



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**“EFECTO DEL TRATAMIENTO ANTIOXIDANTE SOBRE LAS
ALTERACIONES MITOCONDRIALES INDUCIDAS POR EL DAÑO
NEUROTÓXICO EN RATAS”**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:
BIOL. ERIKA RUBÍ LUIS GARCÍA

TUTOR PRINCIPAL: DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI. FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DRA. DIANA BARRERA OVIEDO, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

DRA. VERÓNICA PÉREZ DE LA CRUZ, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

México D.F.

Noviembre, 2014.



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

FACULTAD DE CIENCIAS

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**“EFECTO DEL TRATAMIENTO ANTIOXIDANTE SOBRE LAS
ALTERACIONES MITOCONDRIALES INDUCIDAS POR EL DAÑO
NEUROTÓXICO EN RATAS”**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:
BIOL. ERIKA RUBÍ LUIS GARCÍA

TUTOR PRINCIPAL: DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI. FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DRA. DIANA BARRERA OVIEDO, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

DRA. VERÓNICA PÉREZ DE LA CRUZ, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

México D.F.

Noviembre, 2014.



POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/303/14

ASUNTO: Oficio de Jurado

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **24 de marzo de 2014** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** del (la) alumno (a) **LUIS GARCÍA ERIKA RUBÍ** con número de cuenta **300127166** con la tesis titulada **"Efecto del tratamiento antioxidante sobre las alteraciones mitocondriales inducidas por el daño neurotóxico en ratas"**, realizada bajo la dirección del (la) **DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI:**

Presidente: DRA. SELVA LUCIA RIVAS ARANCIBIA
Voca: DR. MOHAMMED EL HAFIDI BENTLAKDER
Secretario: DRA. DIANA BARRERA OVIEDO
Suplente: DRA. MIREYA ALCARAZ ZUBELDIA
Suplente: DRA. VERÓNICA PÉREZ DE LA CRUZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 29 de mayo de 2014

M. del Coro Arizmendi
Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga
Coordinadora del Programa



AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM su aprobación para el desarrollo de esta tesis de maestría, así como también su apoyo económico para la presentación de este trabajo en el Congreso Internacional de Neurociencias realizado en San Diego, California.

Se agradece el apoyo recibido de la beca CONACYT y de los proyectos CONACYT 129838 y PAPIIT IN210713.

Se agradece a los miembros del Comité Tutor la aprobación de este trabajo, así como sus comentarios y sugerencias para el enriquecimiento de esta tesis.

Se agradece a la Dra. Marisol Orozco Ibarra del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”, el asesoramiento técnico de esta tesis.

Se agradece a los encargados del Bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM, Ismael Torres Saldaña y Enrique Pinzón Estrada por su continuo apoyo y asistencia técnica para el uso de animales de laboratorio.

Sitio donde se desarrollo el tema: Laboratorio de Biología Molecular y Celular del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” y Laboratorio 209, segundo piso, edificio F de la Facultad de Química, UNAM.

ASESOR DEL TEMA

Dr. José Pedraza Chaverri

SUSTENTANTE

Biol. Erika Rubí Luis García

AGRADECIMIENTOS

A Dios por iluminar mi camino y permitir terminar de manera satisfactoria mi tesis de maestría.

A mi esposo Alfonso y a mi hermoso hijo Alfonsito por su paciencia, comprensión y amor durante la realización de esta tesis. Los amo.

A mis padres Rubí y Fernando por guiarme y enseñarme que en la vida hay que luchar para salir adelante. Gracias a sus consejos, cariño y apoyo he podido llegar hasta aquí, los amo.

A mis hermanos Fernando y Pedro, por su apoyo, cariño y consejos y por estar junto a mí siempre.

A mis amigos de laboratorio Jazmín García, Norma Serrano, Jorge Limón, David Heras, Francisco Calvo, Nancy García, Fernando Granados, Daniela Rodríguez y Laurita gracias por estar conmigo y ayudarme en todo momento durante la realización de esta tesis a cada uno de ustedes les doy las gracias.

En especial quiero agradecer a la Dra. Marisol Orozco Ibarra por su asesoramiento técnico, tanto en el modelo experimental así como en el análisis estadístico. Además quiero agradecerle también por ser mi amiga y estar conmigo en los momentos más difíciles de mi vida, gracias por enseñarme a llevar a Dios en mi camino, te aprecio mucho.

A mi tutor Dr. José Pedraza Chaverri por guiarme correctamente, por ser una persona comprensiva, por brindarme todos los recursos para la realización de esta tesis y especialmente por su amistad que me ha brindado, gracias por confiar en mí y también por sus consejos.

A los doctores Enrique Pinzón, Ismael Torres y Salgado por brindarme todos los animales para llevar a cabo mis experimentos, por su disposición y trabajo gracias.

DEDICATORIA

Dedico esta a mi papá quien ya no tuvo la dicha de ver mi examen de grado, pero quien siempre me brindo su apoyo incondicional y me enseñó a luchar por mis objetivos. Siempre te llevaré en mi corazón papi donde quiera que estés.

ÍNDICE

	Páginas
RESUMEN -----	1
ABSTRACT -----	2
1. INTRODUCCIÓN -----	3
1.1 Estrés oxidante -----	3
1.1.1 Consecuencias del estrés oxidante -----	5
1.1.2 Estrés oxidante en la neurodegeneración -----	7
1.2 Estructura y función de la mitocondria -----	8
1.2.1 Cadena de transporte de electrones -----	10
1.2.1.1 Complejo I ó NADH: ubiquinona oxidoreductasa -----	10
1.2.1.2 Complejo II o Succinato deshidrogenasa -----	12
1.2.1.3 Complejo III o ubiquinol: citocromo <i>c</i> oxidoreductasa -----	12
1.2.1.4 Complejo IV ó citocromo <i>c</i> oxidasa -----	14
1.2.1.5 ATP sintasa o F ₁ F ₀ -ATPasa -----	14
1.2.2 Consumo de Oxígeno -----	16
1.2.3 Disfunción mitocondrial -----	18
1.3 El ácido quinolínico como modelo de neurodegeneración -----	20
1.3.1 Efectos de la inyección intraestriatal de QUIN -----	22
1.4 Sistema de defensa antioxidante -----	23
1.4.1 Selenio -----	24
1.4.1.1 Metabolismo y biodisponibilidad del selenio -----	25
1.4.1.2 Función biológica del selenio -----	27
1.4.1.3 Efecto protector de selenio en cerebro -----	29
1.4.2 Sulforafano (SFN) -----	30

	Páginas
1.4.2.1 Efecto protector del SFN -----	31
1.4.2.2 Efecto protector de SFN en cerebro -----	33
2. JUSTIFICACIÓN -----	34
3. HIPÓTESIS -----	34
4. OBJETIVOS -----	34
4.1 Objetivo general -----	34
4.2 Objetivos específicos-----	35
5. METODOLOGÍA -----	36
5.1 Reactivos -----	36
5.2 Animales -----	36
5.3 Cirugía estereotáxica -----	37
5.4 Curso temporal con QUIN -----	37
5.5 Esquemas de administración de selenio y SFN -----	39
5.6 Aislamiento de la fracción mitocondrial -----	41
5.7 Determinación de proteína por el método de Lowry -----	41
5.8 Respiración mitocondrial -----	42
5.9 Potencial transmembranal (ψ) -----	43
5.10 Actividad enzimática de los complejos mitocondriales -----	43
5.11 Capacidad de síntesis de ATP -----	46
5.12 Conducta de giro -----	47
5.13 Análisis histológico -----	47
5.14 Análisis estadístico -----	47

	Páginas
6. RESULTADOS	48
6.1 Análisis ultraestructural de la fracción mitocondrial	48
6.2 Curso temporal de QUIN en mitocondrias aisladas del estriado	49
6.2.1 El QUIN disminuye el consumo de oxígeno mitocondrial	49
6.2.2 El QUIN provoca la pérdida del	52
6.2.3 El QUIN induce cambios en la actividad de los complejos mitocondriales	53
6.3 Efecto de la administración del Na ₂ SeO ₃ sobre la disfunción mitocondrial inducida por QUIN	55
6.3.1 El Na ₂ SeO ₃ previene la conducta de giro inducida por QUIN ----	55
6.3.2 El Na ₂ SeO ₃ no previene la disminución del consumo de oxígeno inducida por QUIN	56
6.3.3 El Na ₂ SeO ₃ no previene la pérdida del , ni la capacidad de síntesis de ATP mitocondrial	57
6.4. Efecto de SFN sobre las alteraciones mitocondriales inducidas por el QUIN	58
6.4.1 El SFN previene la conducta de giro inducida por QUIN	58
6.4.2 El SFN atenúa el daño histológico inducido por QUIN	59
6.4.3 El SFN previene la disminución del consumo de oxígeno inducida por QUIN	62
6.4.4 El SFN previene la pérdida del inducida por QUIN	63

	Páginas
6.4.5 El SFN previene la disminución de la actividad de los complejos mitocondriales -----	64
8. DISCUSIÓN -----	66
9. CONCLUSIÓN -----	69
10. LITERATURA CITADA -----	70
11. ABREVIATURAS -----	80

LISTA DE FIGURAS Y CUADROS

	Páginas
Figura 1. Formación de especies reactivas de oxígeno -----	3
Figura 2. Estructura básica de la mitocondria -----	9
Figura 3. Rutas propuestas sobre la transferencia de electrones en el CIII	13
Figura 4. Flujo de electrones a través de la CTE mitocondrial -----	15
Figura 5. Representación de los estados de respiración mitocondrial ----	18
Figura 6. Formación de QUIN por la vía de la kinurenina -----	20
Figura 7. Formación de la selenocisteína -----	24
Figura 8. Metabolismo del selenio -----	26
Figura 9. Esquema del mecanismo catalítico de GPx -----	27
Figura 10. Flujo de electrones en los sistemas tiorredoxina y glutatión --	28
Figura 11. Hidrólisis de la glucorafanina -----	31
Figura 12. Mecanismos de inducción de Nrf2 por SFN -----	32
Figura 13. Esquema del curso temporal con QUIN -----	38
Figura 14. Esquema de administración de selenio -----	39
Figura 15. Esquema de administración de SFN -----	40
Figura 16. Trazo de oximetría de mitocondrias aisladas de estriado -----	42
Figura 17. Método utilizado para detectar la actividad de los complejos I y II	44
Figura 18. Método utilizado para detectar la síntesis de ATP -----	46
Figura 19. Análisis ultraestructural de la fracción mitocondrial -----	48
Figura 20. Consumo de oxígeno de mitocondrias aisladas de estriado ---	49
Figura 21. Efecto del QUIN sobre los estados 3 y 4 de respiración -----	50
Figura 22. Efecto del QUIN sobre el ICR en mitocondrias de estriado ----	51
Figura 23. Efecto del QUIN sobre el ψ en mitocondrias de estriado -----	52

