oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr Pharm Des*. 2010;16:2766-78.
- 16 Huntington Study Group. Unified Huntington's disease rating scale: reliability and consistency. *Mov Disor*. 1996;11:136-42.
- 17 Folstein MS, Folstein SE, McHugh PR. 'Mini Mental State' a practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res*. 1975;12:189-98.
- 18 Ricart-Jané D, Llobera M, López-Tejero MD. Anticoagulants and other preanalytical factors interfere in plasma nitrate/nitrite quantification by the Griess method. *Nitric Oxid*. 2002;6:178-85.
- 19 Hsiao HY, Chern Y. Targeting glial cells to elucidate the pathogenesis of Huntington's disease. *Mol Neurobiol*. 2010;41:248-55.
- 20 Lee YJ, Han SB, Nam SY, Oh KW, Hong JT. Inflammation and Alzheimer's disease. *Arch Pharm Res*. 2010;33:1539-56.
- 21 Galimberti D, Scarpini E. Inflammation and oxidative damage in Alzheimer's disease: friend or foe? *Front Biosci*. 2011;3:252-66.
- 22 Hellman JM, Burke TJ, McClain CJ, Watson WH. Transactivation of gene expression by NF- κ B is dependent on thioredoxin reductase activity. *Free Radic Biol Med*. 2011;51:1533-42.

Estado actual del problema

