

00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS FACULTAD DE CIENCIAS

TERAPIA ANTIOXIDANTE CON SELENIO CONTRA LA NEUROTOXICIDAD DEL ACIDO QUINOLINICO IN VIVO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A :

BEATRIZ VAZQUEZ ROMAN

DIRECTOR DE TESIS: DR. ADEL TAMAMARIA DEL ANGEL



MEXICO, D. F.

ENERO 2005

COORDINACIÓN

m 340274



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
COORDINACIÓN**

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Jacqueline Román Beatriz

FECHA: 7 de Enero 2005

FIRMA: [Firma manuscrita]

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 8 de noviembre del 2004, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del(a) alumno(a) Vázquez Román Beatriz con número de cuenta 91355526, con la tesis titulada: "Terapia Antioxidante con Selenio contra la Neurotoxicidad del ácido quinolinico", bajo la dirección del(a) Dr. Abel Santamaría del Ángel.

Presidente:	Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte
Vocal:	Dra. Francisca Pérez Severiano
Secretario:	Dr. Abel Santamaría del Ángel
Suplente:	Dra. María Luisa Fanjul Peña
Suplente:	Dr. Miguel Ángel Jorge Guevara Fonseca

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, DrF/a, 13 de diciembre del 2004

[Firma manuscrita]
Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al CONACYT por su apoyo durante los semestres 2004-1 y 2004-2 con el número de becario 183185 en la realización de mis estudios de maestría que fueron dirigidos por el por el Dr. Abel Santamaría del Angel como tutor principal y el jurado asignado por el Comité Académico : Dra. Ma. Eugenia Gonsebatt Bonaparte y Dr. M.A. Jorge Guevara Fonseca.

La conclusión de este trabajo se realizó gracias a las valiosas aportaciones interdisciplinarias del laboratorio de neuroinmunología del INN y a las atinadas observaciones de mi comité tutorial.

Agradezco la ayuda y reconforte de Darío, así como de mis hermanos y padres. Y por supuesto a mis compañeras de laboratorio.

◀◀ INDICE ▶▶

I. RESUMEN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	3
1. ACIDO QUINOLINICO	
1.1. GENERALIDADES.....	3
1.2. PATOLOGÍAS ASOCIADAS A QUIN.....	5
2. MUERTE NEURONAL.....	8
2.1. FACTOR DE INDUCCIÓN TEMPRANA.....	8
3. SELENIO	
3.1. GENERALIDADES.....	11
3.1.1 SELENIO COMO FACTOR ANTIAPOPTOTICO Y NEUROPROTECTOR.....	15
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	18
IV. HIPOTESIS.....	20
V. OBJETIVOS.....	21
VI. MATERIALES Y METODOS	
6.1. REACTIVOS Y ANIMALES.....	22
6.1.1. PRETRATAMIENTO CON SELENIO E INYECCIÓN INTRAESTRIATAL DE QUIN.....	22
6.2. TECNICAS.....	23
6.2.1. INMUNOHISTOQUIMICA.....	24
6.2.2. WESTERN BLOT.....	25
6.2.3. ESCALERA.....	26
VII. RESULTADOS	
7.1. DEGRADACION DE IKB- α	27
7.2. SUBUNIDAD P65 DEL FACTOR NF κ B.....	30
7.3. DEGRADACION DE DNA.....	33
VIII. DISCUSION.....	34
IX. CONCLUSIONES.....	37
X. BIBLIOGRAFIA.....	39

RESUMEN

Durante el desarrollo del sistema nervioso, es necesaria la muerte apoptótica para la optimización de conexiones sinápticas, así como para la funcionalidad neuronal, ésto mediante el balance de señales pro- y anti-apoptóticas que permiten la sobrevivencia neuronal necesaria en un buen desarrollo. Sin embargo, cuando se presenta un desbalance en el adulto ya sea de las señales pro- ó anti-apoptóticas, puede iniciarse o hacerse evidente una neurodegeneración.

Procesos como la apoptosis y la necrosis pueden ocurrir en estriado de rata luego de la administración de excitotoxinas (Ferrer y col. 1995). Estos desajustes pueden presentarse en modelos experimentales por la activación de receptores NMDA y/o la generación de ROS (especies reactivas de oxígeno) con la administración de agonistas glutamatérgicos como el ác. quinolínico (QUIN). Si bien, aún no son bien establecidos los mecanismos por los cuales las especies reactivas del oxígeno juegan un rol en la activación del factor de transcripción nuclear κ B (NF- κ B), conocido como un factor apoptótico bajo estímulo oxidante o nitrante (Li y Karin, 1999), hay evidencias de que tanto ROS, como la activación de NF- κ B disminuyen con el incremento de la enzima glutatión peroxidasa (Kretz-Remy y col. 1996).

El presente trabajo tiene como finalidad evidenciar la posible función del selenio como inhibidor (directo o indirecto) de la activación de NF- κ B al impedir la ruptura del complejo NF- κ B:I κ B- α y la posible muerte apoptótica por esta vía que podría desencadenarse, apoyándonos para ello con evidencia de degradación de DNA en el modelo de toxicidad evocado por QUIN, en cuerpo estriado de ratas macho Wistar.

Para ello se analizó la presencia citosólica de la proteína I κ B- α por Western blot e inmunohistoquímica como marcador de degradación de I κ B- α , ya que al ser fosforilada esta

proteína rompe su enlace con NF- κ B e inmediatamente es hidrolizada. La subunidad p65 del dímero NF- κ B (p50 y p65) por análisis inmunohistoquímico permitió observar a este factor en núcleo, evidenciando su traslocación nuclear en los animales tratados con la toxina. Por otro lado, considerando el daño neuronal que evoca el QUIN, se evaluó el daño a DNA con un análisis por escalera que demuestra su fragmentación, y la inhibición de este efecto con la administración previa del selenio vía sistémica en rata.

Nuestros hallazgos en el modelo de toxicidad evocado por QUIN fueron la degradación de I κ B- α en citosol, la presencia de NF- κ en núcleo y la fragmentación de DNA; al coadministrar selenito de sodio los parámetros anteriores son abatidos. Entonces nuestros resultados proporcionan herramientas que orientan la acción prooxidante del QUIN a desencadenar pasos moleculares posiblemente de reparación que eventualmente podría activar el factor NF- κ B al trasladarse al núcleo, o bien inducir la transcripción mediante NF- κ de proteínas apoptóticas como proteasas que sean capaces de fragmentar al DNA; sin embargo, el factor específico que realice directamente esta acción aún no es claro.



ANTECEDENTES

1. ACIDO QUINOLINICO

1.1. *Generalidades*

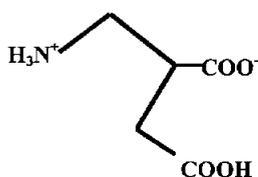
Ac. 2,3-Piridín Dicarboxílico

El ácido quinolínico (QUIN) y el ácido kinurénico, dos metabolitos del triptofano en la vía de la kinurenina, encontrados en altas concentraciones en hígado, así como en efectos pronunciados en la función neuronal; muestran una actividad elevada en los receptores de los aminoácidos excitadores (AAE) de las neuronas centrales (Stone y Perkins 1981; 1982; 1983). Estos mismos compuestos también han sido empleados como inductores de actividad convulsionante cuando son inyectados directamente en el cerebro de roedores (Lapin, 1978a; b; 1981a; b), pero el significado de estas observaciones no fueron develadas sino hasta principios de los 80's.

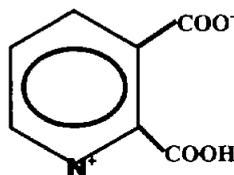
Inicialmente, la importancia de la vía de la kinurenina fue justificada como una fuente de nicotinamida, un factor importante para monitorear la deficiencia de la piridoxina ya que esta vitamina es un importante cofactor de algunas de las enzimas de la kinurenina como molécula. Además, bajo condiciones normales, gran parte del triptofano catabolizado sigue la vía hasta formar acetil-coenzima A, y sólo una pequeña proporción del metabolismo diario del triptofano deriva a los otros metabolitos. Sin embargo, bajo condiciones patológicas de constante disposición de triptofano, la producción de kinurenina y de metabolitos intermediarios como el QUIN se incrementa considerablemente (Vender, 1975). Desde 1980, y en paralelo con el incremento de las sustancias de interés en el rol de los receptores para aminoácidos excitadores; estos agentes fueron asociados con la neurotransmisión, aprendizaje, memoria y enfermedades neurodegenerativas (Choi, 1988;

Stone y Burton, 1988; Collingridge y Lester, 1989), y desde entonces y hasta la fecha, el interés por el análisis y entendimiento de la función de las vías del triptofano en el sistema nervioso central ha ido en aumento.

Desde hace tiempo se ha establecido que la acción excitotóxica del QUIN en estriado está mediada por los receptores tipo NMDA (N-metil-D-aspartato), y su acción es antagonizada por magnesio y aminofosfonatos. La estimulación del receptor NMDA por QUIN en estriado de rata produce desórdenes metabólicos diversos: reducción del consumo de O_2 mitocondrial, disminución de los niveles de ATP y NAD, así como de las concentraciones de aspartato y glutamato (Bordelon y col.,1997). Además, reproduce el patrón de pérdida de células neuronales característica de la enfermedad de Huntington (Bordelon y col., 1997; el-Defrawy y col., 1986). Hay también una reducción de la actividad de la glutatión reductasa, observada en experimentos en ratas, que sugiere una causa o factor de contribución al déficit observado en la disponibilidad del glutatión inducida por QUIN (Aguado y col., 2000).



GLUTAMATO



AC. QUINOLINICO

El QUIN es sintetizado en microglia y macrófagos en el estriado de rata a través de la 3-hidroxi-antranilato oxigenasa. Los niveles extracelulares de QUIN durante una inflamación neuronal son tan altos que promueven la excitotoxicidad (Lehrmann y col., 2001; Obrenovitch, 2001). Los astrocitos presentan un papel protector al minimizar la producción de QUIN y maximizando la síntesis de ácido kinurénico; sin embargo, en presencia de macrófagos y/o microglia, los astrocitos se vuelven indirectamente neurotóxicos por la producción de grandes concentraciones de kinurenina que puede ser

metabolizada secundariamente por monocitos infiltrados o cercanos, quienes formarán finalmente QUIN (Guillemin y col., 2001).