	Páginas
Figura 24. Efecto del QUIN sobre la actividad de los complejos mitocondriales -----	54
Figura 25. Efecto de Na ₂ SeO ₃ sobre la conducta de giro inducida por apomorfina -----	55
Figura 26. Efecto de Na ₂ SeO ₃ sobre el consumo de oxígeno mitocondrial	56
Figura 27. Efecto de Na ₂ SeO ₃ sobre el y capacidad de síntesis de ATP	57
Figura 28. Efecto de SFN sobre la conducta de giro inducida por apomorfina	58
Figura 29. Tinción con H&E del lóbulo derecho del grupo Sham -----	59
Figura 30. Tinción con H&E del lóbulo derecho del grupo QUIN -----	60
Figura 31. Tinción con H&E del lóbulo derecho del grupo Q+SFN -----	61
Figura 32. Efecto de SFN sobre el consumo de oxígeno mitocondrial ----	62
Figura 33. Efecto de SFN sobre el -----	63
Figura 34. Efecto de SFN sobre la actividad de los complejos mitocondriales	65
Tabla 1. Inhibidores de la cadena de transporte de electrones -----	11
Tabla 2. Estados metabólicos mitocondriales -----	17
Tabla 3. Efecto del QUIN sobre los estados 3 y 4 de respiración -----	50
Tabla 4. Efecto de SFN sobre el consumo de oxígeno mitocondrial -----	63

RESUMEN

El selenio y el sulforafano (SFN) son dos antioxidantes que tienen efecto protector en diversos modelos de neurotoxicidad a través de la reducción del daño oxidante y la inducción e incremento en la actividad de enzimas citoprotectoras. Por otra parte, existen diferentes compuestos neurotóxicos que causan estrés oxidante como parte de su mecanismo de daño, entre los que se encuentra el ácido quinolínico (QUIN). La inyección intraestriatal de QUIN en ratas es un modelo experimental que reproduce alteraciones bioquímicas, conductuales y neuropatológicas similares a las observadas en la enfermedad de Huntington. Además, en este modelo se ha reportado que tanto el selenio como el SFN tienen un efecto neuroprotector. En el presente trabajo determinamos si tal efecto está asociado a la preservación de la función mitocondrial. La inyección intraestriatal con 240 nmol de QUIN, disminuyó significativamente el consumo de oxígeno, el potencial transmembranal () y la actividad de los complejos mitocondriales 24 h después de su inyección. En forma consistente con estudios previos, la administración intraperitoneal de Na_2SeO_3 (0.625 mg/kg) durante 9 días, previno el número de giros ipsilaterales inducidos por la administración de apomorfina. Sin embargo, este efecto protector no estuvo asociado con el restablecimiento de la función mitocondrial. Por otra parte, al igual que el selenio, el pre-tratamiento de SFN (dos dosis de 5 mg/kg/24h), bloqueó la inducción de los giros ipsilaterales por la apomorfina. De manera interesante, pudimos observar que esta protección sí estuvo asociada con el restablecimiento de la función mitocondrial (consumo de oxígeno, y actividad de los complejos I, IV y V) y con la preservación del tejido estriatal. Estos resultados sugieren que el efecto protector de SFN contra el daño inducido por QUIN está asociado en parte con el restablecimiento de la función mitocondrial, mientras que el del Na_2SeO_3 podría estar relacionado con la sobreexpresión y activación de las enzimas dependientes de selenio. Sin embargo, aún falta por estudiar otros mecanismos involucrados en esta neuroprotección.

ABSTRACT

Experimental neurotoxicity in rats caused by neurotoxic compounds such as quinolinic acid (QUIN) which reproduces biochemical, behavioral and neuropathological alterations of Huntington's disease is ameliorated with selenium or sulforaphane (SFN) treatment. Their antioxidant properties lead to both reduced oxidative damage and cytoprotection through upregulation of antioxidant genes. In this work we determined whether this effect is associated with preservation of mitochondrial function by evaluation of the respiratory control ratio, transmembrane potential ($\Delta\psi$) and activity of mitochondrial complexes. The protective effect of selenium and SFN was evaluated at 24 h because the higher mitochondrial dysfunction caused by QUIN (240 nmol) was observed at that time. In agreement with previous studies, intraperitoneal injection of Na_2SeO_3 (0.625 mg/kg) for 9 days or SFN (twice 5 mg / kg / 24h) before administration of QUIN prevented the number of ipsilateral turns induced by administration of apomorphine. Interestingly, only SFN protection was associated with the functional reestablishment of mitochondria (oxygen consumption, $\Delta\psi$ and activity of complex I, IV and V) and preservation of striatal tissue. These results suggest that the protective effect of SFN against QUIN induced damage is associated in part with the reestablishment of the mitochondrial functionality, whereas the Na_2SeO_3 could be related to overexpression and activation of selenium-dependent enzymes. However, we must still consider other mechanisms involved in this neuroprotection.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Estrés oxidante

El estrés oxidante es un estado celular en el que se encuentra alterado el equilibrio entre la producción de pro-oxidantes que se generan como resultado del metabolismo celular y los sistemas de defensa antioxidantes. Esta condición causa un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) respecto a los niveles de antioxidantes dando como resultado daño y muerte celular (Dorado-Martínez *et al.*, 2003).

Las ERO se producen continuamente en las células de organismos aerobios como producto de sus procesos metabólicos, aunque también pueden ser producidas por radiación ionizante, por activación de fagocitos del sistema inmune, por la exposición a fármacos o exposición a compuestos químicos citotóxicos como contaminantes ambientales (Betteridge, 2000). Las ERO son moléculas derivadas del oxígeno con gran capacidad de reacción debido a su alta inestabilidad química. Las principales ERO formadas durante la reducción parcial del oxígeno son: el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^{\cdot}) (Figura 1).

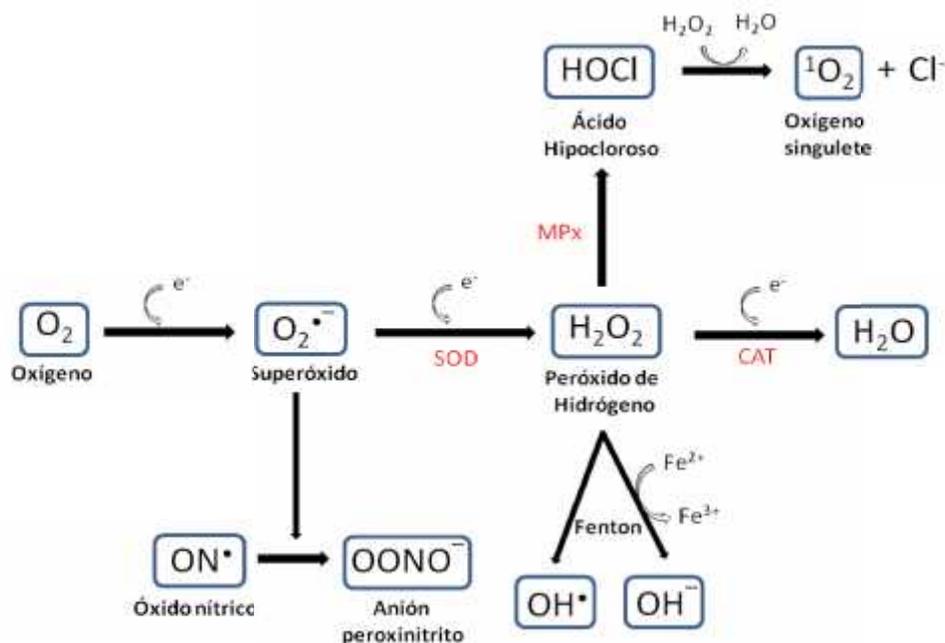


Figura 1. Formación de las especies reactivas de oxígeno. MPx: mieloperoxidasa, SOD: superóxido dismutasa, CAT: catalasa. Modificado de Castillo *et al.*, 2001.

La producción excesiva de ERO causa toxicidad celular, ya que muchas de estas oxidan fácilmente a macromoléculas biológicas tales como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, contribuyendo al desarrollo de la neurodegeneración (Gandhi y Abramov, 2012).

Anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$)

En condiciones fisiológicas el $O_2^{\bullet-}$ se libera como sub-producto de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, los citocromos P450, algunas oxidasas como la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH) oxidasa, la xantina oxidasa, en la auto-oxidación de compuestos como el gliceraldehído o de las flavinas y en las tetrahidropterinas reducidas (Hansberg, 2002). El $O_2^{\bullet-}$ no reacciona directamente con ADN, proteínas o lípidos, pero puede inhibir la actividad de algunas enzimas como la 6-fosfogluconato deshidrogenasa, la aconitasa y la fumarasa, lo que afecta la reducción de nicotinamida adenín dinucleótido oxidado (NAD^+) y el metabolismo energético. Este radical es poco reactivo y tiene una vida media corta, sólo reacciona a una tasa importante con las quinonas, los fenoles, difenoles, con el hierro libre o unido a proteínas y con otros radicales como el óxido nítrico (NO^{\bullet}) generando peroxinitrito ($ONOO^-$) que es una especie que puede modificar proteínas mediante la formación de 3-nitrotirosina (Chirino *et al.*, 2006).

Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

El H_2O_2 es un oxidante poco reactivo, que se forma como producto de diferentes oxidasas peroxisomales y algunas enzimas mitocondriales. También se forma mediante las reacciones de oxidación de compuestos que contienen grupos sulfhidrilos y mediante la dismutación del $O_2^{\bullet-}$ por la acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD). Esta enzima produce la mayor parte del H_2O_2 en las células (Hansberg, 2002). El H_2O_2 puede reaccionar con cisteínas del sitio activo de algunas enzimas, como la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y de algunas fosfatasa, inhibiendo su acción de manera transitoria. Además, este compuesto puede difundir a través de membranas biológicas, característica que le permite formar aductos con algunos carbohidratos, aminoácidos y bases nitrogenadas, e interactuar con metales de transición como el hierro y el cobre en una reacción conocida como reacción de Fenton, dando lugar a la formación del radical hidroxilo (OH^{\bullet}) y del ión hidroxilo (OH^-) (Halliwell y Gutteridge, 2007).



Tanto el $\text{O}_2^{\bullet-}$ como el H_2O_2 son poco reactivos, sin embargo ambos son tóxicos para la células ya que actúan como precursores de la generación de radicales altamente reactivos como el singulete de oxígeno ($^1\text{O}_2$) y el OH^\bullet . La toxicidad de ambas especies depende en gran medida de la disponibilidad y distribución de los metales de transición (Hansberg, 2002).

Radical hidroxilo (OH^\bullet)

El OH^\bullet es un agente oxidante potente, que puede reaccionar rápidamente ($10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) con moléculas orgánicas e inorgánicas en la célula tales como ADN, proteínas, lípidos, aminoácidos, carbohidratos y metales (Hansberg, 2002). Este radical puede ser producido *in vivo* por las reacciones de Fenton y de Haber-Weiss.



El OH^\bullet es una molécula muy reactiva y su producción es crítica ya que reacciona con todas las macromoléculas del organismo: ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y carbohidratos (Halliwell y Gutteridge, 2007). El OH^\bullet se considera el radical más reactivo y dañino en los sistemas biológicos, debido a que las células no poseen mecanismos antioxidantes específicos capaces de combatir su efecto tóxico (Hansberg, 2002).

1.1.1 Consecuencias del estrés oxidante

La principal consecuencia del estrés oxidante en la célula es la oxidación de los lípidos, las proteínas y el ADN, lo cual puede generar alteraciones en el metabolismo celular como ruptura del ADN, acumulación de agregados protéicos, desregulación en la homeostasis del calcio y disfunción mitocondrial, conduciendo a muerte celular por apoptosis y/o necrosis (Andersen, 2004).

Daño a lípidos de membrana

Las membranas celulares de las células de mamíferos contienen fosfolípidos que poseen ácidos grasos poli-insaturados (como ácido araquidónico y docosahexaenoico), los cuales son altamente sensibles a la oxidación debido a que los grupos metilenos entre sus dobles enlaces tienden a ceder fácilmente un hidrógeno alílico. El OH^\bullet puede reaccionar fácilmente con estos hidrógenos, conduciendo a la generación de un radical carbono en el ácido graso, el cual al reaccionar con el oxígeno, forma un radical peroxilo (ROO^\bullet). El ROO^\bullet puede reaccionar con un hidrógeno alílico de otro grupo metileno, lo que favorece la propagación de la reacción. De esta manera se pueden generar un gran número de lipoperóxidos, los cuales se pueden descomponer en una serie de productos citotóxicos, siendo los aldehídos reactivos los más dañinos (Hansberg, 2002). El malondialdehído y el 4-hidroxi-2-nonenal son los dos principales productos que se forman durante la lipoperoxidación. Estos aldehídos reactivos pueden a su vez ocasionar un daño importante a las proteínas de membrana ya que pueden inactivar a las enzimas y a los receptores que las constituyen (Uchida, 2003).

Daño a proteínas

El incremento en la producción de ERO también puede ocasionar alteraciones en la estructura de algunas proteínas. La mayoría de daños en las proteínas son ocasionadas por el OH^\bullet . Este radical puede reaccionar con cualquier aminoácido de las proteínas en el sitio donde se forma, que por lo general coinciden con sitios próximos a metales de transición. Además, el OH^\bullet también puede oxidar residuos de prolina en las proteínas, lo que favorece la ruptura de sus enlaces peptídicos (Wolff y Dean 1986). Existen otras especies como el $^1\text{O}_2$, el cual es más selectivo y reacciona particularmente con los aminoácidos triptofano, tirosina, histidina, lisina, metionina y cisteína de las proteínas conduciendo a su oxidación (Dean *et al.*, 1997).

Daño al ADN

La pérdida de bases, la desaminación de la citosina en uracilo y la ruptura de una o de las dos hebras del ADN, son eventos que ocurren de forma normal a una tasa baja en los organismos. Sin embargo, dichos eventos pueden ser inducidos por la sobreproducción de las ERO. Existen diversas ERO que pueden reaccionar tanto con purinas como con pirimidinas del ADN como el OH^\bullet . Este radical puede unirse a la guanina en las posiciones 4, 5 u 8 en el anillo de purina, generando un aducto hidroxilado en el carbono 8, el cual puede ser reducido a 8-hidroxi-7,8 dihidroguanina. Este compuesto al oxidarse lleva a la formación de 8-hidroxi desoxi-guanosina (8-OHdG). El OH^\bullet también puede interactuar con las pirimidinas, donde la timina puede sufrir la adición de OH^\bullet a su anillo. Esto conduce a la formación de una variedad de productos que incluyen a glicoles de timina, 5-formiluracil y 5-hidroximetiluracil (Halliwell y Gutteridge, 2007). Además, la unión de lipoperóxidos al ADN también induce modificaciones, las cuales principalmente afectan al ADN mitocondrial, favoreciendo un aumento en la liberación de ERO de la mitocondria (Hansberg, 2002). El daño celular inducido por las ERO puede ser reversible o irreversible dependiendo del tiempo de duración, la efectividad de las defensas antioxidantes, la edad del organismo, el estado nutricional y la expresión de genes que codifican para los sistemas de defensa antioxidante (Halliwell y Gutteridge, 2007).

1.1.2 Estrés oxidante en la neurodegeneración

El tejido nervioso es particularmente sensible al estrés oxidante debido a que presenta: 1) alta demanda de oxígeno para producir energía, 2) baja actividad de enzimas antioxidantes y 3) contenido elevado de ácidos grasos poli-insaturados que son altamente susceptibles a la lipoperoxidación (Mancuso et al., 2006). El estrés oxidante se ha asociado a diversas enfermedades neurodegenerativas que incluyen a la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington y la Esclerosis Lateral Amiotrófica (Gandhi y Abramov., 2012). Aunque no son claras las causas y los mecanismos de muerte neuronal en estas enfermedades, hay diversos factores que están estrechamente implicados en su desarrollo como son la excitotoxicidad, la formación de agregados proteicos, la pérdida de la homeostasis de calcio, la disfunción mitocondrial y el estrés oxidante. Sin embargo, aún se desconoce la secuencia en la que estos eventos conducen a la muerte neuronal (Coyle y Puttfarcken, 1993).

Aunque en todos los procesos metabólicos inherentes al organismo se producen pequeñas cantidades de ERO, la fuente endógena de especies reactivas más importantes es la cadena de transporte de electrones mitocondrial, donde las ERO se generan como producto secundario del metabolismo energético oxidante (Dorado-Martínez *et al.*, 2003).

1.2 Estructura y función de la mitocondria.

Las mitocondrias son organelos en donde se lleva a cabo el metabolismo oxidativo de las células eucariontes, estas desempeñan un papel central en la bioenergética celular, ya que genera más del 90% de adenosin trifosfato (ATP) requerido por la célula, el cual es empleado como moneda energética en varias vías metabólicas de la célula. Además, estos organelos también regulan la homeostasis de calcio y participan en las vías de señalización que controlan la respuesta celular ante estímulos externos e intervienen en la regulación de la apoptosis celular (Wallace *et al.*, 2010).

La morfología y tamaño de las mitocondrias varía entre los diferentes tipos celulares de acuerdo a su función de origen y a su estado metabólico. Éstas pueden ser de forma esférica, alargada o filamentosa. Además, su abundancia en los diferentes tejidos varía dependiendo de las necesidades energéticas de las células, siendo el hígado, el cerebro y el músculo esquelético cardiaco los que contienen la mayor cantidad (Youle y Van Der Bliet, 2012; Pieczenik y Neustadt, 2007). Estos organelos están conformados por dos bicapas lipídicas, una externa y una interna. La membrana externa (ME) es altamente permeable a sustancias de hasta 10 KDa, debido a la presencia de un gran número de porinas, mientras que la membrana interna (MI) es poco permeable a iones tales como H^+ , K^+ , Na^+ y Cl^- , por lo que el transporte de estos iones de la matriz mitocondrial al citoplasma es altamente regulado por sistemas de transporte específicos, encargados de transportar al adenosin difosfato (ADP) y fosfato inorgánico (P_i) a la matriz, y el ATP hacia el citosol. La MI se pliega para formar las crestas mitocondriales, en las cuales está embebido el sistema multienzimático que se encarga de llevar a cabo la fosforilación oxidativa (OXPHOS) (Sas *et al.*, 2007).

Las mitocondrias cuentan también con una matriz mitocondrial, la cual contiene muchas de las enzimas que forman parte de las principales vías metabólicas celulares, tales como el ciclo del ácido tricarboxílico (ciclo de Krebs), el ciclo de la urea, la gluconeogénesis, la oxidación de ácidos grasos (β -oxidación) y la fosforilación oxidativa (OXPHOS), entre otras (Wallace *et al.*, 2010) (Figura 2).

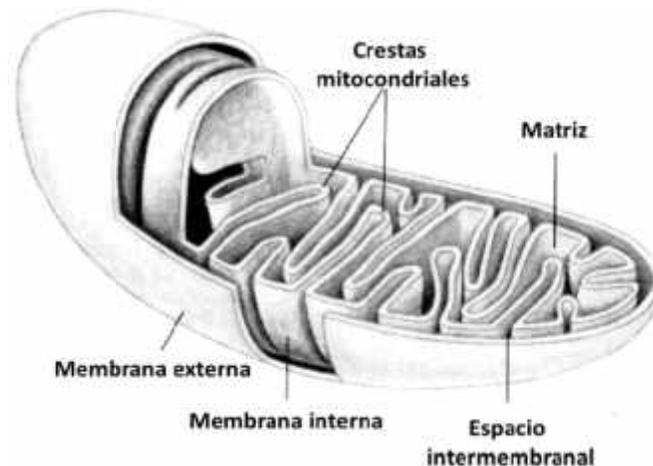


Figura 2. Estructura básica de la mitocondria.

La producción de energía dentro de la mitocondria se lleva a cabo a partir del catabolismo de la glucosa en el citosol, en la cual se generan dos moléculas de piruvato, las cuales pasan a través de la mitocondria hasta llegar al complejo de la piruvato deshidrogenasa (PDH), enzima que transforma a las dos moléculas de piruvato en dos moléculas de acetil coenzima A (acetil-CoA). Estas dos moléculas de acetil-CoA entran al ciclo de Krebs donde producen 3 moléculas de nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) y 2 moléculas de flavina adenina dinucleótido (FADH_2), en total 6 NADH y 4 FADH_2 por molécula de piruvato. Posteriormente, las coenzimas NADH y FADH_2 donan sus electrones a los complejos I (NADH: ubiquinona oxidoreductasa) y II (succinato deshidrogenasa) de la cadena de transporte de electrones (CTE), respectivamente. Luego, los electrones son transferidos a los complejos III y IV a través de acarreadores electrónicos móviles como son la ubiquinona y el citocromo c. El flujo de electrones a través de los complejos genera un gradiente electroquímico, el cual da como resultado la reducción del oxígeno a H_2O por la citocromo c oxidasa.

De forma simultánea, se lleva a cabo un bombeo de protones (H^+) de la MI mitocondrial hacia el espacio intermembranal por los complejos I, III y IV generando energía en forma de fuerza protón motriz (FPM), dicha energía hace posible que la ATP sintasa pueda generar ATP a partir de ADP y P_i .

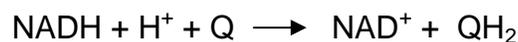
1.2.1 Cadena de transporte de electrones mitocondrial

El sistema de la OXPHOS en los mamíferos está compuesto de cinco complejos multiprotéicos (I-V) y dos acarreadores electrónicos móviles (ubiquinona y citocromo c), los cuales se encuentran embebidos en la MI mitocondrial. Los primeros cuatro complejos redox constituyen a la CTE mitocondrial (Figura 4) (Sas *et al.*, 2007).

1.2.1.1 Complejo I o NADH: ubiquinona oxidoreductasa

Es una enzima compuesta por al menos 46 polipéptidos diferentes y contiene un mononucleótido de flavina (FMN) unido de manera no covalente. Además, posee por lo menos 8 centros hierro-azufre (Fe-S) como cofactores redox. En este complejo se catalizan dos procesos simultáneos que están obligadamente acoplados:

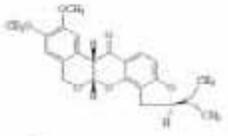
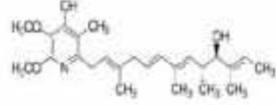
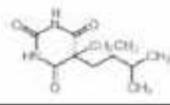
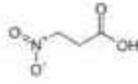
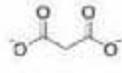
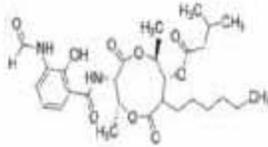
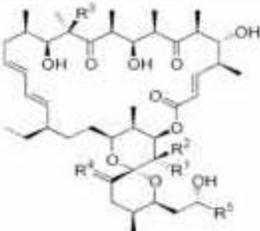
- a) La transferencia exergónica de un ión hidruro a la ubiquinona (Q) por el NADH y de un protón proveniente de la matriz, expresada por:



- b) La transferencia endergónica de 4 H^+ , los cuales son bombeados desde la matriz hacia el espacio intermembranal, contribuyendo a la generación del gradiente electroquímico de protones (μ_{H^+}) para la síntesis de ATP.