1.2. *Patologías asociadas a QUIN*

Dado que el QUIN puede estar involucrado en algunos de los procesos de envejecimiento celular relacionados con la edad, es probable que sea un factor potencialmente activo en la degeneración neuronal espontánea que ocurre durante los cambios fisiológicos vinculados con la edad. Este hecho es interesante cuando se considera que los efectos tóxicos inducido por este metabolito endógeno sólo se han observado en tejido nervioso maduro (Schwarcz y col., 1984), lo que refuerza la tendencia a pensar en un posible vínculo entre las alteraciones celulares relacionadas a la edad y la sobreproducción de esta neurotoxina. Un incremento del QUIN se observó preferencialmente en cuerpo estriado y corteza cerebral (Moroni y col., 1984), regiones especialmente susceptibles a la toxicidad de este aminoácido neurotóxico (Beal y col., 1986; Schwarcz y col., 1984; DiFiglia, 1989), a los procesos patológicos encontrados en la Enfermedad de Huntington (HD) (Bugiani y col., 1984; Martin y Gusella, 1986; Gravelord, 1985), y a los procesos generales de envejecimiento (Cote, 1985), existiendo así múltiples puntos de concordancia.

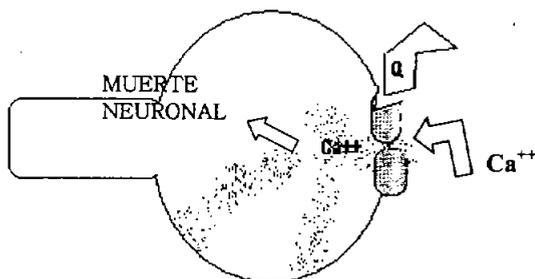
La vía de la kinurenina y el QUIN, uno de sus productos, juegan un papel importante en la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas, y en particular del complejo SIDA/demencia. Se sabe que, en el estriado de rata, el ácido kinurénico bloquea los efectos neurotóxicos del QUIN (Foster y col., 1984; Guillemin y col., 2001). Al QUIN además se le ha asociado con cáncer (Harman, 1993) a través de la formación de radicales hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) (Ganther, 1999). Adicionalmente se ha demostrado que el QUIN *per se* induce la formación de radicales $\bullet\text{OH}$ *in vivo* en cuerpo estriado de rata (Santamaría y col., 2001b).

El QUIN como excitotoxina, al ser infundido intraestriatalmente de manera crónica y a bajas concentraciones (4-10 nmol/h) induce una degeneración de células neuronales

tiempo-dependiente, con una disminución selectiva de células colinérgicas (Forloni y col., 1992). La degeneración se observa alrededor del sitio de inyección. Se ha observado un incremento en la actividad de las aferentes dopaminérgicas en las fases aguda y subaguda de la inyección de QUIN, detectándose además un incremento en los niveles locales de norepinefrina luego de 4 y 11 días de la inyección intraestriatal de QUIN, permaneciendo sin cambios en los sitios distantes o en los períodos más cercanos al momento de la microinyección (Mazzari y col., 1986), así también hay un incremento en la actividad de la enzima QUIN-fosforibosiltransferasa (enzima que degrada al QUIN) en respuesta a los eventos neurodegenerativos (Foster y col., 1985). Se observa además una reducción dosis-dependiente del contenido estriatal de GABA, luego de una infusión intraestriatal de QUIN (Harris y col., 1998).

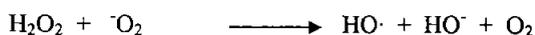
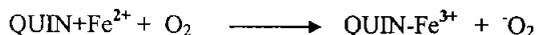
La inyección de QUIN en cuerpo estriado no altera los sitios distantes a la inyección. Un incremento agudo en las concentraciones de QUIN conduce a un aumento en la actividad nigroestriatal mediada por estimulación excesiva de neuronas, mientras que cambios subsecuentes representan las reacciones locales de las terminales nerviosas dopaminérgicas secundarias a la degeneración neural en el estriado (Foster y col., 1984).

Desde hace tiempo se ha establecido que la acción excitotóxica del QUIN en estriado está mediada por los receptores tipo NMDA, y su acción es antagonizada por magnesio y aminofosfonatos. La estimulación del receptor NMDA por QUIN en estriado de rata produce desórdenes metabólicos diversos: inicialmente, la apertura de canales de Ca^{2+} (Stone, 1993), reducción del consumo de O_2 mitocondrial, disminución de los niveles de ATP y NAD, así como de las concentraciones de aspartato y glutamato (Bordelon y col., 1997), inducen peroxidación lipídica que puede ser prevenida parcialmente por antagonistas NMDA y selenito de sodio (Rodríguez-Martínez y col., 2000; Santamaría y col., 2001a; Santamaría y col., 2003). Además, reproduce el patrón de la pérdida de células neuronales característica de la HD (Bordelon y col., 1997; el-Defrawy y col., 1986). Hay también una reducción de la actividad de la glutatión reductasa, observada en experimentos en ratas, que sugiere una causa o factor de contribución al déficit observado en la disponibilidad del glutatión inducida por QUIN (Aguado y col., 2000).



Al unirse el ác. Quinolínico (Q) a receptores NMDA, en gris (que tienen la función de canal para calcio y sodio) permite la apertura del canal para calcio y sodio, si esta acción es sostenida o involucra gran cantidad de receptores, lo que podría suceder con altas concentraciones de Q, la célula entonces puede activar mecanismos de muerte inducidos por el estrés.

Los iones metálicos, en especial el hierro (Fe), tienen un rol importante en la formación de radicales libres derivados de ROS, y teniendo entre otras consecuencias, la ruptura de la cadena de DNA (Barber, 1966; Vladimirov y col., 1980). Se ha observado que la inyección estriatal de QUIN acumula altas concentraciones de hierro en globo pálido y sustancia nigra parte reticulada, además la formación de radical hidroxilo incrementa de manera concentración dependiente con el QUIN (Stipek y col., 1997; Iwahashi y col., 1999). Esto quiere decir, que el QUIN además de activar canales NMDA, puede producir radicales hidroxilo por medio de una reacción similar a la de Fenton descrita por Haber y Weiss en 1934, de la siguiente manera:



2. MUERTE NEURONAL

Básicamente las células pueden morir por dos vías primarias: A) *necrosis*, proceso por el cual se induce una respuesta inflamatoria de las células vecinas por la liberación de proteasas y lisozimas por parte de los macrófagos vecinos, o B) *apoptosis*, proceso que conduce a las células a muerte silenciosa donde sus restos son simplemente fagocitados por las células vecinas.

La muerte celular por necrosis se observa en daños patológicos agudos como son la hipoxia, hipertermia, invasión viral, incluso en la exposición a algunas toxinas exógenas, así como por activación del complemento; se caracteriza por la falta de integridad de la membrana plasmática con la consiguiente pérdida de la homeostasis, hinchamiento y finalmente ruptura del cuerpo celular, permitiéndose que el contenido celular sea expuesto al medio extracelular, alterando así el ambiente en esa zona. En cambio, la apoptosis tiene una función bajo condiciones normales: es necesaria para el desarrollo tisular y homeostasis hematopoyética; para la eliminación del exceso de células durante la embriogénesis o de células atrofiadas que dejan de recibir las concentraciones adecuadas de factores de crecimiento o citocinas, o bien, para remover células que han sufrido daño por genotóxicos. Esto es, mientras que en la necrosis el final llega precipitada y abruptamente, durante la apoptosis llega a haber una orquestación "protocolaria" (Israels e Israels, 1999).

2.1. *Factor de inducción temprana*

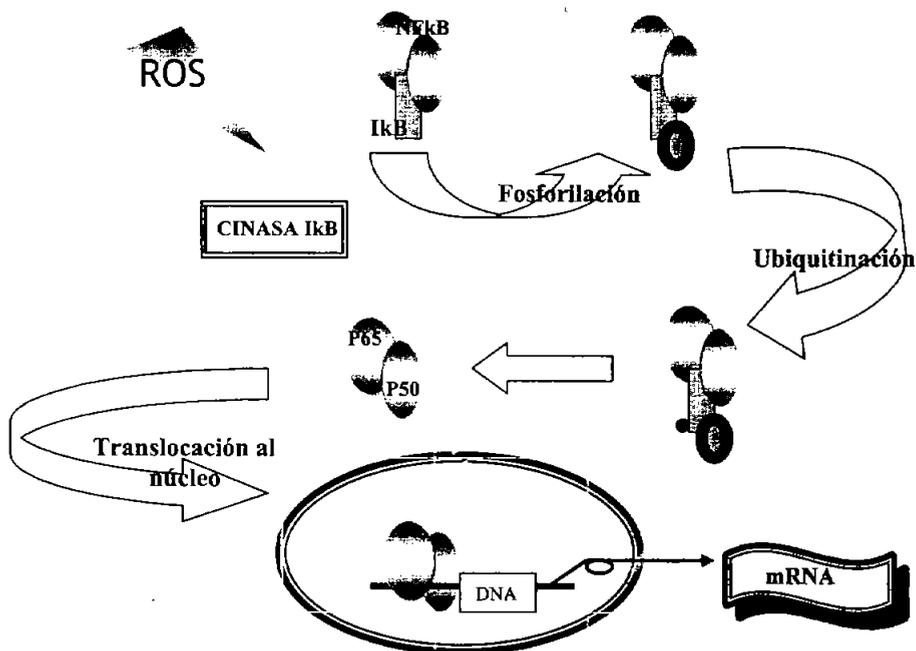
NF- κ B

NF- κ B (factor nuclear de inducción temprana) es un factor de transcripción inducible de respuesta rápida que se encuentra presente de forma constitutiva en muchos tipos celulares, tales como células B maduras, timocitos, macrófagos, glia y neuronas. En estas últimas participa en funciones del cerebro normales, y refleja un estado determinado de la actividad o diferenciación neuronal (Kaltschmidt y col., 1994). También está involucrado en reacciones de respuesta inflamatoria e inmune, y ejerce su efecto

expresando proteínas (citocinas, quimocinas, moléculas de adhesión, factores de crecimiento, inmunoreceptores y enzimas relacionadas con estrés oxidativo) como producto de varios genes inducibles que contienen sitios de enlace κ B en sus promotores (Lee y Burckart, 1998); también controla el ciclo y diferenciación celular, incluyendo el proceso de apoptosis (Baeuele y Baltimore, 1996). Las respuestas biológicas que son mediadas por este factor pueden ser controladas de manera directa o indirecta.

El prototipo y la forma predominante en cerebro de NF- κ B está basado en un heterodímero que consta de una subunidad p50 y de una p65 de la familia Rel A; las proteínas NF- κ B/Rel contienen un segmento conservado N-terminal llamado dominio de homología Rel, responsable del enlace al DNA, dimerización, traslocación nuclear e interacción con I κ B. El dominio de homología Rel contiene una señal de localización nuclear (NLS, por sus siglas en inglés) la cual facilita la traslocación de NF- κ B al núcleo. (Kaltschmidt y col. 1993; Lee y Burckart, 1998).