El ubiquinol (QH_2) es un compuesto liposoluble móvil, el cual facilita la transferencia de los electrones desde el complejo I al III. Existen diversos compuestos capaces de bloquear la transferencia de los electrones desde los centros Fe-S hacia la Q, entre los que se encuentran la rotenona, la piericidina, el amital y los barbitúricos (Metzler, 2003). El uso de inhibidores específicos ha sido empleado en el estudio de los diferentes estados de oxido-reducción de los diferentes complejos enzimáticos mitocondriales (Tabla 1).

Tabla 1. Inhibidores de la cadena de transporte de electrones.

Complejo	Inhibidor	Molécula	Sitio de acción
Complejo I	Rotenona		Bloquean la cadena de transporte de electrones entre la NADH deshidrogenasa (Complejo I) y la Q.
	Piericidina A		
	Amital		
Complejo II	Ácido 3-nitropropiónico		Inhibidores competitivos del sitio activo de la SDH
	Malonato		
Complejo III	Antimicina A		Interfiere con el flujo de electrones desde el citocromo b _H en el Complejo III.
Complejo IV	Cianuro	$-\text{C}\equiv\text{N}$	Bloquea el paso de electrones del citocromo a ₃ al oxígeno.
Complejo V	Oligomicina		Inhibe a la ATPasa al unirse a la subunidad F _o e interfiere en el transporte de H ⁺ a través de F _o , inhibe por lo tanto la síntesis de ATP.

Modificado de Metzler, 2003.

1.2.1.2 Complejo II o Succinato deshidrogenasa

Es una enzima compuesta por 4 subunidades proteicas y 5 grupos prostéticos. Las dos subunidades mayores son solubles en agua y se orientan hacia el lado de la matriz mitocondrial, en donde forman parte del ciclo de Krebs. Estas sub-unidades unen a los grupos prostéticos flavín adenín dinucleótido (FAD) y a 3 centros Fe-S, además de que están unidas al resto de las subunidades hidrofóbicas que se anclan en la membrana y poseen un grupo hemo tipo b, que provee el sitio de unión a la Q. En la oxidación de succinato a fumarato, 2 electrones y 2 H⁺ son transferidos a FAD.



El FADH₂ transfiere los e⁻ a la Q vía centros Fe-S del Complejo II y posteriormente estos e⁻ pasan al complejo III. No obstante, la transferencia de electrones en este complejo no se encuentra acoplada a la translocación de H⁺, por lo que el complejo II no contribuye a la generación del μ_{H+} (Metzler, 2003).

1.2.1.3 Complejo III o ubiquinol: citocromo c oxidoreductasa

El complejo III es un dímero de monómeros idénticos, la interfase entre ambos monómeros forma dos cavidades, cada una de ellas contiene un sitio de unión diferente para QH₂. En este complejo se acopla la transferencia de electrones del QH₂ al citocromo c con la transferencia de H⁺ de la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembranal. El paso de electrones y H⁺ a través del complejo III se puede describir con la ecuación neta para la reacción redox del ciclo Q:



El complejo III además adecúa el intercambio de electrones entre la Q (acarreadora de 2 electrones) y los citocromos b₅₆₂ y b₅₆₆, c₁ y c (acarreadores de 1 electrón). Así, cuatro protones son translocados al espacio intermembranal por cada 2 electrones que pasan a través del complejo III al citocromo c. La transferencia de electrones de QH₂ al citocromo c se lleva a cabo por el ciclo de la Q (Figura 3). En este ciclo se generan intermediarios de la Q como las semiquinonas, que contribuyen a generación de ERO en presencia de metales de transición.

El citocromo *c* es una proteína soluble en el espacio intermembranal y está anclada a la MI. Una vez que el grupo hemo del complejo III acepta un electrón, el citocromo *c* se moviliza hacia el complejo IV para donar un electrón al centro binuclear del cobre (Hatefi, 1985). La antimicina A bloquea el flujo de electrones de la Q al citocromo *c* mientras que el mixotiazol previene el flujo de electrones de la QH₂ a la proteína Rieske, la cual es una proteína Fe-S componente del complejo del citocromo bc₁ y del complejo del citocromo b₆f (Metzler, 2003).

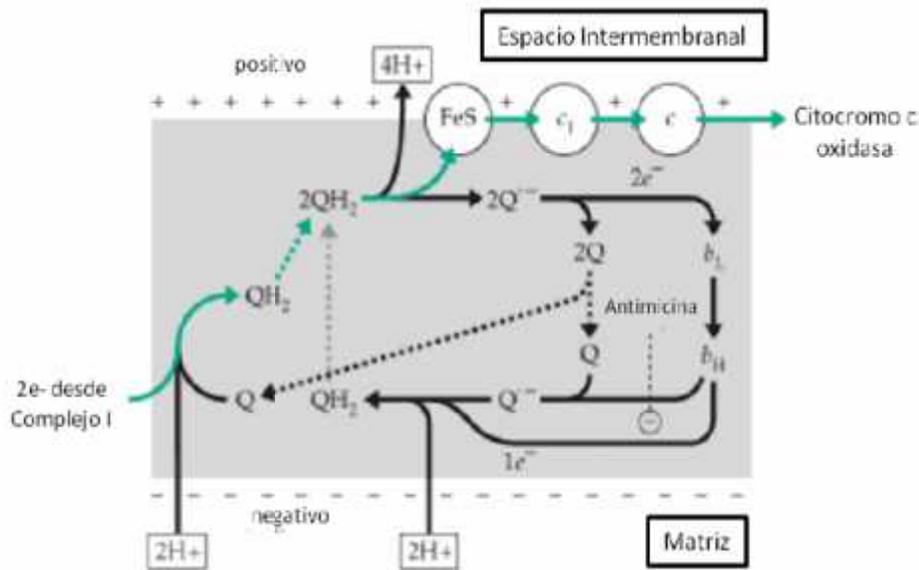


Figura 3. Rutas propuestas sobre la transferencia de electrones en el complejo III, de acuerdo al ciclo de las Q de Peter Mitchell. En este esquema se muestra como la Q es reducida a QH₂ por el complejo I, usando 2 H⁺ provenientes de la matriz mitocondrial. El QH₂ es oxidado en dos pasos con la liberación de 2H⁺ por cada QH₂ al espacio intermembranal. Uno de los electrones es transferido hacia la proteína Rieske (Fe-S) y de ahí pasa al citocromo c₁ y posteriormente al citocromo c. El otro electrón es transferido al grupo hemo b_L del citocromo b, es entonces cuando atraviesa la membrana y pasa al grupo hemo b_H, que reduce a la Q a radical aniónico de Q (Q^{•-}). Posteriormente, un segundo QH₂ es oxidado en la misma forma y el electrón pasa a través del centro del citocromo b y es usado para reducir la Q^{•-} a QH₂, el cual toma otros 2 H⁺ desde la matriz. El resultado neto es el bombeo de 4 H⁺ por cada 2 electrones que pasan a través de este complejo. Modificado de Metzler, 2003.

1.2.1.4 Complejo IV o citocromo c oxidasa.

El citocromo c es un transportador soluble que transfiere electrones al complejo IV. Este complejo está formado por 13 subunidades, que a su vez, conforman 3 subunidades, una de ellas cumple únicamente funciones estructurales, mientras que las otras 2 restantes contienen centros redox: citocromos a y a_3 ; iones Cu (Cu_a^{2+} y Cu_b^{2+}) también iones Mg^{2+} y Zn^{2+} (Metzler, 2003). La citocromo c oxidasa acepta 4 electrones del citocromo c (2 por cada par de electrones), uno a la vez, los cuales emplea para realizar la reducción del oxígeno a agua.



Los electrones entran a través del centro Cu_a^{2+} , pasan por citocromo a , después por el citocromo a_3 y por último al centro Cu_b^{2+} donde se lleva a cabo la reducción del oxígeno (Metzler, 2003), dicha reacción requiere 4 electrones y 4 H^+ , por lo que adicionalmente 4 H^+ son bombeados a través de la membrana interna en cada ciclo catalítico (Hansford *et al.*, 2001).

1.2.1.5 ATP sintasa o F_1F_0 -ATPasa

La ATP sintasa o complejo V, es un gran complejo enzimático que cataliza la formación de ATP a partir de ADP y P_i . Este complejo consta de 16 subunidades las cuales conforman a dos componentes o factores mayoritarios F_1 y F_0 . F_1 es una proteína periférica de membrana, que en condiciones de aislamiento puede catalizar la hidrólisis de ATP (reacción inversa a la síntesis de ATP), mientras que F_0 es una proteína integral de membrana sensible a oligomicina, que tiene un poro protónico a través del cual los (H^+) generados por la CTE pasan hasta llegar a síntesis de ATP. A este complejo también se le conoce como ATPasa o ATP sintasa ya que puede realizar actividades catalíticas distintas, no solo se encarga de sintetizar ATP sino que también lo puede hidrolizar, dependiendo de la dirección del flujo de protones y del estado estructural de la CTE. Por esta razón es importante la correcta estructura mitocondrial para poder tener una adecuada producción de energía. La ATP sintasa ocupa 3 H^+ , que pasan a través de su subunidad C_{10} para realizar un giro de sus subunidades y permitiendo la síntesis de ATP, de esta manera es como se acopla el transporte de electrones con la fosforilación oxidativa (síntesis de ATP) utilizando la FPM acumulada en el espacio intermembranal (Saraste, 1999).

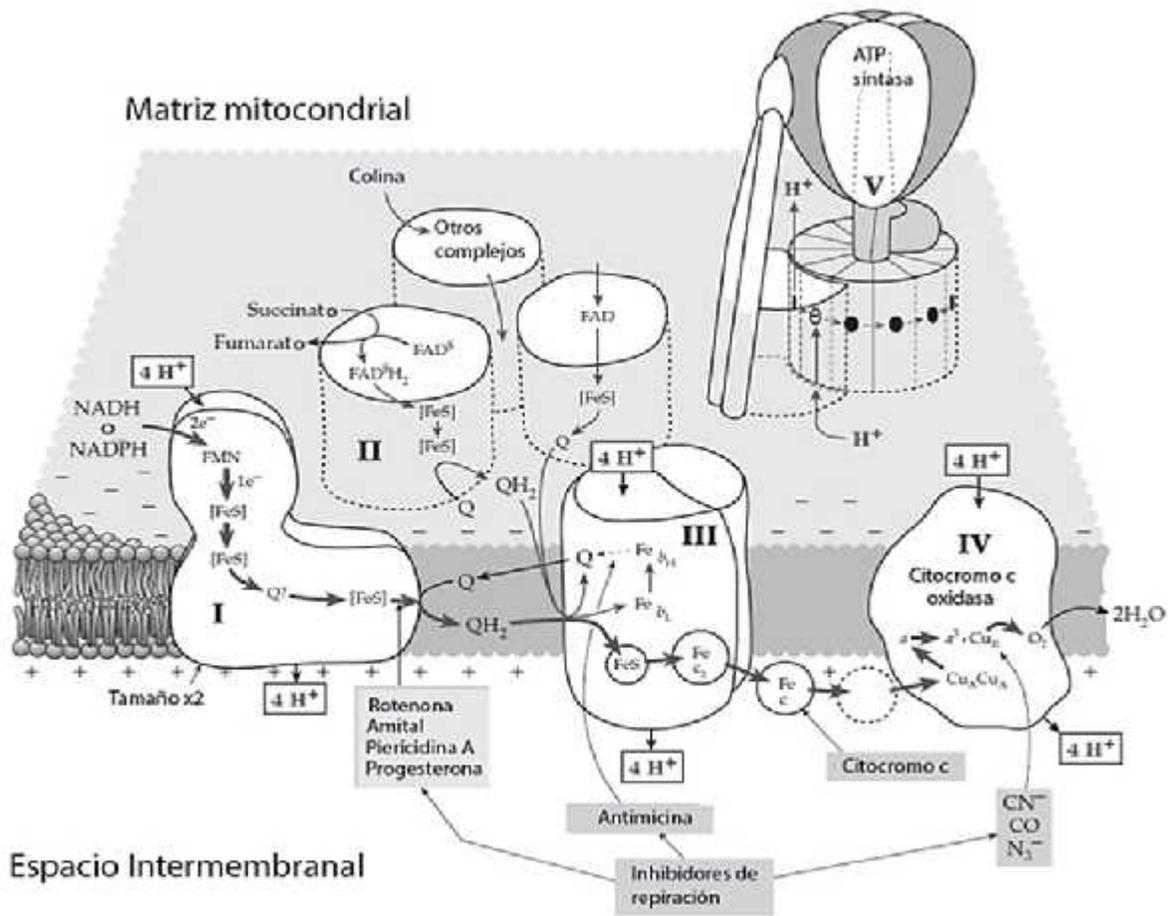


Figura 4. Flujo de electrones a través de la CTE mitocondrial y formación del gradiente electroquímico a partir de los complejos I, III y IV. Se esquematiza el flujo de electrones a través de los diferentes complejos enzimáticos mitocondriales. Además, se pueden observar los diferentes inhibidores específicos de cada uno de los complejos, así como otras fuentes externas de electrones (Modificado de Metzler, 2003).