Las proteínas I κ B contienen de 5 a 7 repetidos conservados de anquirina esenciales como interfase para la interacción proteína-proteína con NF- κ B y así ocultar la señal de localización nuclear de éste, manteniéndolo en el citosol de forma inactiva. La activación de NF- κ B involucra la acción de la enzima I κ B-cinasa fosforilando a I κ B-a en el residuo N-terminal de serina de ésta proteína; una vez fosforilada, para que se lleve a cabo la disociación del complejo NF- κ B-I κ B- α , se requiere la ubiquitinación en múltiples sitios para producir formas de alto peso molecular y permitir la subsecuente degradación proteosomal de I κ B- κ , permitiendo la exposición de NLS en NF- κ B libre y su rápida traslocación al núcleo a través de los poros nucleares acompañada posiblemente de una proteína de choque térmico como chaperona. Finalmente, se lleva a cabo la transcripción de los genes que responden al enlace de los motifs κ B del factor (Lee y Burckart, 1998).



Pasos de activación de NFκB. Posiblemente la activación de NFκB es a través de especies reactivas de oxígeno (ROS) que activan a la IκB-cinasa, la cual rápidamente fosforila a IκB y luego de su ubiquitinación es degradada, dejando expuesto el dominio de señalización hacia el núcleo de NFκB permitiéndose su traslocación, donde se unirá al motif Rel del gen blanco para iniciar su transcripción.

Una amplia variedad de estímulos extracelulares convergen en la fosforilación de IκB-α, y el estado oxidativo de la célula ha mostrado influencia en la activación de NF-κB. Así muy posiblemente las especies reactivas del oxígeno influyen en la actividad de las tirosin-cinasas que actúan sobre IκB-α (Lee y Burckart, 1998). En la respuesta excitotóxica mediada por agonistas de los receptores NMDA de neuronas estriales se involucra la traslocación, desde citosol al núcleo, del NF-κB, posterior a la degradación de la molécula IκB-α, esta degradación puede ser inducida por el AQ, además de que la administración

estriatal de QUIN altera significativamente la actividad enlazante de: AP-1, NF- κ B, E2F-1 y OCT-2 (Nakai y col. 2000; Quin y col. 1998).

Se ha demostrado que las actividades transcripcionales de AP-1 y NF- κ B dependen del estado redox para su enlace a DNA; el selenito muestra inhibición en el enlace de AP-1 al DNA, involucrando posiblemente interacción del selenito entre residuos de cisteína de Fos y Jun. También se observa una inhibición en cultivos celulares del enlace a DNA del factor NF- κ B por selenito y disminuye la producción de óxido nítrico por la inhibición del enlace en la región promotora del gen de la óxido nítrico sintasa inducible (Kim y Stadtman, 1997)

3. SELENIO

3.1. *Generalidades* _____

El Selenio se considera un elemento traza esencial de la dieta humana (Schwarz y Foltz, 1957), y un cofactor en procesos enzimáticos. Descubierta en 1817 por Berzelius, es un elemento del grupo VI en la tabla periódica. Es requerido para la producción de la hormona tiroidea activa, quimioprevención de cáncer, y modulación del sistema inmune, y parece ser un nutriente clave contra el desarrollo de la virulencia e inhibición de la progresión de VIH-SIDA (Rayman, 2000; Baum y col., 1997).

Como calcógeno típico, comparte muchas propiedades con su vecino el azufre. Sus estados de oxidación -2, 0, +2, +4, y +6, implican que es propenso a liberar o aceptar pares electrónicos. No se conocen compuestos de selenio con electrones desapareados (como por ejemplo, radicales estables de selenio).

Estados de oxidación del selenio

<i>Estructura química</i>	<i>Estado de oxidación</i>	<i>Nombre del ácido</i>	<i>Nombre de la sal</i>
H ₂ Se	-II	Selenuro de hidrógeno	Selenuro
R-SeH	-II	Selenol	
Se	0	Ac. selénico	
R-Se-OH	0	Ac. selenínico	Selenato
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{R-Se-OH} \end{array}$	+II	Ac. selenínico	Seleninato
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{HO-Se-OH} \end{array}$	+IV	Ac. selenioso	Selenito
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{HO-Se-OH} \\ \\ \text{O} \end{array}$	+VI	Ac. selénico	Selenato

(Brigelius-Flohe y cols, 2000).

La deficiencia de selenio produce una sensibilidad al H₂O₂, asociada con la disminución en la actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GPx) (Rotruck y col.,1972; 1973). Específicamente se ha observado una disminución en la actividad de GPx en estriado y sustancia nigra de animales en dietas deficientes de selenio (Castaño y col.,1993). Se ha establecido una relación estequiométrica de selenio en el contenido de GPx purificada (Flohé y col.,1973; Sang-Oh y cols. 2001; Awasthi y col.,1975). El selenio se ha encontrado en una gran cantidad de proteínas, la mayoría de las cuales son oxidoreductasas y cuatro son peroxidasas. La relevancia del elemento traza como defensa antioxidante biológica en mamíferos ha sido aceptada. Sin embargo, la sobreexposición a selenio a dosis farmacológicas en la administración de compuestos selenados está asociada con el fenómeno biológico que recuerda más bien al potencial prooxidante del elemento que a una defensa antioxidante biológica argumentada (Seko y Imura, 1997). Así, los efectos biológicos de los compuestos de selenio dependen de su naturaleza química y destino metabólico.

Mientras que el elemento selenio como tal no está biodisponible del todo, algunos otros compuestos de selenio sí pueden ser absorbidos. Así, compuestos orgánicos como selenometionina y selenocisteína son absorbidos por mecanismos de transporte compartidos con aminoácidos sulfurados correspondientes. La absorción del selenito (como sal sódica) ocurre por difusión pasiva, mientras que el selenato es atrapado por un transporte acarreador mediado por sodio (Venderland y col.,1994). El selenito es reducido a selenuro de hidrógeno (H_2Se) por una selenodiglutatión (GSSeSG) a través de la reducción mediante tioredoxina reductasas dependientes de NADPH y tioles; el H_2Se también se obtiene por liberación de selenocisteína por la acción de liasas. La rápida oxidación del selenuro de hidrógeno por oxígeno conduce más adelante a un consumo de NADPH por tioredoxina reductasa o glutatión reductasa para mantener las concentraciones de H_2Se . La asimilación de selenato parece depender de la reducción bacteriana a selenito para poder ser utilizado por el organismo mamífero. La selenometionina es el metabolito clave del metabolismo del selenio, Esta es la forma empleada para biosíntesis de selenoproteínas. El primer paso es la formación de selenofosfato de H_2Se y ATP por la selenofosfato sintetasa (Veres y col.,1994). (Seko y col.,1989; Seko y col.,1997; Hsieh y Ganther, 1977; Björnstedt y cols. 1996; Ganther, 1999).

En la biosíntesis de las selenoproteínas, el selenio es canalizado a algunas las selenoproteínas en forma preferencial; como consecuencia, algunas selenoproteínas responden rápidamente a la deficiencia de selenio con una baja en su actividad, otras permanecen estables en deficiencias moderadas y disminuyen únicamente después de una baja substancial y prolongada de este elemento. La pérdida de actividad de selenoproteínas en la restricción de selenio usualmente es acompañada por una baja retardada de mRNA. El impacto del selenio durante la biosíntesis de selenoproteínas es básicamente regulado por tres factores: la disponibilidad de tRNA^(serssec) cargado con selenocisteína, la eficiencia de la estructura secundaria característica en el mRNA (SECIS), y la posibilidad relacionada a la estabilidad del mRNA. Sin embargo, esto está abierto a la modulación por regulación transcripcional por estímulo externo, hormonas, factores de transcripción tejido-específicos o empleo preferencial del selenio por tejidos particulares (Brigelius y Flohé, 1999; Flohé y col.,1997).

In vivo, el selenito es el precursor más efectivo para la actividad de Gpx citoplásmica (Néve, 1995). Se ha demostrado en cultivos celulares, que el selenito fue el precursor más efectivo para la expresión de la GPx. En algunas líneas celulares, la selenometionina, a pesar de incrementar el contenido de selenio celular, no incrementa la actividad de Gpx (Beilstein y Whanger, 1987; Leist y col.,1999). En humanos, una dosis diaria de 1 µg de selenio biodisponible por kilogramo de peso corporal es sugerido como suficiente para cuidar la actividad óptima de GPx (Levander, 1991). Sin embargo, el rango establecido por la Food and Nutrition Board como ingesta diaria segura y adecuada en los Estados Unidos es de 50-200 µg/día.

El selenio, administrado en exceso, es metabolizado a dimetilselenuro, un agente neurotóxico, que puede inducir daño tisular oxidativo por autooxidación en el ciclo redox, así como otros disturbios metabólicos. Como constituyente de selenoperoxidasas, el selenio reduce H₂O₂ y otros hidroperóxidos, previniendo así la iniciación y/o propagación de cadenas de radicales libres dependientes de peróxido (Brigelius-Flohe y col.,2000).

Existen diversas isoenzimas de Gpx, entre las que se encuentra la W que se encuentra en músculo o la selenoproteína P, cuyos múltiples residuos selenocisteinil sugieren una capacidad de catálisis con función redox; sin embargo, su actividad enzimática aún no ha sido bien identificada. Se ha reportado que esta última puede actuar como GPx extracelular: remueve peroxinitrito *in vitro*, pero la regeneración de su forma reducida tampoco ha sido aclarada. Se especula que su papel es transportar y almacenar al selenio, prevenir la toxicidad del selenio y apoyar las defensas antioxidantes (Cárdenas y col., 2002), además de la tioredoxin reductasa y el hidroperóxido fosfolípido que contiene selenocisteína (Gantehar, 1999) se sabe que forman niveles altos de dimetil selenuro después de una dosis tóxica de selenuro. Parte del dimetil selenuro es excretado en el aliento, produciendo el olor característico del ajo debido al ácido gálico. Una gran porción del selenuro puede ser trimetilado y así excretado en orina (Spallholz, 1994).

3.1. Selenio como factor antiapoptótico y neuroprotector

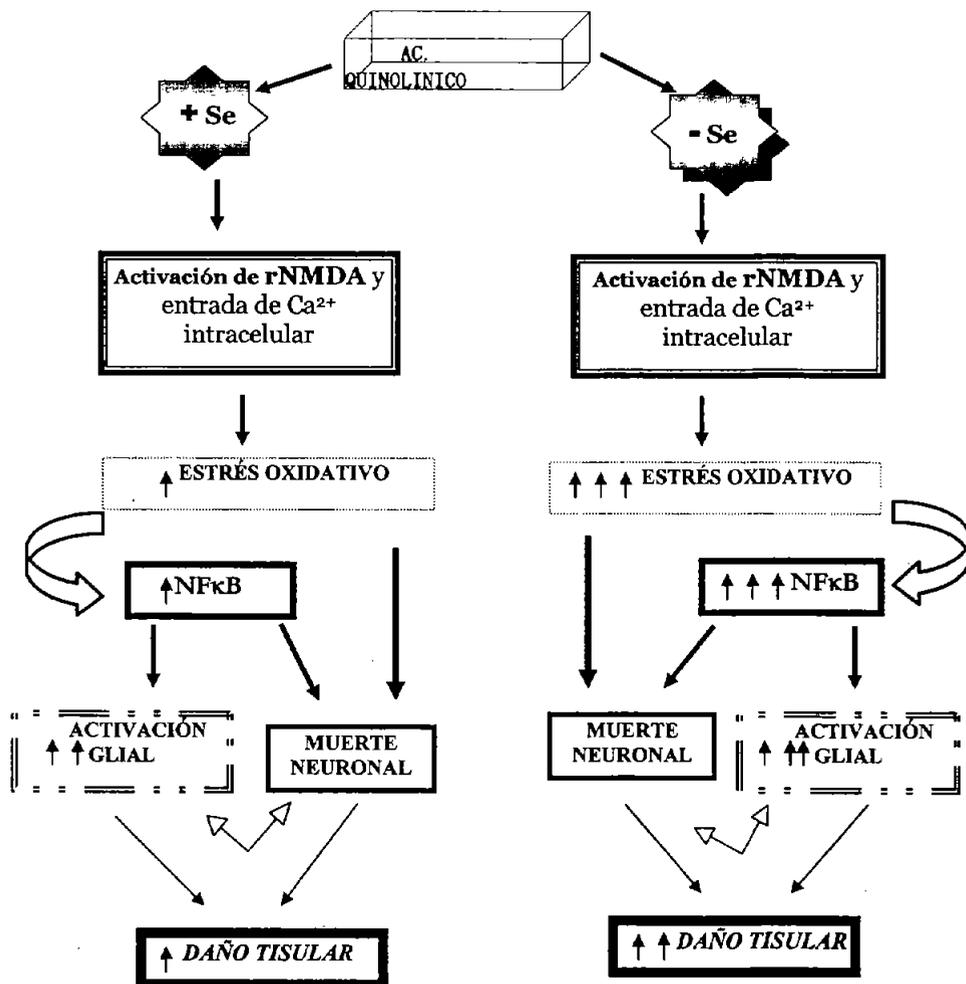


Se ha postulado al selenito como factor preventivo de apoptosis inducida por peróxido de hidrógeno *in vitro*, aunque la mayoría de los estudios enfocan a la GPx y la tioredoxina reductasa con esta propiedad. Sang-Oh y colaboradores (2001) postulan que el selenito bloquea la apoptosis inducida por H_2O_2 bloqueando a la molécula apoptótica ASK1 y estimulando la actividad del complejo antiapoptótico PI3-kinasa/Akt, además de bloquear la actividad de las caspasas -3 y -9. Sus observaciones demuestran que el selenito incrementa la proliferación celular y mantiene la supervivencia celular por activación de señales antiapoptóticas bloqueando las señales apoptóticas. También ha sido reportado que la selenoproteína P posee actividad antioxidante y capacidad para promover la supervivencia neuronal (Chen y Berry, 2003).

Respecto a la enzima tioredoxina reductasa, se sabe que contiene un residuo selenocisteil, el cual es esencial para la catálisis de esta enzima. Su mecanismo de acción involucra la transferencia del equivalente reducido NADPH por la coenzima FAD a un puente disulfuro cerca de la región amino terminal, y de este al sustrato disulfuro tioredoxina. Las tioredoxinas actúan como sustratos reductores para una variedad de enzimas como ribonucleótido reductasa, metioninsulfoxidoreductasa, 3'-fosfoadenosin5'-fosfosulfatoredoxina y peroxidasas tipo peroxiredoxina. Ellas regulan al parecer el estado redox de proteínas redox-sensibles y participan en la activación de factores de transcripción, en particular del NF- κ B. En contraste, la exposición a selenito en concentraciones micromolares pueden revocar la activación transcripcional de NF- κ B por interacción directa con los grupos -SH vecinos de la tioredoxina, lo cual es necesario para la reducción nuclear del factor de transcripción. Algunas proteínas antioxidantes han sido renombradas como peroxiredoxinas; así, identificadas entonces como tioredoxina peroxidasas, pueden competir con Gpx o catalasa por el sustrato hidroperóxido en común (Cárdenas y col., 2002).

De esta manera parece ser que el efecto protector del selenito no sólo es mediado por un efecto antioxidante, sino que involucra la síntesis de novo de proteínas, ya que si se inhibe la síntesis de proteínas, se abole la protección del selenio. Además, de inhibir la activación (luego de administrar glutamato) de NF- κ B, también lo hace con AP-1. Además la acción protectora del selenio no depende de los niveles de glutatión (cofactor de GPx) (Savaskan y col., 2002)

Reportes experimentales sugieren que hay un incremento dosis-dependiente en el contenido de lípidos totales (entre 0.1 y 0.2 mg/Kg) producido por selenito de sodio en estriado y tálamo de animales. Los resultados observados en el trabajo de Zia e Islam (2000) indican que el selenio podría incrementar los lípidos en la vaina de mielina, la cual es responsable de una transmisión nerviosa más rápida entre las neuronas. El selenio, por tanto, juega un papel importante en la protección de lípidos de membrana y, consistentemente, se ha demostrado que el abatimiento de la actividad de la GPx en estriado de animales obedece a deficiencias de selenio, conduciendo a la degeneración de neuronas dopaminérgicas y a la apoptosis (Savaskan y col.,2002).



El esquema resume la hipótesis del efecto del selenio en estriado de rata antes del insulto con QUIN. La no administración de selenio antes del QUIN (lado derecho de la figura) permite un estrés oxidativo incrementado con la subsiguiente activación de NF-κB y muerte neuronal, eventos que se observan en menor proporción cuando se administra el selenio con anterioridad (lado izquierdo de la figura).

 III PLANTEAMIENTO INTEGRAL
DEL PROBLEMA

En los trastornos neurodegenerativos, como la enfermedad de Huntington, se encuentran involucrados mecanismos apoptóticos inducidos por excitotoxicidad. La iniciación de la cascada apoptótica parece estar mediada por la estimulación de receptores glutamatergicos tipo NMDA; este tipo de receptores pueden ser estimulados por agonistas NMDA, así como el ácido quinolínico (QUIN). Y del mismo modo, algunos estudios establecen que la degeneración de neuronas estriatales inducida por QUIN involucra apoptosis (Qin y col., 1996). En la cascada de eventos de iniciación apoptótica también está involucrada la liberación de citocinas inflamatorias, elevación de $[Ca^{2+}]$ intracelular y la producción de estrés oxidativo (Qin y col., 1996).

Por otro lado, en la respuesta excitotóxica mediada por agonistas de los receptores NMDA de neuronas estriatales se involucra la traslocación, desde citosol al núcleo, del factor nuclear de transcripción-kappa B (NF- κ B), esto parece estar mediado por diferentes mecanismos moleculares (Nakai y col., 2000). Es conocido que la producción de los intermediarios reactivos del oxígeno, preceden el incremento de la actividad de la Ik-cinasa (IKK), enzima que fosforila a la molécula I κ B, como un paso anterior a la degradación de esta última (Qin y col., 1996). Se ha visto en cultivos celulares que la inhibición de NF- κ B puede ocurrir mediante una variedad de antioxidantes y enzimas antioxidantes. La sobre expresión de la selenoenzima glutatión peroxidasa, anula la activación del factor nuclear- κ B inducida por TNF (factor de necrosis tumoral) y H₂O₂ (Kretz-Remy y col., 1996; Li y Karin, 1999). Nosotros hemos visto que en este modelo neurotóxico, in vivo, se incrementa

la actividad de Gpx con el selenito de sodio, además de preservar histológicamente el cuerpo estriado (Santamaría y col., 2003). Ahora correlacionamos el mecanismo por el cual el QUIN ejerce su toxicidad temprana, ayudándonos del efecto del selenio a nivel molecular en estriado de rata, esperando que se inhiba la fosforilación de la proteína I κ B- α y de este modo la preservación histológica antes observada sea por la inhibición de la fragmentación de DNA que pudiera estar mediada por la activación del factor nuclear NF- κ B. Todo realizado *in vivo*.

 IV 

HIPOTESIS

Dado el ampliamente reportado patrón de daño neuronal ejercido por el QUIN en el SNC, y las implicaciones, que el efecto de esta toxina tiene sobre la evocación de eventos pro-apoptóticos en el estriado de animales lesionados a través de la activación de factores de transcripción que generan señales apoptóticas. Nosotros sugerimos que el selenio a través de la GPx , creará un ambiente reductor en animales lesionados estriatalmente con QUIN e impedirá la degradación de I κ B- α , la traslocación nuclear y activación de NF- κ B así como la fragmentación de DNA en el estriado de ratas.



OBJETIVOS

GENERAL

Caracterizar el efecto del selenio sobre las alteraciones moleculares producidas por el QUIN en el cuerpo estriado de rata que involucren eventos de señalización proapoptótica a través de la translocación nuclear y activación neuronal del factor de transcripción NF- κ B.

PARTICULARES

- Evaluar la presencia de la proteína I κ B- α citosólica en neuronas estriatales de animales lesionados con QUIN y pretratadas con selenio, como marcador de activación de NF- κ B por medio de un análisis inmunohistoquímico y por electroforesis unidimensional en gel (western blot).
- Evaluar la presencia del factor NF- κ B en núcleo de células neuronales de animales lesionados con QUIN y pretratadas con selenio, como confirmación de su traslocación y desenlace de I κ B- α , realizando un análisis inmunohistoquímico.
- Evaluar el efecto de la activación de NF- κ B en la fragmentación de DNA en tejido estriatal de animales sesionados con QUIN y pretratados con selenio como marcador de apoptosis, por medio de un análisis de escalera en gel.



MATERIAL Y METODOLOGIA

6.1. Animales y Reactivos

Se emplearon ratas Wistar machos (250-300 g), las cuales fueron obtenidas del Bioterio del I.N.N.N. Los animales fueron ubicados en cajas de acrílico (5 por caja), con disponibilidad de agua y alimento *ad libitum*, y bajo condiciones constantes de luz (ciclos de 12:12 hrs. luz:obscuridad), temperatura ($25 \pm 3^\circ\text{C}$) y humedad.

Las soluciones se prepararon con agua desionizada. El QUIN y el selenito de sodio se obtuvieron de Sigma Chemical Co. Los anticuerpos primarios fueron de Santa Cruz, los secundarios de DAKO y el kit (Aquapure genomic DNA kit) para escalera de BIORAD. Los marcadores de peso molecular para proteína y DNA fueron de BIORAD.