Como se mencionó anteriormente, el transporte de H⁺ a partir de los complejos mitocondriales I, III y IV crea un gradiente electroquímico, el cual es ácido y positivo en el espacio intermembranal, y negativo y alcalino en el lado de la matriz mitocondrial. La energía almacenada en este gradiente electroquímico se utiliza para: 1) el importe de proteínas y calcio en la mitocondria, 2) para generar calor y 3) para la síntesis de ATP en la matriz mitocondrial. La eficiencia del acoplamiento mitocondrial está determinada tanto por la eficiencia con la cual los H⁺ son bombeados hacia el exterior de la matriz mitocondrial por los complejos mitocondriales, como por la eficiencia con la cual el flujo de protones es convertido a ATP por la ATP sintasa.

Existen diversos compuestos capaces de desacoplar la fosforilación oxidativa de la cadena respiratoria a estos compuestos se le conoce como agentes desacoplantes. Algunos ejemplos son: el 2,4-dinitrofenol (DNP), el carbonilcianuro-p-trifluorometoxi-hidrazona (FCCP) y el carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona (CCCP), los cuales disipan el gradiente electroquímico entre la matriz y el espacio intermembranal, esto provoca que continúe el consumo de oxígeno y la transferencia de electrones pero sin llegar a la síntesis de ATP (Wallace *et al.*, 2010).

1.2.2 Consumo de oxígeno

El consumo de oxígeno en las mitocondrias está regulado no sólo por el aporte de NADH, sino también por los niveles de ADP y P_i . La regulación de la velocidad de la OXPHOS por los niveles de ADP se denomina control respiratorio. Este mecanismo de regulación permite que, cuando los niveles de ADP se incrementan como consecuencia de un gasto de ATP, paralelamente aumenta la velocidad de la OXPHOS para reponer al ATP consumido. Debido a que la OXPHOS está acoplada a la CTE, el incremento en la velocidad de la OXPHOS se refleja en un aumento del flujo de electrones a través de la cadena respiratoria y por lo tanto, un incremento en el consumo de oxígeno.

En condiciones experimentales el control respiratorio puede evaluarse en mitocondrias aisladas de tejido en presencia de oxígeno. Las mitocondrias intactas deben ser incubadas con un medio de sustratos oxidables que le permitan la generación de coenzimas reducidas. Los cambios en la velocidad del consumo de oxígeno se determinan utilizando un electrodo Clark (electrodo sensible a las concentraciones de oxígeno). Monitoreando el consumo de oxígeno en las mitocondrias aisladas se puede determinar cómo responden éstas a la presencia de diferentes sustratos como son succinato, malato-glutamato, ADP y P_i o inhibidores de la CTE como cianuro de potasio (complejo IV), antimicina A (complejo III), rotenona (complejo I) y oligomicina (complejo V) o desacoplantes mitocondriales como son la carbonil-cianida-4-(trifluorometoxi) fenilhidrazona (FCCP). Las variaciones registradas en la velocidad del consumo de oxígeno en presencia de alguna de las sustancias antes mencionadas, se conocen como los estados de respiración mitocondrial (Figura 5).

El estado 1 representa la respiración mitocondrial basal, este estado se mide sólo en presencia de las mitocondrias aisladas y P_i . El estado 2 representa la respiración mitocondrial en presencia de P_i y sustratos de oxidación (succinato o malato-piruvato). El estado 3 es la respiración mitocondrial en presencia de ADP, sustratos de oxidación y P_i . En este estado, la adición de ADP al medio estimula la síntesis de ATP e incrementa la velocidad del transporte de electrones, por lo que incrementa el consumo de oxígeno. El estado 4 comienza cuando todo el ADP añadido ha sido fosforilado, esto provoca una disminución en el consumo de oxígeno por la ausencia de alguno de los sustratos y por lo tanto la respiración se hace lenta. Los diferentes estados metabólicos mitocondriales se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Estados metabólicos mitocondriales

Estado Metabólico	O ₂	Nivel de ADP	Nivel de sustrato	Velocidad de respiración	Factor determinante de la actividad respiratoria
1	Disponible	Bajo	Bajo	Lenta	ADP
2	Disponible	Alto	Muy bajo	Lenta	Sustrato cadena respiratoria
3	Disponible	Alto	Alto	Rápida	Cadena respiratoria
4	Disponible	Bajo	Alto	Lenta	ADP
5	No disponible	Alto	Alto	Nula	Oxígeno

http://www.fmv-uba.org.ar/grado/medicina/ciclo_biomedico/segundo_a%C3%B1o/bioquimica/acro.pdf.

La relación entre los estado 3 y 4 de respiración [Edo3/Edo4], se denomina índice de control respiratorio (ICR), este índice es muy útil para poder estimar la integridad mitocondrial. Otro índice útil para evaluar la actividad mitocondrial es la relación P/O es decir, los moles de ATP sintetizados por mol de oxígeno ($\frac{1}{2}O_2$) usado. Tanto el ICR como la relación P/O son utilizados para expresar el grado de acoplamiento entre los procesos de oxidación y de fosforilación. Los valores bajos de ICR o de índice P/O indican mitocondrias desacopladas o dañadas (Brand y Nicholls, 2011).

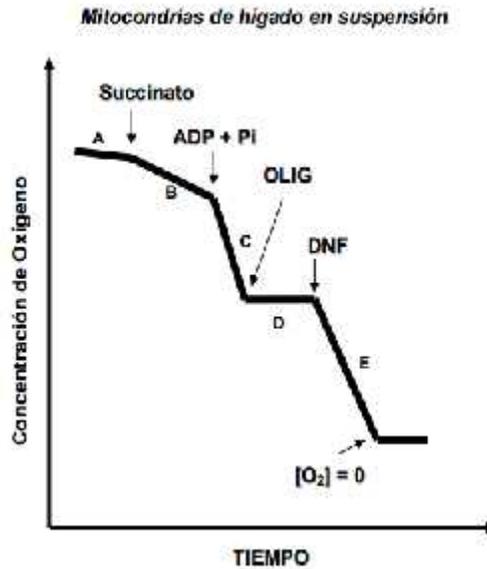


Figura 5. Representación esquemática de los estados de respiración en mitocondrias aisladas de hígado. A. Respiración mitocondrial basal, B. Respiración mitocondrial en presencia de P_i y un sustrato de oxidación como succinato o una mezcla glutamato/malato, C. Respiración en presencia de ADP, P_i y sustrato de oxidación D. Respiración en presencia del inhibidor de la ATP sintasa “oligomicina” E. Respiración máxima en presencia de 2,4 dinitro-fenol (DNF).

1.2.3 Disfunción mitocondrial

La disfunción mitocondrial se define como la incapacidad de las mitocondrias para poder producir ATP de manera adecuada en respuesta a las demandas energéticas del organismo (Brand y Nicholls, 2011). Como se mencionó anteriormente, uno de los agentes causante de disfunción mitocondrial son la generación de ERO. Existen diversos estudios que señalan que los complejos I y III de la CTE son los principales sitios de producción del O₂^{•-} en la mitocondria (Andreyev *et al.*, 2005; Wallace *et al.*, 2010). Sin embargo, otros autores han observado que estos complejos no son los únicos generadores de ERO, ya que se ha descrito que la oxidación de succinato por el complejo II también puede contribuir de manera importante a su producción (Moreno-Sánchez *et al.*, 2013). Además, en condiciones patológicas cuando la CTE es inhibida por alguna alteración en el flujo de electrones o mutación genética en la OXPHOS, se produce un fuga excesiva de electrones, los cuales pueden reducir directamente al oxígeno a O₂^{•-} (Jones, 2006).

De esta manera, el $O_2^{\bullet -}$ que se genera es liberado a la matriz mitocondrial, donde es convertido a H_2O_2 por la superóxido dismutasa dependiente de manganeso (Mn-SOD). Por otra parte, el $O_2^{\bullet -}$ generado por el complejo III es liberado en el espacio intermembranal, donde es convertido a H_2O_2 por la superóxido dismutasa dependiente de cobre-zinc (Cu/Zn-SOD), localizada tanto en el espacio intermembranal como en el citosol (Wallace *et al.*, 2010). Si el H_2O_2 generado por estos dos complejos encuentra a un metal de transición o si se une a $O_2^{\bullet -}$, éste puede llevar a la formación de OH^{\bullet} , el más potente agente oxidante de las ERO, produciendo daño celular a nivel de proteínas, lípidos y ADN. Además, se ha reportado que en condiciones experimentales, la inhibición de las enzimas aconitasa y la α -cetoglutarato deshidrogenasa también pueden generar ERO (Andreyev *et al.*, 2005).

A pesar de que la mayor parte de ERO son formadas en la mitocondria, este organelo también es capaz de generar especies reactivas de nitrógeno (ERN). Cuando las concentraciones de oxígeno son altas, el complejo IV utiliza al oxígeno como aceptor final de electrones. Sin embargo, cuando las concentraciones son bajas, el complejo IV puede reducir el nitrato a óxido nítrico (NO^{\bullet}). El NO^{\bullet} puede reaccionar con el $O_2^{\bullet -}$ llevando a la formación del anión peroxinitrito ($ONOO^-$), el cual puede oxidar a centros Fe-S y sulfhidrilos, los cuales se encuentran presentes en las diferentes enzimas mitocondriales, favoreciendo de esta manera su inhibición. La inhibición o disminución de la actividad de los complejos mitocondriales, genera una disminución en el bombeo de protones de la MI al espacio intermembranal, generando una disminución de la FPM, la cual es necesaria para generar ATP por la mitocondria (Wallace *et al.*, 2010). Además, se ha demostrado que la disfunción mitocondrial es uno de los principales factores asociados a la patogénesis de la enfermedad de Huntington y otros desórdenes neurodegenerativos (Coyle y Puttfarcken, 1993; Beal *et al.*, 1993).