6.1.1. PRETRATAMIENTO CON SELENIO

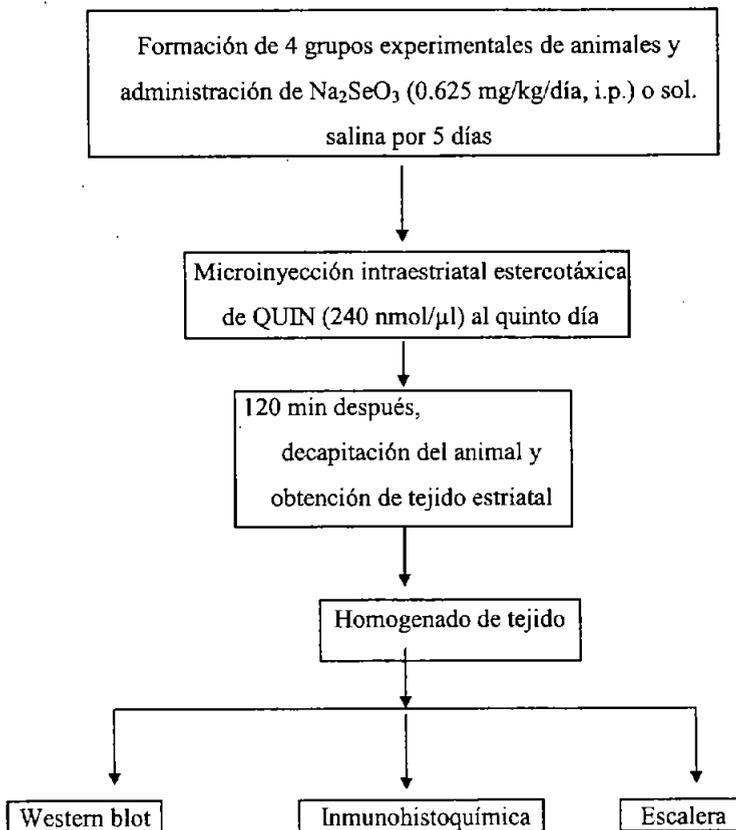
E INYECCIÓN INTRAESTRIATAL DE QUIN

Se diseñaron 4 grupos experimentales: 1) solución salina (S.S.) intraperitoneal (i.p.) + S.S. intraestriatal (i.e.); 2) Na_2SeO_3 (i.p.) + S.S. (i.e.); 3) S.S. (i.p.) + QUIN (i.e.); 4) Na_2SeO_3 (i.p.) + QUIN (i.e.). La solución administrada por vía intraperitoneal, según el grupo, fue inyectada durante cinco días, una vez al día, sin interrupción. La concentración de selenito de sodio administrada fue de 0.625 mg/kg de peso del animal. Al quinto día de administración de Na_2SeO_3 y 120 minutos después de la última inyección i.p., las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (0.2 ml/250 g de peso) y microinyectadas unilateral y estereotáxicamente (coordenadas de acuerdo al Atlas estereotáxico de cerebro de

rata de Paxinos y Watson, 1894) en el estriado derecho (caudado/putamen) con S.S. (pH 7.4) ó QUIN (240 nmol/ μ l, pH 7.4), según el grupo de tratamiento. La infusión en estriado se realizó en un lapso de 2 min. y se mantuvo la aguja en la zona de lesión por 2 min. más para permitir la adecuada difusión de la solución inyectada.

6.2. TECNICAS

Diagrama de flujo del diseño experimental



6.2.1. INMUNOHISTOQUIMICA

A) En grupos independientes tratados bajo los mismos esquemas, 120 minutos después de la inyección intraestriatal de QUIN, las ratas fueron anestesiadas con cloroformo por inhalación, y perfundidas transcárdialmente (con una administración directa intracardial de heparina de 0.2 ml en suero fisiológico (NaCl 0.9 %) seguida por una solución al 10 % de formaldehído también en suero.

B) Posteriormente, se extrajo el cuerpo estriado y se mantuvo en formol al 10 % para la fijación del tejido hasta su inclusión en parafina.

C) Para realizar la inclusión en parafina, el tejido fue deshidratado gradualmente, sumergiéndolo en cada etapa durante una hora, iniciando con un lavado en agua que continuó con la deshidratación progresiva en alcoholes al 60 %, 70 %, 80 % y alcohol absoluto. Se pasaron las muestras a xilol al 50 % y se continuó con xilol sin diluir, finalmente sumergiéndose en parafina líquida. Todas las etapas se realizaron por duplicado.

D) Los estriados ya incluidos en parafina, se seccionaron en un microtomo en secciones de 5 μ m de espesor. Obtenida la rebanada, se coloca en un baño de flotación (agua con gretina) a una temperatura de 40-45°C y se toma con el portaobjetos.

E) Se deja secar cada placa

F) Para desparafinar los tejidos se introducen en una estufa a 60-70°C durante 30-45 min.

G) Se inicia entonces el proceso de fijación de tejido:

xilol 100%-----15'

xilol 100%-----15'

OH-xilol (1:1)-----3'

EtOH 100%-----3'

EtOH 100%-----3'

EtOH 96%-----3'

EtOH 70%-----3'

H) Sumergir en agua para enjuagar.

I) Poner a hervir en solución target retrieval 10X de DAKO durante 30-40 min para exposición de epitopes y permeabilización de membrana.

J) Enjuagar con agua 3 veces y colocar en PBS 12X durante 5 min.

K) Sobre una cama húmeda: bloquear con peróxido de hidrógeno 3%, 10 min y enjuagar durante 5 min con PBS.

M) Bloquear con suero Vectastain durante 10 min.

N) Agregar 1er. anticuerpo 1:50 en PBS, 30min y lavar con PBS, 5min.

Ñ) Agregar 2o. anticuerpo (Px-HRP de DAKO) durante 15 min. y lavar con PBS, 5 min.

O) Adicionar estreptovidina durante 15 min. lavar con PBS, 5 min.

P) Para revelado adicionar DAB (diaminobencidina), 5 min. lavar con PBS, 5 min.

Q) Sumergir en hematoxilina durante 5 min y enjuagar

R) Pasar por las soluciones de fijación (paso G) en orden inverso.

Finalmente, se fijan con resina o bálamo.

6.2.2. WESTERN BLOT

A) Lisados con 50 µg de proteína fueron mezclados con buffer de muestra 2X (125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 20% glicerol, 4% SDS, 0.02% azul de bromofenol, 10% 2-mercaptoetanol) en proporción 1:1.

B) Hervidos durante 5 min.

C) Fueron refrigerados hasta el análisis.

D) Las muestras fueron sometidas a electroforesis en un gel SDA-PAGE 10%.

E) Se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa durante 2 hr a 70V en Buffer Tris-HCl 25 mM, pH 8.0, 195 mM glicina, 10% metanol.

F) Al finalizar el tiempo de transferencia, la membrana se bloqueo con leche 5% en PBS 1X durante 1h.

G) Se adiciona el primer anticuerpo durante 24 h a 4°C. Lavar en PBS.

H) Incubar con el 2o. anticuerpo (PX-HRP) durante 1 h a temperatura ambiente. Lavar 3 veces con PBS.

I) Para la reacción quimioluminisciente se empleo el kit ECL (Santa Cruz, INC).

J) El blot fue expuesto a una película Kodak XAR-5 durante 10 min y revelado.

6.2.3. ESCALERA

(FRAGMENTACIÓN DE DNA)

- A) Agregar solución de lisis DNA genómico y homogenar la muestra.
- B) Agregar solución de proteinasa K, incubar toda la noche a 55°C.
- C) Adicionar solución RNAsa A, incubar 45 min a 65°C.
- D) Enfriar a temperatura ambiente.
- E) Adicionar buffer de precipitación al lisado, centrifugar a 13,000-16,000Xg durante 3 min.
- F) Al sobrenadante que contiene el ADN, agregar (2-porpaOH) isopropanol al 100%, centrifugar a 13,000-16,000 Xg durante 1 min.
- G) Decantar y adicionar etanol al 70% para lavar el pelet de ADN, centrifugar a 13,000-16,000 Xg durante 1 min.
- H) Dejar secar el pelet.
- I) Adicionar buffer de hidratación e incubar durante 1 hr a 65°C.
- J) Analizar por electroforesis en gel de agarosa 1%.
- K) Teñir con Bromuro de etidio para revelado, como se describe en el kit Quantum Prep^R AquaPure Genomi DNA (BioRad).

VII

RESULTADOS

7.1. DEGRADACION DE IKB- α

La prueba inmunohistoquímica que se muestra en la figura 1a, se analizó en base al criterio de inmunoreactividad representada por la tinción en color café que presenta la peroxidasa unida al anticuerpo IkB- α , y que se observa en el citosol alrededor del núcleo teñido con hematoxilina, de las células del tejido estriatal. La figura 1b muestra una disminución significativa en la presencia de la proteína IkB- α en citosol del grupo de animales administrado con QUIN con respecto a los valores de los animales control; esto es, la proteína se observa disminuida un 32 % en este grupo, mientras que el grupo con Se+QUIN muestra una preservación significativa de IkB- α de 21% con respecto al grupo con QUIN.

La evaluación por western blot de la proteína IkB- α se muestra en la figura 1c. Las bandas muestran una clara diferencia entre los grupos de QUIN con respecto al control, así como el grupo Se+QUIN con respecto al de QUIN; éstas observaciones son esquematizadas con los valores densitométricos (en la fig. 1d) que arrojan diferencias significativas hasta del 68% en el grupo QUIN vs control, así como una recuperación de 31% con respecto al grupo QUIN.

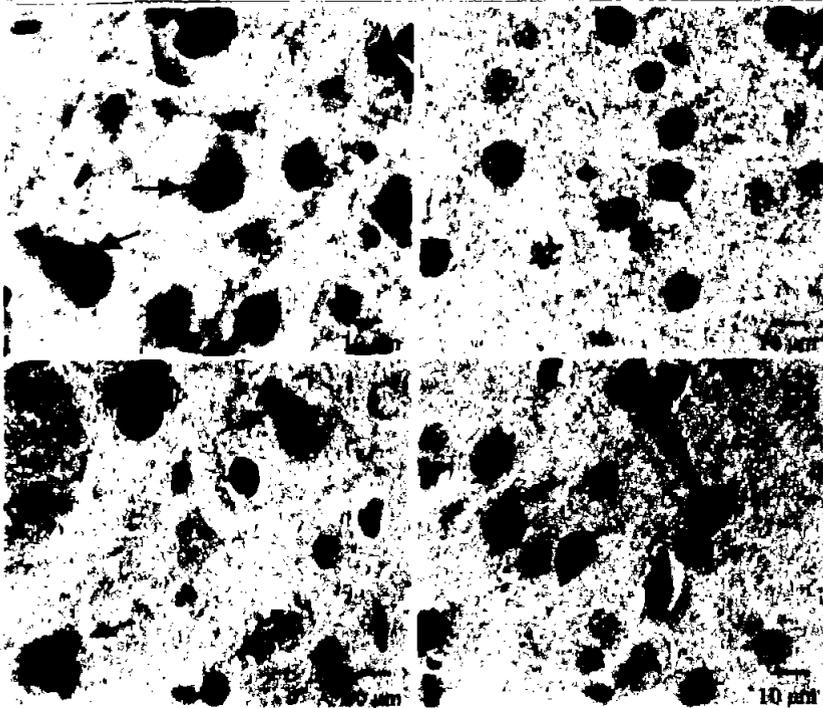


Figura 1a. A y C) Tejido estriatal de grupos control y selenito de sodio respectivamente, en los que se observa el citosol al rededor de los núcleos, mostrando inmunoreactividad a I κ B- α ; en cambio en B) el grupo con QUIN no muestra citosol inmunoreactivo, solo se observan los núcleos. D) muestra el grupo de QUIN+Selenito de sodio y algunos cuerpos celulares no muestran inmunoreactividad en citosol, otros lo muestran más tenue que en los grupos A y C, pero se hace evidente una inmunoreactividad a I κ B- α intermedia entre los grupos A y B.

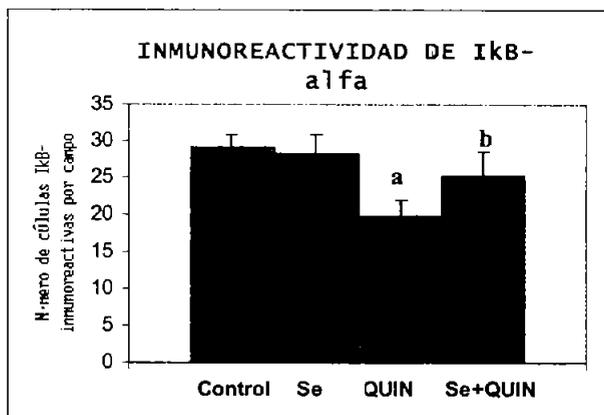


Fig. 1b. Analizada por varianza simple y Tukey muestran una diferencia significativa en la presencia de la proteína. Donde a= $P > 0.05$ vs control y b= $P > 0.05$ vs Quin

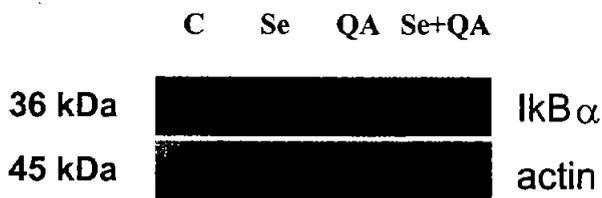


Figura 1c. Bandas de IκB- α y actina en estriado de rata, donde C=control, Se=selenito de sodio, QA=ác. quilínico, Se+QA= selenito de sodio más ác. Quinolínico.

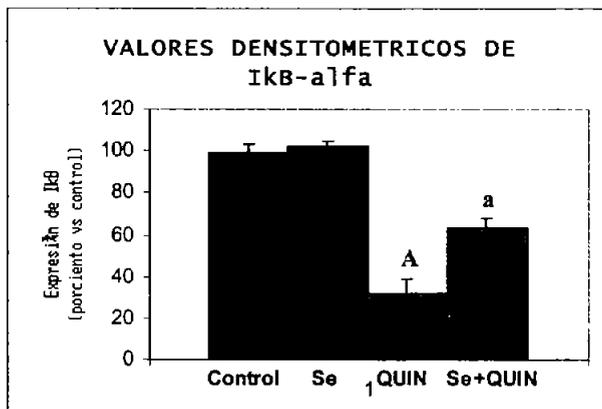


Figura 1d. Densitometría de las bandas obtenidas por wester blot de la proteína IκB-α en estriado de rata, donde A= $P > 0.01$ vs control y a= $P > 0.05$ vs control. Análisis estadístico por varianza simple y prueba de Tukey.

7.2. SUBUNIDAD P65 DEL FACTOR NFκB

La presencia nuclear del factor NF-κB se analizó por la evaluación inmunohistoquímica de su subunidad p65, donde el criterio de inmunoreactividad es la tinción en color café que presenta la peroxidasa unida al anticuerpo p65, y que se observa en el núcleo. La figura 2a muestra estos valores.

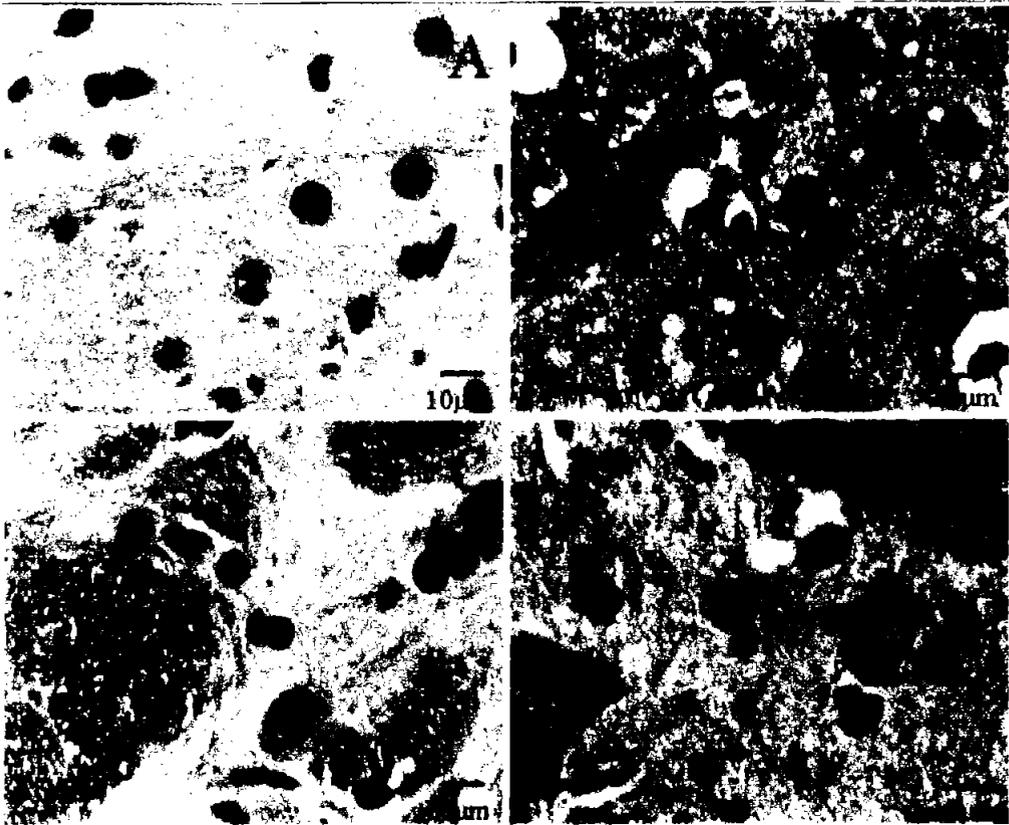


Figura 2a. A y C son grupos control y selenito de sodio, respectivamente; ninguno muestra inmunoreactividad el núcleo. B) el grupo del QIIN muestra algunos núcleos cafés que indican la presencia de la subunidad p65. D) representa el grupo de QIIN+selenito de sodio y muestra tinción moderada en algunos núcleos, mostrando una menor expresión de p65 en comparación al cuadro B.

Los valores obtenidos por conteo de células inmunoreactivas se muestra en la figura 2b, donde se observa un incremento significativo de cinco veces la inmunoreactividad en el grupo de QUIN con respecto al control. En cuanto al grupo Se+QUIN se abate este incremento alrededor de cuatro veces.

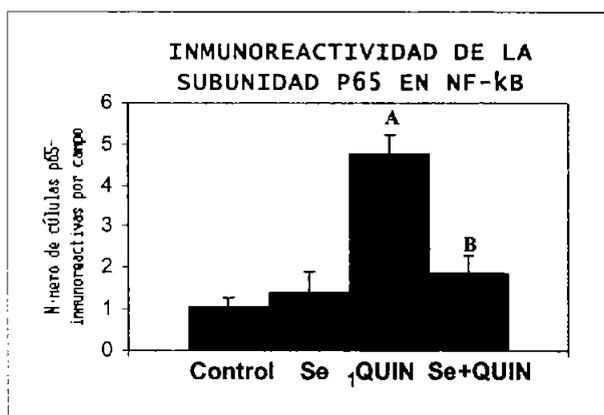


Figura 2b. Se muestra una diferencia significativa en la presencia de la proteína p65 con ácido Quinolínico. Análisis por varianza simple y prueba de Tukey. Donde A= $P > 0.01$ vs control y B= $P > 0.01$ vs Quin.

7.3. DEGRADACION DE DNA

EL daño a DNA lo observamos por un patrón de escalera que muestra su fragmentación y es observado en un gel de agarosa expuesto a electroforesis (fig.3a). Como observamos en la fotografía, es evidente el grado de fragmentación que se produce en el grupo de QUIN, así como la protección de este fenómeno en el grupo tratado con Se+QUIN, evidenciado por la intensidad y número de bandas.

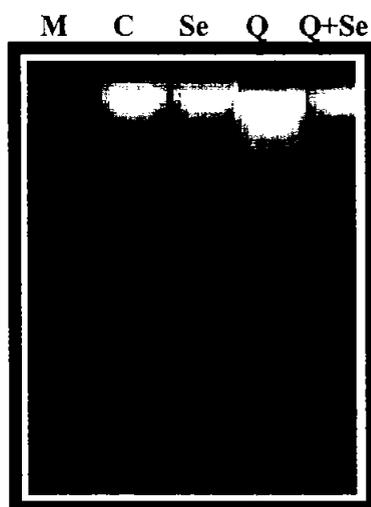


Figura 3a. Fotografía de electroforesis de ADN, donde las bandas indican fragmentos de ADN, en orden decreciente de arriba hacia abajo en cuanto a tamaño. Donde:

- M = marcadores de peso molecular de ADN
- C = grupo control
- Se = grupo administrado con selenito de sodio
- Q = grupo con ácido quinolínico
- Q+Se= grupo de ác. quinolínico pretratado con selenio

VIII

DISCUSION

El ácido quinolínico, conocido agonista glutamatérgico, es ampliamente utilizado como modelo de neurotoxicidad por su capacidad de acción oxidante independiente de la activación de receptores NMDA, además de estar involucrado en procesos inflamatorios (Behan y col., 1999; Cabrera y col., 2000; Rodríguez y col., 2000; Santamaría y col., 2001a). Se le ha administrado en diferentes dosis y evaluado a tiempos prolongados de días luego de su administración. La formación de especies reactivas de oxígeno, entre las que predomina el radical hidroxilo, luego de una administración aguda de QUIN (Santamaría y col., 2001a; Santamaría y col., 2001 b), evidencia la acción independiente del QUIN de los receptores, ya que el tiempo de seguimiento de este proceso fue no mayor a 2 hr, observándose un pico pronunciado de hidroxilo que hace pensar que el QUIN, bajo una reacción tipo Fenton involucrando hierro, induce la producción de radical hidroxilo, entonces el proceso mediado por rNMDA debe involucrar un poco de tiempo entre activación, apertura de canal y cascada de eventos que finalmente producirán especies reactivas, las cuales pueden llegar a inducir un estrés oxidativo que conducirá la muerte a células neuronales.