Diversos modelos experimentales de excitotoxicidad han sido utilizados para explorar los mecanismos moleculares involucrados en las enfermedades neurodegenerativas. Uno de estos modelos es la inyección intraestriatal de QUIN, el cual ha sido ampliamente utilizado debido a que reproduce las características bioquímicas, neuropatológicas y conductuales de la enfermedad de Huntington.

1.3 El ácido quinolínico como modelo de neurodegeneración.

El QUIN (ácido-2,3 pyridinadicarboxílico) es un metabolito endógeno formado a partir del catabolismo del L-triptofano (Trp), el cual es sintetizado por la vía de la kinurenina (Figura 6). Esta vía es la principal ruta metabólica del Trp en la mayoría de los tejidos de mamífero, incluyendo el cerebro y es responsable de la producción de NAD^+ y NADP^+ , los cuales participan en múltiples procesos metabólicos (Braidy *et al.*, 2009). Además, en esta vía también se forman varias moléculas neuroactivas siendo el QUIN el más importante en términos de actividad biológica (Zádori *et al.*, 2009). Se ha reportado que un ligero incremento en la producción de QUIN puede provocar neurotoxicidad por diversos mecanismos (Tasset *et al.*, 2010; Pérez de la Cruz *et al.*, 2012).

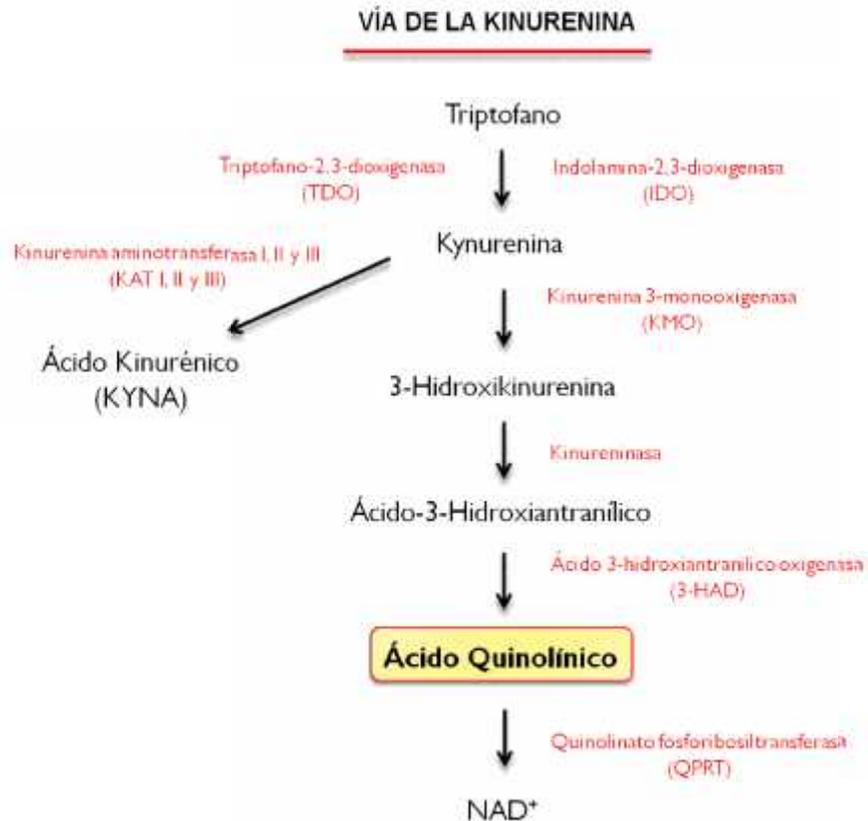


Figura 6. Formación del QUIN por la vía de la kinurenina. Modificado de Schwarcz *et al.*, 2010.

El QUIN actúa como un agonista glutamatérgico de los receptores N-metil-D-aspartato (rNMDA), particularmente en aquellos que contienen las subunidades NR2A y NR2B. Los rNMDA son abundantes en diversos tejidos cerebrales como el hipocampo, el estriado y la capa externa de la corteza cerebral (Severino *et al.*, 2011). Su sobreactivación produce un aumento en el flujo de calcio intracelular que causa alteraciones en los mecanismos de regulación de la neurona, ocasionando una desregulación en la captura de iones de calcio por la mitocondria y el retículo endoplásmico, lo que promueve un desbalance en la homeostasis calcio que da como resultado la activación de las vías metabólicas letales y la generación de ERO (Arundine y Tymianski, 2003). De esta manera, la acumulación de calcio intracelular promueve la activación de proteínas como: 1) la proteasa Calpaína I, la cual es activada en estados tempranos y desestabiliza al citoesqueleto, 2) la activación de endonucleasas las cuales causan fragmentación del ADN y 3) las cinasas dependientes de calcio tales como calmodulina (CaMK) y PKC las cuales pueden alterar la regulación de calcio mediada por los rNMDA y los receptores ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico (rAMPA). Además, la entrada de calcio por los rNMDA induce la activación de la sintasa de óxido nítrico neuronal (nNOS), responsable de la producción de NO*, el cual puede generar daño al ADN y disfunción mitocondrial (Mark *et al.*, 2001). El secuestro de calcio libre intracelular por la mitocondria después de la sobreactivación de los rNMDA conduce a la despolarización del potencial de membrana mitocondrial y la subsecuente inhibición de la cadena de transporte de electrones, lo cual interfiere con la síntesis de ATP e incrementa la producción de radicales libres, induciendo la muerte neuronal por los mecanismos de apoptosis y/o necrosis (Nicholls *et al.*, 1998).

La inyección intraestriatal de QUIN en roedores, produce conducta de giro asimétrica inducida por la administración de apomorfina, un agonista inespecífico de dopamina. Dicha conducta de giro es generada por el desbalance en la señalización de la dopamina entre el hemisferio intacto y el lesionado (Ramaswamy *et al.*, 2007).

1.3.1 Efectos de la inyección intraestriatal de QUIN

Diversos estudios reportan que bajo condiciones fisiológicas la administración de QUIN puede estimular la lipoperoxidación (Ríos y Santamaría, 1991) la cual se ha relacionado con la producción de ONOO^- a tiempos tempranos después de la administración del QUIN (Pérez de la Cruz *et al.*, 2005). Interesantemente, estas alteraciones en las lesiones inducidas por el QUIN son atenuadas por el tratamiento con agentes que favorecen la descomposición de ONOO^- (González-Cortés *et al.*, 2008) o por atrapadores de ERO (Nakao *et al.*, 1996). Además, se ha observado que la administración de QUIN induce la formación de O_2^- (Maldonado *et al.*, 2010) y de OH (Santamaría *et al.*, 2001) a tiempos tempranos, sugiriendo que estos radicales contribuyen al patrón de toxicidad inducido por QUIN. Estos mecanismos pueden explicar en parte como esta neurotoxina ejerce su potencial tóxico mediante la producción de ERO y ERN. Además, se ha demostrado que la inyección intraestriatal de QUIN causa una disminución del sistema antioxidante enzimático y no enzimático. Rodríguez-Martínez *et al.* (2000) observaron que la administración de QUIN reduce de manera significativa la actividad de la enzima SOD-Cu/Zn y los niveles de GSH en un (50%), observando un incremento en los niveles de glutatión oxidado (GSSG). Recientemente, Santana-Martínez *et al.* (2014), reportaron que la inyección intraestriatal con QUIN disminuye los niveles GSH y la actividad de las enzimas GPx y GR. Estos resultados se asociaron con una disminución en los niveles nucleares del factor de transcripción Nrf2. Por otra parte, se ha demostrado que la administración de QUIN no sólo induce estrés oxidante, sino que también induce alteraciones en el metabolismo energético mitocondrial en el estriado de ratas. Bordelon *et al.* (1997), reportaron que la inyección intraestriatal de QUIN, reduce del consumo de O_2 mitocondrial y disminuye los niveles de ATP, NAD^+ , aspartato y glutamato a los tiempos de 6 y 12 h post-lesión, siendo este último donde se observó la disminución más pronunciada. Además, se ha reportado que la administración de QUIN a tiempos tardíos (21 días post-lesión) induce una disminución en la actividad de los complejos mitocondriales I, II y IV (Kalonia *et al.*, 2010).

Debido a que el estrés oxidante y las alteraciones en la función mitocondrial han sido implicados en diversos trastornos neurodegenerativos, el uso de compuestos antioxidantes capaces de disminuir o atenuar sus efectos han sido empleados como una estrategia terapéutica para atenuar su progresión.

1.4 Sistema de defensa antioxidante

El sistema antioxidante es la principal maquinaria capaz de proteger a las células ante un daño oxidante. Los antioxidantes son moléculas capaces de prevenir y/o evitar la oxidación de otra molécula, ya sea por la estabilización de las especies reactivas o bien por la transformación de éstas en configuraciones más estables.

Los antioxidantes pueden ser clasificados por sus origen en endógenos (metabolitos y enzimas) y exógenos (consumidos a través de la dieta); y por su naturaleza y mecanismo de acción en directos, indirectos y bifuncionales (Dinkova-Kostova y Talalay, 2008). Los antioxidantes directos tienen actividad redox, son de corta duración, se consumen durante el proceso y se tienen que regenerar para ofrecer más protección. Los antioxidantes indirectos pueden o no tener actividad redox y exhiben sus efectos antioxidantes a través de la sobreexpresión de proteínas citoprotectoras tales como NAD(P)H:quinona oxidoreductasa 1 (NQO1), superóxido dismutasa (SOD), glutatión S-transferasa (GST), glutatión peroxidasa (GPx), hemo oxigenasa-1 (HO-1), glutamato-cisteína ligasa (GCL), catalasa (CAT) y tioredoxina (Trx) (Holtzclaw *et al.*, 2004). Este tipo de antioxidantes tienen un tiempo de vida media larga, no son consumidos durante su acción antioxidante, pueden catalizar una amplia variedad de reacciones químicas de detoxificación, y están involucrados en la regeneración de algunos antioxidantes directos. Por otra parte, los antioxidantes bifuncionales tienen un papel protector dual ya pueden reaccionar con las ERO de forma directa e instantánea, pero también inducen la producción de proteínas citoprotectoras.

Existen tres principales componentes celulares involucrados en la regulación de la respuesta antioxidante; estos son: la proteína 1 asociada a ECH como Kelch (Keap 1), el factor nuclear relacionado al factor de transcripción eritroide 2 (Nrf2) y los elementos de respuesta antioxidante (ARE). La principal vía de señalización que regula la batería de proteínas citoprotectoras a nivel transcripcional es Keap1-Nrf2-ARE. Aunque esta vía de señalización ha llegado a ser un blanco específico para la prevención y tratamiento de algunas enfermedades asociadas a: estrés oxidante, enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares y metabólicas e inflamatorias, también se sabe que su sobreactivación está implicada en la progresión de algunos padecimientos como el cáncer (Magesh *et al.*, 2012).