La sobreproducción de especies reactivas puede desencadenar eventos que activaran señales tanto apoptóticas como antiapoptóticas en las células expuestas a estrés oxidativo. Así, el H_2O_2 , una especie reactiva del oxígeno, es capaz de inducir apoptosis mediante la activación de una MAP cinasa-cinasa-cinasa conocida como ASK1 y que parece ser uno de los pivotes de la muerte celular inducida por estrés oxidativo; además la activación de NF- κ B también es inducida por H_2O_2 . Este factor nuclear, además de involucrarse en procesos inflamatorios, puede tener una función apoptótica (Yoon y col., 2001; Li y Karin, 1999). La muerte celular puede llegar a ser la sumatoria de una variedad de eventos a nivel molecular, que en el caso del QUIN aún hay que identificar dentro de su proceso neurotóxico en el cual por ahora vemos que involucra la traslocación nuclear del factor NF- κ B en estriado de rata. Los promotores a los cuales se enlace NF- κ B bajo este impulso oxidativo, aún no es claro,

tiene la capacidad de inducir tanto proteínas antiapoptóticas como apoptóticas; finalmente el resultado es el daño a nivel de DNA tan severo en cuanto a su fragmentación que difícilmente se puede pensar que pueda haber el grado de reparación suficiente. Con la administración de selenito de sodio, ésta fragmentación de DNA se evita de manera decisiva, pues como se ha visto, morfológicamente a nivel estriatal, las estructuras celulares se preservan con la administración previa de selenio antes del insulto con QUIN (Santamaría y col., 2003).

Nosotros hemos trabajado anteriormente con el modelo de QUIN, evaluando su efecto en presencia de selenito de sodio como protector parcial al insulto oxidativo (Santamaría y col., 2003) y observamos el efecto benéfico del selenio en los diferentes marcadores evaluados, como en el contenido de GABA, la peroxidación lipídica, la actividad de Gpx, alteraciones morfológicas y su correspondiente radio de daño neuronal, además de la conducta de rotación característica de éste modelo neurotóxico en ratas.

Se sabe que el glutamato y el QUIN activan a las proteínas AP-1 y NF- κ B, a partir de 12 hrs luego de su infusión (Qin y col., 1998). Nosotros evidenciamos que desde las 2 hrs de su infusión ya hay activación de NF- κ B y que a este tiempo el efecto puede evitarse en estriado por una administración de selenito de sodio adicional a la ingerida en el alimento, que por inducir la sobreactivación de Gpx puede aportar un rol importante de protección en la muerte neuronal que involucra la fragmentación de DNA. En otros tipos celulares se ha visto la relación que tiene la deficiencia de selenio con variaciones dramáticas en los niveles de ROS que modulan la actividad de NF- κ B como segundos mensajeros, además de que la activación mediada por TNF (factor de necrosis tumoral) de NF- κ B puede ser abolida por la sobreexpresión de Gpx (Kretz-Remy y col., 1996). Además, observamos que el efecto de la activación de NF- κ B por QUIN presenta una marcada degradación de la proteína inhibidora I κ B- α . I κ B- α es importante para mantener a NF- κ B en el citosol de manera silenciosa o inactiva, sin ser necesaria su intervención en el núcleo luego de administrar QUIN, siempre y cuando se haya administrado selenito de sodio con anterioridad.

El selenio puede estimular proteínas antiapoptóticas como Bcl2, Akt, e incluso evita el abatimiento de ATP (Yoon y col., 2002), lo que hace plantear que la acción del selenio

no sólo es mediada dentro de las selenoproteínas antioxidantes; su similitud con el átomo de azufre puede que le confiera la oportunidad de actuar a otros niveles moleculares.

Este trabajo es la continuación lógica de nuestros resultados obtenidos en el 2003 (Santamaría y col.) que proporcionaron evidencia de la acción protectora del selenito de sodio involucrada en la neuroquímica del modelo con QUIN. Con nuestros actuales resultados ampliamos la evidencia de protección del selenio en el modelo neurotóxico evocado por QUIN observada a nivel molecular proporcionando una ventana de conocimiento del modo de acción del antioxidante y la neurotoxina conocida como en el sistema nervioso.

Se requieren, sin embargo, estudios más detallados y profundos a nivel molecular y de expresión génica para los mecanismos involucrados en los procesos de daño y neuroprotección en el presente modelo.

IX

CONCLUSIONES

Con los antecedentes que nuestro grupo ha obtenido anteriormente (Santamaría y col., 2003), y que sugieren que el empleo de selenio como pretratamiento antes del insulto tóxico con QUIN, el selenio se constituye como un reto farmacológico interesante. Ahora, en este trabajo, presentamos evidencias a nivel molecular de la acción del selenio encaminado como factor antiapoptótico, considerando la interacción del estrés oxidativo que genera el modelo de QUIN con la activación del factor NF- κ B y su posible actuación apoptótica al observar la fragmentación de DNA.

Puntualizando los hallazgos del presente trabajo, se tiene lo siguiente:

- ✓ El ácido quinolínico como potente neurotoxina a las 2 hrs de su administración, induce la ruptura del enlace entre las proteínas I κ B- α :NF κ B, evidenciada por la ausencia de la proteína I κ B- α en citosol.
- ✓ El selenito de sodio administrado cinco días antes del insulto de la neurotoxina impide parcialmente la degradación de I κ B- α que es inmediata a la ruptura del enlace I κ B- α -NF κ B en citosol.
- ✓ Al ser degradada la proteína I κ B- α en citosol por la administración de QUIN a una concentración de 240 nM, el factor nuclear κ B se trasloca al núcleo.
- ✓ El selenito de sodio es capaz de disminuir la probabilidad de que el factor NF κ B llegue a núcleo y de éste modo pueda encontrar sitios de enlace κ B en promotores de proteínas proapoptóticas.
- ✓ El QUIN en estriado de rata es capaz de promover la fragmentación de DNA de manera acentuada.
- ✓ El selenito de sodio previene el patrón de escalera del DNA que el QUIN es capaz de inducir a los 120 min de su inyección.

Los hallazgos del presente estudio sustentan un papel neuroprotector del selenio en el modelo neurotóxico evocado por QUIN en cuerpo estriado de rata, a través de mecanismos moleculares de señalización antiapoptótica. Finalmente se remarca el amplio horizonte que aún queda por dilucidar en este modelo, puesto que el estrés oxidativo puede activar diversas vías de muerte celular, y con la ayuda de herramientas como lo ha sido el selenito de sodio podemos conocer más mecanismos de acción del QUIN.



BIBLIOGRAFIA

Aguado CR, Francis TL, Díaz CM, Antunez I. (2000) Quinolinic acid lesion induces changes in rat striatal glutathione metabolism. *Neurochem. Internationa.*, 37: 53-60.

Awasthi YC, Beutler E, Srivastava SK. (1975) Purification and properties of human erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Biol. Chem.* 250, 5144-5149.

Baeuerle PA, and Baltimore D. (1996) NF- κ B: ten years after. *Cell* 87: 13-20.

Baun MK, Shor-Posner G, Lai S, Zhang G, Lai H, Fletcher MA, Sauberlich H, Page JB. (1997) High risk of HIV-related mortality is associated with selenium deficiency. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* 15 : 370-74.

Barber R, Noble M. (1966) Binding of alkali metal ions to polynucleotides. *Biochem. Biophys. Acta.* 123(1) : 205-7.

Beal M, Flint, Kowall NE, Ellison DW, Mazurek M.F, Swartz KJ, Martin JB. (1986) Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. *Nature.* 321, 168-171.

Behan WMH, McDonald M, Darlinton LG, Stone TW. (1999) Oxidative stress as a mechanism for quinolinic acid-induced hippocampal damage: protection by melatonin and deprenyl. *Br. J. Pharmacol.* 128, 1754-1760.

Beilstein MA, and Whanger PD. (1987) Metabolism of selenomethionine and effects of interacting compounds by mammalian cells in culture. *J. Inorg. Biochem.* 29, 137-152.

Björnstedt M, Odlander B, Kuprin S, Claesson H-E, Holmgren A. (1996) Selenite incubated with NADPH and mammalian thioredoxin reductase yields selenide, which inhibits lipoxygenase and changes the electron spin resonance spectrum of the active site iron. *Biochemistry.* 35, 8511-8516.

Bordelon YM, Chesselet M-F, Nelson D, Welsh F, Erecinska M. (1997) Energetic Dysfunction in quinolinic acid-lesioned rat striatum. *J. Neurochem.* 69 (4), 1629-1639.

Brigelius-Flohé R. (1999) Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radical Biol. Med.* 27, 951-965.

Bugiani O, Tabaton M, Cammarata S. (1984) Huntington Disease: survival of large striatal neurons in the rigid variant. *Ann. Neurol.* 15(2), 154-156.

Cabrera J, Reiter RJ, Tan D-X, Qi W, Sainz RM, Mayo JC, García JJ, Kim SJ, and El-Sokkary G. (2000) Melatonin reduces oxidative neurotoxicity due to quinolinic acid: in vitro and in vivo findings. *Neuropharmacol.* 39, 507-514.

Cardenas E., Packer L., Decker M. (2002) Handbook of antioxidants 2a Ed.

Castañó A, Cano J, Machado A. (1993) Low Selenium Diet Affects Monoamine Turnover Differentially in Substantia Nigra and Striatum. *J. Neurochem.* 61(4), 1302-1307.

Chen J, and Berry MJ. (2003) Selenium and selenoproteins in the brain and brain diseases. *J. Neurochem.* 86(1): 1-12.

Choi. DW. (1988) Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1, 623-634.

Collingridge GL. and Lester RA. (1989) Excitatory amino acid receptors in the vertebrate CNS. *Pharmacol. Rev.* 40, 143-208.