Se ha sugerido que algunos de los inductores específicos de Nrf2 podrían funcionar como buenos agentes quimioprotectores contra ERO/ERN (Cuadrado *et al.*, 2009). Existe una gran cantidad de compuestos sintéticos y provenientes de la dieta que activan a Nrf2 de manera eficiente, entre ellos se encuentran el sulforafano (SFN), curcumina, ter-butil hidroquinona (tBHQ), quercetina, ácido nordihidroguaiarético, entre otros. Estos compuestos han mostrado tener un efecto protector en diferentes modelos experimentales, a través de un incremento en los niveles de enzimas antioxidantes inducidos por la vía Keap1-Nrf2-ARE (Tasset *et al.*, 2010; Pérez-Rojas *et al.*, 2011; Magesh *et al.*, 2012; Santana-Martínez *et al.*, 2014). Además, existen elementos esenciales de la dieta que participan en la actividad catalítica de muchas de las enzimas antioxidantes que son importantes para la detoxificación de ERO producidas por el metabolismo celular, entre ellas se encuentra el selenio.

1.4.1 Selenio

El selenio es un elemento traza esencial de la dieta, el cual tiene efectos antioxidantes y neuroprotectores en diferentes modelos de toxicidad. En la naturaleza el selenio puede encontrarse en forma de selenato (Se^{+6}), selenito (Se^{+4}), selenio elemental (Se^0) y selenuro (Se^{-2}). Sin embargo, las formas más biodisponibles en la dieta son la selenometionina y la selenocisteína (Dietary Reference, 2000). En su estructura las selenoproteínas poseen uno o varios átomos de selenio que reemplazan el azufre de los aminoácidos cistina, cisteína y metionina, dando lugar a especies orgánicas de selenio como son: la selenocisteína (SeCys), la selenometionina (SeMet), la selenocistina (SeCys_2), entre otras (Figura 7).

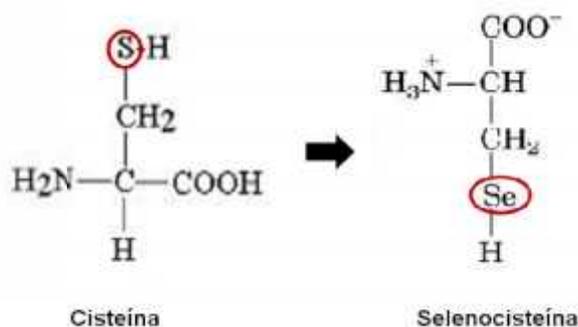


Figura 7. Formación de SeCys a partir de la incorporación del selenio al aminoácido cisteína.

De hecho, el 80% del selenio se incorpora a las selenoproteínas en forma de SeCys, por lo que esta constituye la forma biológicamente más activa (Haweks *et al.*, 1985). La SeCys se encuentra en el sitio activo de todas las selenoenzimas y es esencial para la actividad catalítica de glutatión peroxidasa (GPx), tioredoxina reductasa (TR), iodotironina deiodinasa, metionina sulfóxido reductasa y otras selenoproteínas las cuales modulan el estado redox celular (Chen y Berry, 2003).

1.4.1.1 Metabolismo y biodisponibilidad del selenio

El selenio inorgánico es absorbido por difusión simple a través del tracto gastrointestinal, mientras que la absorción de los complejos como la SeMet (forma principal de la dieta) se realiza por transporte activo a través de la absorción de los aminoácidos (Dietary Reference, 2000). Después de ser absorbido, el selenio se transporta en el plasma unido principalmente a la selenoproteína P (30% del selenio plasmático) y a la selenoproteína W (60% del selenio plasmático), hallándose el resto unido principalmente a la albúmina o hemoglobina de forma no específica, como otros micronutrientes (Allan *et al.*, 1999). Además, se ha reportado que este elemento se distribuye en el hígado, los riñones, el páncreas, el músculo y el cerebro, siendo este último tejido donde se acumula principalmente (Chen y Berry, 2003). La biodisponibilidad del selenio depende de la absorción intestinal y de su conversión en una forma biológicamente activa. Las diferentes formas químicas del selenio siguen rutas metabólicas distintas. La SeMet puede ser incorporada de manera no-específica en proteínas (albúmina y hemoglobina) aleatoriamente en lugar de la metionina. Alternativamente, ésta puede ser trans-selenada a SeCys la cual es convertida a seleniuro de hidrógeno (H_2Se) por una -liasa. El H_2Se formado puede ser convertido a selenofosfato ($HSePO_3^{2-}$) por la selenofosfato sintetasa. El $HSePO_3^{2-}$ al reaccionar con los residuos de serina unidos al tRNA generan SeCys la cual es insertada co-transcripcionalmente en el *loci* que codifica para los codones UGA para generar la síntesis de selenoproteínas. El exceso de selenio es detoxificado por la metilación de H_2Se , dando metil-selenol (CH_3SeH), dimetil selenol ($(CH_3)_2Se$) y ion trimetil selenonio ($(CH_3)_3Se^+$, de los cuales estos dos últimos se excretan por la vía respiratoria y por la orina respectivamente.

La eliminación del selenio es principalmente renal, pero la homeostasis del selenio se consigue mediante la regulación de su excreción urinaria y por vía respiratoria. Por otra parte, el metabolismo de las formas inorgánicas (selenato y selenito) se almacenan directamente en forma de H_2Se , el cual, independientemente de su origen, se utiliza para la formación de $HSePO_3^{2-}$, precursor de las SeCys, que formará parte de las selenoproteínas. Además, se ha reportado que la oxidación excesiva de H_2Se puede conducir a la producción de $O_2^{\bullet-}$ y otras ERO (Figura 8) (Rayman, 2004).

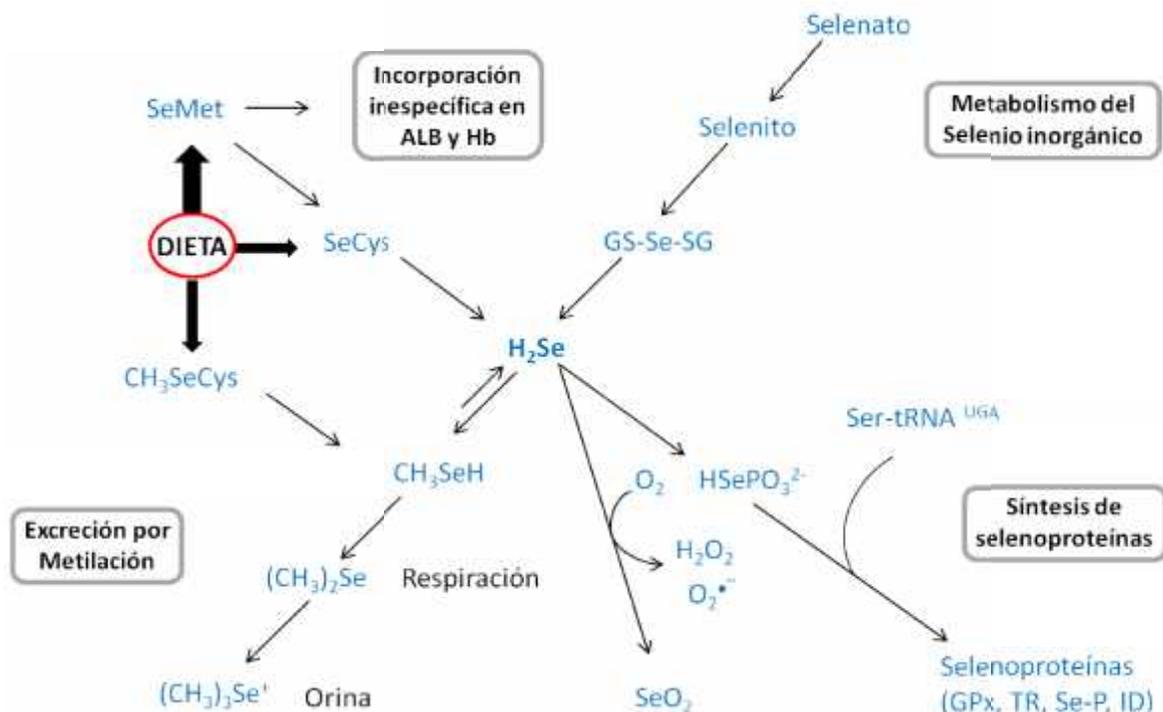


Figura 8. Metabolismo del selenio. SeMet: selenometionina; SeCys: selenocisteína; CH₃SeCys: metil-seleno-cisteína; H₂Se: seleniuro de hidrógeno; CH₃SeH: metil selenol; (CH₃)₂Se: dimetil selenol; (CH₃)₃Se⁺: ión trimetil selenonio; HSePO₃²⁻: selenofosfato; GS-Se-SG: selenodiglutatión; GPx: glutatión peroxidasa; TR: tioredoxina reductasa; Se-P: selenoproteína P y ID: iodotironina deiodinasa; ALB: albúmina; Hb: hemoglobina; SeO₂: dióxido de selenio (Modificado de Rayman, 2004).

1.4.1.2 Función biológica del selenio

El selenio realiza sus funciones biológicas como parte de las selenoproteínas principalmente en forma de SeCys. Ésta se integra en la cadena polipeptídica como un aminoácido más donde contribuye a su actividad catalítica. La función biológica más importante del selenio es como cofactor de los cuatro centros catalíticos de la enzima GPx, de la cual se han descrito cuatro isoformas. Esta enzima utiliza el glutatión para la reducción de hidropéroxidos, protegiendo de esta manera a las membranas y a otras estructuras celulares de la acción de los lipoperóxidos y de otros radicales libres (Mercadal et al., 2005). El selenio en forma de SeCys es oxidado rápidamente por los hidropéroxidos en lo que constituye el primer paso catalítico de la reacción peroxidasa. El mecanismo catalítico de ésta enzima se muestra en la Figura 9. El centro catalítico contiene un residuo de selenocisteína en el que el selenio pasa por un ciclo de oxidoreducción, constituyendo el selenol (E-Se-H) la forma activa que reduce los péroxidos de hidrógeno y orgánicos. Posteriormente, el selenol es oxidado a ácido selénico (E-Se-OH), el cual reacciona con el glutatión reducido (GSH) formando un compuesto derivado del ácido selénico (E-Se-S-G). Un segundo GSH regenera la forma activa de la enzima reaccionando con el E-Se-S-G y formando el glutatión oxidado (GSSG). En conjunto, dos GSH son oxidados para reducir un hidropéroxido (Salinas, 2010).

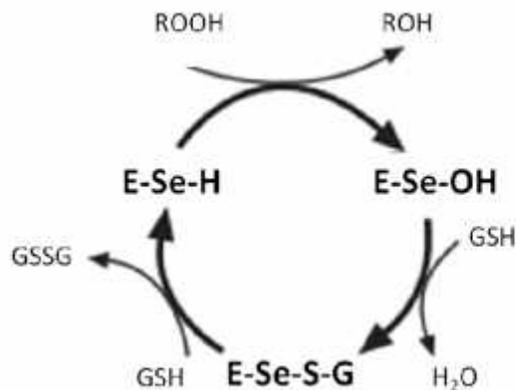


Figura 9. Esquema del mecanismo catalítico de la GPx. E-Se-H: selenol; E-Se-OH: ácido selénico; GSH: glutatión reducido; E-Se-S-G: derivado del ácido selénico; GSSG: glutatión oxidado (Salinas, 2010)

El selenio también es el principal componente para la actividad catalítica de otra proteína con acción antioxidante en los mamíferos, la tioredoxina reductasa (TR). Tanto la GPx como la TR, mantienen la homeostasis redox de las células y participan en una variedad de procesos celulares, utilizando el poder reductor del NADPH (Figura 10). En el sistema tioredoxina, la selenoenzima TR oxida al NADPH, mientras que reduce la forma oxidada de la tioredoxina. La tioredoxina reducida posee múltiples funciones, entre ellas, provee de electrones a enzimas esenciales (por ejemplo a la ribonucleótido reductasa (RR)) y enzimas antioxidantes. Además, participa en el control redox de factores de transcripción y en el plegamiento de proteínas (Salinas, 2010). Existen tres tipos de TR en mamíferos: la citosólica TrxR1, la mitocondrial TrxR2 y la específica de testículos TrxR3, cada una de las cuales contienen un residuo de SeCys. Se ha reportado que la expresión de la TrxR1 y TrxR2 son necesarias para la supervivencia, crecimiento y diferenciación celular, ya que se ha observado que la inactivación de los genes de estas isoformas resulta en letalidad embrionaria y apoptosis masiva (Nonn *et al.*, 2003).