Cote L. (1985) Aging of the brain and dementia. *Elsesvier Science Publishing Co.*, 784-792.

El-Defrawy SR, Boegman RJ, Jhamandas K, Beninger RJ. (1986) The neurotoxic actions of quinolinic acid in the central nervous system. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 64(3) : 369-75.

Ferrer I, Martín F, Serrano T, Reiriz J, Perez-Navarro E, Alberch J, Macaya A, Plan AM. (1995) Both apoptosis and necrosis occur following intrastriatal administration of excitotoxins. *Acta. Neuropathol. (Berl).* 90(5) : 504-10.

Flohé L., Günzler WA., Schock HH. (1973) Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett.* 32, 132-134.

Forloni GL, Angeretti N., Rizzi M, Vezzani A. (1992) Chronic infusion of quinolinic acid in rat striatum: effects on discrete neuronal populations. *J. Neurol. Sci.* 108(2), 129-136.

Foster AC., Vezzani A, French ED; Schwarcz R. (1984) Kinurenic acid blocks neurotoxicity and seizures induced in rats by the related brain metabolite quinolinic acid. *Neurosci. Lett.* 48(3), 273-278.

Ganther HE. (1999) Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase. *Carcinogenesis* 20 : 1657-66.

Gravelord GA. (1985) Evidence for degenerative and regenerative changes in neostriatal spiny neurons in Huntington Disease. *Science* 22, 770-773.

Guillemin GJ, Kerr SJ, Smythe GA, Smith DG, Kapoor V, Armati PJ, Croitoru J, Brew BJ. (2001) Kinurenic pathway metabolism in human astrocytes: a paradox for neuronal protection. *J. Neurochem.* 78(4), 842-853.

Harris CA, Miranda AF, Tanguay JJ, Boegman RJ, Beninger RJ, Jhamandas K. (1998) Modulation of striatal quinolinic neurotoxicity by elevation of endogenous brain kynurenic acid. *Br. J. Pharmacol.* 124(2), 391-399.

Harman D, (1993) Free radicals and age-related diseases. In *Free Radicals in Aging* (de. Pal Y.B.), C.R.C. Press. U.S.A., 205-222.

Hsieh HS. and Ganther HE. (1977) Biosynthesis of dimethyl selenide from sodium selenite in rat liver and kidney cell-free systems. *Biochim. Biophys. Acta.* 497, 205-217.

Israels LG, and Israels DE. (1999) Apoptosis. *Stem Cells* 17 : 306-13.

Iwahashi H, Kawamori H, Fukushima K. (1999) Quinolinic acid, α -picoliniv, fusaric acid, and 2,6-pyridinedicarboxylic acid enhance the Fenton reaction in phosphate buffer. *Chemic-Biol. Interactions* 118 : 201-15.

Kaltschmidt C, Kaltschmidt B, Neumann H, Wekerle H, Baeuerle P. (1994) Constitutive NF- κ B Activity in Neurons. *Mol. Cell. Biol.* 14(6) : 3981-92.

Kim IY, Stadtman TC. (1997) Inhibitor of NF- κ B binding and nitric oxide induction in human T cells and lung adenocarcinoma cells by selenite treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 12904-07.

Kretz-Remy C, Mehlen P, Mirault M-E, Arrigo A-P. (1996) Inhibition of κ B-a phosphorylation and degradation and subsequent NF- κ B activation by glutathione peroxidase overexpression. *J. Cell Bio.* 133(5) : 1083-93.

Lapin IP. (1978a) Stimulant and convulsive effects of kinurenes ejected into brain ventricles in mice. *J. Eur. Neural. Transm.* 42, 37-43.

Lapin IP. (1978b) Convulsions and tremor in immature rats after intraperitoneal injection of kynurenine and its metabolites. *Pharmacol. Res. Comun.* 10, 81.

Lapin IP. (1981a) Kynurenes and seizures. *Epilepsia* 22, 257-265.

Lapin IP. (1981b) Antagonism of glycine to seizures induced by L-Kynurenine, Quinolinic Acid and Estrychnine in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 71, 495-498.

Lee J-IK, and Burckart GJ. (1998) Nuclear Factor Kappa B: Important transcription factor and therapeutic target. *J. Clin. Pharmacol.* 38 : 981-93.

Lehrman E, Molinari A, Speciale C, Szwarcz R. (2001) Immunohistochemical visualization of newly formed quinolinic acid in the normal and excitotoxically lesioned rat striatum. *Exp. Brain Res.* 141(3), 389-397.

Leist M, Maurer S, Schultz M, Elsner A, Gawlik D, Brigelius-Flohé R. (1999) Cytoprotection against lipid hydroperoxides correlates with increased glutathione peroxidase activities, but not selenium uptake from different selenocompounds. *Biol. Trace. Elem. Res.* 68, 159-174.

Li N, and Karin M. (1999) *FASEB*, J. 13 : 1137-43.

Martin JB. and Gusella JF. (1986) Huntington's disease. Pathogenesis and management. *N. Engl. J. Med.* 315(20): 267-1276.

Mazzari S, Aldinio C, Beccaro M, Toffano G, Szwarcz R. (1986) Intracerebral quinolinic acid injection in the rat: effects on dopaminergic neurons. *Brain. Res.* 380(2), 309-316.

Moroni F, Lombardi G, Moneti G, Aldinio C. (1984) The excitotoxin quinolinic acid is present in the brain of several animal species and its cortical content increases during the ageing process. *Neurosci. Lett.* 47, 51-55.

Nakai M, Qin Z-H, Wang Y, Chase T. N. (2000) NMDA and non-NMDA receptor-stimulated ikappaB-alpha degradation: differential effects of the caspase-3 inhibitor DEVD.CHO, ethaol and free radical scavenger OPC-14117. *Brain Research* 859(2) : 207-216.

Nève J. (1995) Human selenium supplementation as assessed by changes in blood selenium concentration and glutathione peroxidase activity. *J. Trace. Elem. Med. Biol.* 9, 65-73.

- Obrenovitch TP. (2001) Quinolinic acid accumulation during neuroinflammation. Does it imply excitotoxicity?. *Ann. N. y Acad. Sci.* 939 :1-10.
- Qin Z-H, Wang Y, Nakai M, Chase T.N. (1998) Nuclear Factor - κ B Contributes to excitotoxin-induced apoptosis in rat striatum. *Mol Pharmacol.* 53 : 33-43.
- Rodríguez-Martínez E, Camacho A, Maldonado PD, Pedraza-Chaverri J, Santamaría D, Galván-Arzate S, Santamaría A. (2000) Effect of quinolinic acid on endogenous antioxidants in rat corpus striatum. *Brain Res.* 858(2), 436-439.
- Rotruck JT, Hoekstra WG. Pope AL, Ganther H; Swanson A, Hafeman D. (1972) Relationship of selenium to GSH peroxidase. *Fed. Proc.* 31, 691.
- Rayman MP. (2000) The importance of selenium to human health. *Lancet* 356 : 233-41.
- Sang-Oh Y, Moon-Moo K, Soo-Jin P, Dohoon K, Jongkyeong C, An-Sik C. (2001) Selenite suppresses hydrogen peroxide-induced cell apoptosis through inhibition of ASK1/JNK and activation of PI₃-K/Akt pathways. *The FASEB Journal (express article 10.1096/fj.01-0398ffe.)* Published online November 14.
- Santamaría A, Slavatierra R, Vázquez-Román B, Santiago AD, Villeda J, Galván S, Jiménez ME, Syed FA. (2003) Protective effects of the antioxidant selenium on quinolinic acid-induced neurotoxicity in rats: in vitro and in vivo studies. *J. Neurochem.* 86 : 479-88.
- Santamaría A, Galván-Arzate S, Lisy V, Ali S.F, Duhart HM, Osorio-Rico L, Rios C, St'astny F. (2001a) Quinolinic acid induces oxidative stress in rat brain synaptosomes. *NeuroReport* 12(4), 871-874.
- Santamaría A, Jiménez ME, Camacho A, Rodríguez-Martínez E, Flores A, Galván-Arzate S. (2001b) In vivo hydroxyl radical formation after quinolinic acid infusion into rat corpus striatum. *NeuroReport* 12, 2693-2696.
- Schwarz K. and Foltz CM. (1957) Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *J. am. Chem. soc.* 79, 3292-3293.
- Schwarcz R, Roster AC, French ED, Whetsell WO, Jr. and Kohler C. (1984) Excitotoxic models for neurodegenerative disorders. *Life Sci.* 35, 19-32.
- Stípek S, stastny F, Platenik J, Crkovská J, Zima T. (1997) the effect of quinolinate on rat brain lipid peroxidation is dependent on iron. *Neurochem. Int.* 30 : 233-37.
- Seko Y. and Imura N. (1997) Active oxygen generation as a possible mechanism of selenium toxicity. *Biomed. Environ. Sci.* 10, 333-339.
- Seko Y, Saito Y, Kitara J, Imura N. (1989) Active oxygen generation by the reaction of selenite with reduced glutathione in vitro. In: Wendenl A,ed. *Selenium in Biology and Medicine.* Berlin: Springer Verlag. 70-73.
- Spallholz Julian E. (1994) On The Nature of Selenium Toxicity and Carcinostatic Activity. *Free Radicals and Med.* 17(1), 45-64.
- Stone TW. (1993) Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids. *Pharmacol. Rev.* 45, 303-309.
- Stone TW, and Burton NR. (1988) NMDA receptors and their endogenous ligands in vertebrate CNS. *Prog. Neurobiol.* 30, 333-368.
- Stone YW, and Perkins MN. (1981) Quinolinic acid : a potent endogenous excitant at amino acid receptors in receptors in CNS. *Eur. J. Pharmacol.* 72, 411-412.

Yoon SO, Kim MM, Park SJ, Kim D, Chung J, Chung AS. (2002) selenite suppresses hydrogen peroxide-induced cell apoptosis through inhibition of ASK1/JNK and activation of PI3-K/Akt pathways. *FASEB J.* 16(1) : 111-30.

Veres Z., Kim IY., Scholz T., Stadtman T. (1994) Selenofosfato sintetasa. Enzyme properties and catalytic reaction. *J. Biol. Chem.* 269, 10597-10603.

Vender AD. (1975) The kynurenine pathway of tryptophan catabolism. *Amino Acid Metabolism. John Wiley and Sons. U.S.A.*, 172-177.

Vladimirov YA, Olenev VI, Suslova TB, Cheremisina ZP. (1980) Lipid peroxidation in mitochondrial membrane. *Adv. Lipid. Res.* 17 173-249.

Vendeland SC, Deagen JT, Butler JA, Whanger PD. (1994) Uptake of selenite, selenomethionine and selenate by brush border membrane vesicles isolated from rat small intestine. *Biometals* 7, 305-312.