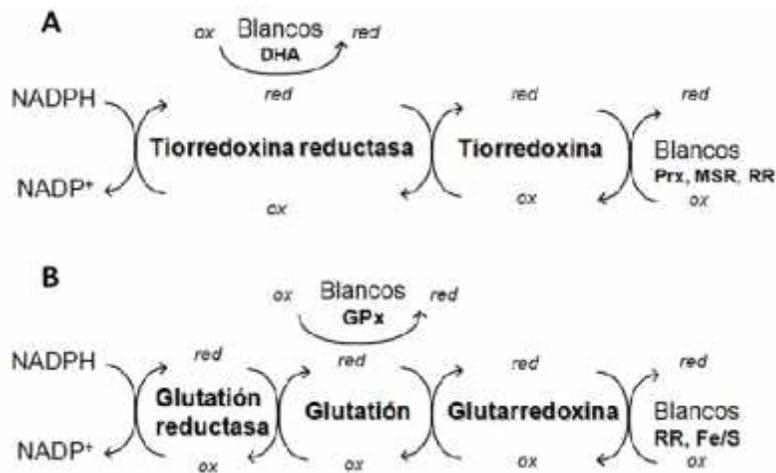


Figura 10. Flujo de electrones en los sistemas tioredoxina y glutatión. En ambos sistemas el NADPH es el donador de electrones. **A.** En el sistema tioredoxina los electrones son cedidos a la TR. La tioredoxina tiene numerosos blancos, entre estos a la peroxirredoxina (Prx), reduce al H₂O₂; la metionina sulfóxido reductasa (MSR), reduce metionina oxidada y la ribonucleótido reductasa (RR), reduce ribonucleótidos. **B.** En el sistema glutatión, los electrones del NADPH son cedidos a la GR, de ésta al GSH y de éste a la glutarredoxina y de esta a diferentes blancos, como a la RR. La glutarredoxina participa además en la biogénesis de centros Fe-S. Además, el GSH puede ceder electrones a la GPx, la cual reduce al H₂O₂ a H₂O y a los hidroperóxidos a alcoholes (Salinas, 2010).

Además de su acción antioxidante, el selenio es necesario para la expresión de al menos 25 selenoproteínas (Kryukov *et al.*, 2003).

1.4.1.3 Efecto protector del selenio en cerebro

Diversos estudios han reportado que la administración de selenito de sodio (Na_2SeO_3) previene el daño neurodegenerativo inducido por diferentes neurotoxinas. Zafar *et al.*, (2003) observaron que el pre-tratamiento con Na_2SeO_3 (0.1-0.3 mg/kg) por 7 días, disminuye la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra inducida por la inyección intraestriatal con 6-hidroxidopamina (6-OHDA). En este mismo año, Santamaría *et al.* (2003), encontraron que la inyección intraperitoneal de Na_2SeO_3 (0.625 mg/kg) por 5 días, disminuye la lipoperoxidación e incrementa la actividad de la GPx en ratas tratadas con QUIN. En un estudio posterior, con las mismas condiciones experimentales, Santamaría *et al.* (2005), observaron que la administración de Na_2SeO_3 también reduce la translocación del factor de transcripción NF- κ B al núcleo y disminuye la activación de la caspasa 3 en el estriado de ratas tratadas con QUIN. Este efecto protector se asoció con un incremento en la actividad de la enzima GPx a 2 y 6 h post-inyección. Estos resultados sugieren que el efecto protector de selenio en la neurotoxicidad inducida por el QUIN está parcialmente mediada por la inhibición de eventos pro-apoptóticos, que posiblemente involucren la activación temprana de GPx. Sin embargo, se ha demostrado que esta enzima no es la única que participa en la neuroprotección mediada por selenio, ya que en un trabajo reciente se encontró que el pre-tratamiento con Na_2SeO_3 (0.625 mg/kg) por 5 días, induce la actividad y expresión temprana de TR durante el daño inducido por QUIN (Maldonado *et al.*, 2012).

A pesar de que el pre-tratamiento con Na_2SeO_3 tiene un efecto protector en diversos modelos de toxicidad, son pocos los trabajos que muestran los efectos de este compuesto sobre la función mitocondrial. Metha *et al.* (2012), observaron que el pre-tratamiento con Na_2SeO_3 (0.2 mg/kg) por 7 días en ratones, previene la pérdida neuronal y reduce el área de daño cerebral inducido por el modelo de isquemia. Este efecto protector se asoció con la preservación de la función mitocondrial, a través de un incremento de los niveles de la proteína (PCG-1) y el factor respiratorio nuclear 1 (NRF1), ambos factores implicados en los procesos de biogénesis mitocondrial.

Aunque este hallazgo sugiere que el pre-tratamiento con Na_2SeO_3 induce preservación de la función mitocondrial, aún se desconoce si este compuesto puede atenuar la disfunción mitocondrial inducida por el QUIN.

1.4.2 Sulforafano (SFN)

Los fitoquímicos son compuestos que se encuentran en alimentos de origen vegetal y que actualmente son reconocidos por sus diferentes efectos biológicos como antioxidantes, anti-alérgicos, anti-inflamatorios, anti-virales, anti-proliferativos y anti-carcinogénicos (Tarozzi *et al.*, 2013). Entre estos fitoquímicos se encuentra el SFN, un isotiocianato natural de la dieta, el cual es sintetizado a partir de la glucorafanina, un precursor encontrado en vegetales crucíferos del género *Brassica* tales como: coliflor, brócoli, repollo y las coles de Bruselas (Fahey y Talalay, 2001).

El principal glucosinolato en el brócoli es la glucorafanina y su hidrólisis enzimática es catalizada por la enzima endógena α -tioglucósido glucohidrolasa (EC 3.2.3.1) también conocida como mirosinasa. Esta enzima se activa durante el masticado, el picado o la preparación para consumo humano del vegetal. Como producto mayoritario de la hidrólisis de la glucorafanina se forma el isotiocianato alifático: SFN (1-isotiocianato-4-(metilsulfinil)-butano), en una reacción dependiente del pH. Dependiendo de las condiciones de reacción, como el pH, la temperatura y la presencia de hierro se pueden formar otros productos como son los tiocianatos y los nitrilos como resultado de reordenamientos intra-moleculares no enzimáticos (Guerrero-Beltrán, 2012) (Figura 11). El brócoli además del SFN, contiene otros componentes bioactivos como flavonoides (quercetina), minerales (selenio) y vitaminas (vitamina C), los cuales están presentes en concentraciones similares, y que son benéficos para el organismo. Recientemente, el SFN ha sido ampliamente estudiado en diversos modelos de toxicidad debido a que se ha reportado que induce un efecto protector ante el daño experimental hepático, renal, cardíaco y neuronal asociado a estrés oxidante (Guerrero-Beltrán *et al.*, 2012). El principal efecto protector del SFN es a través de la producción de enzimas antioxidantes, ya que se ha demostrado que este compuesto presenta baja capacidad de atrapamiento de ERO de manera directa (Gaona-Gaona *et al.*, 2011).

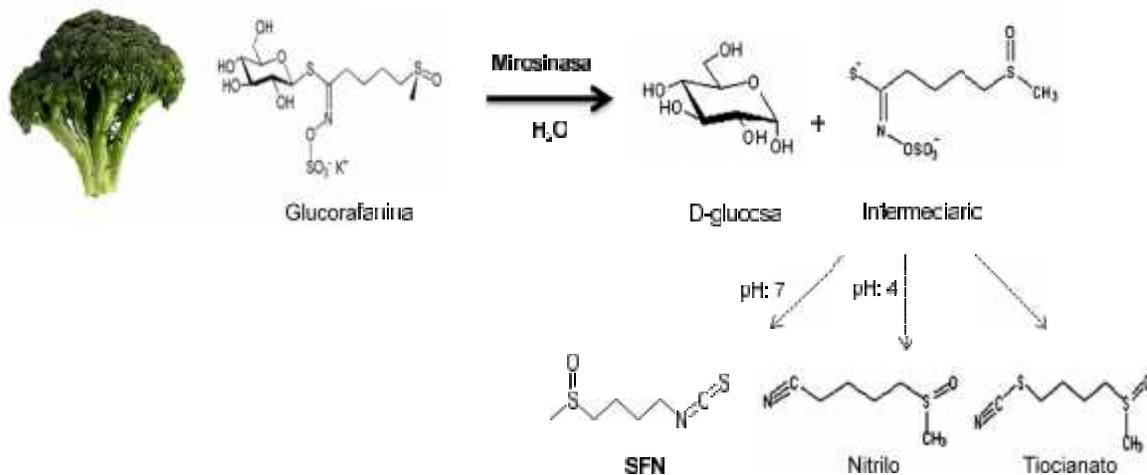


Figura 11. Hidrólisis de la glucorafanina. La glucorafanina es hidrolizada por la enzima mirosinasa formando D-glucosa y SFN. Sin embargo, los tiocianatos y nitrilos pueden ser formados bajo condiciones de acidez (Guerrero-Beltrán *et al.*, 2012).

1.4.2.1 Efecto protector del SFN

Su efecto protector se asocia principalmente a su capacidad para inducir enzimas citoprotectoras a través de la vía Keap1/Nrf2/ARE (Zhang, 2006). Recientemente, se han propuesto dos mecanismos moleculares por los cuales el SFN induce la producción de enzimas detoxificantes de fase II: 1) por la ruptura de las interacciones entre Nrf2-Keap1 y 2) por modulación de vías de señalización mediadas por cinasas, incluyendo a proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) (Figura 12) (Negrette-Guzmán *et al.*, 2013). En el caso de la ruptura de las interacciones entre Nrf2-Keap1, el SFN puede activar esta vía, debido a que el átomo de carbono central que posee ($-N=C=S$) es altamente electrofílico y puede reaccionar rápidamente con los grupos sulfhidrilos para formar un ditiocarbamato. Esta reacción del SFN con los grupos sulfhidrilos de los residuos de cisteína de Keap1, conducen a la disociación del complejo Nrf2/Keap1 (Magesh *et al.*, 2012). Este mecanismo promueve la translocación de Nrf2 al núcleo, modulando de esta manera la expresión de ARE, lo cual induce un incremento en la expresión de algunas enzimas antioxidantes como: NQO1, HO-1 y γ -GCL (Hu *et al.*, 2004).

En el segundo caso, la modulación de diversas vías de señalización mediadas por las MAPK, tales como las reguladas por señales extracelulares (cinasa (ERK) 1/2, la cinasa c-JunNH₂-terminal (JNK), y p38) y las activadas por la vía de cinasas de 3-fosfatidilinositol, por la proteína cinasa B/Akt y la proteína cinasa C (PKC), pueden fosforilar directamente a Nrf2, provocando que se establezca citoplasmáticamente y se transloque al núcleo (Negrette-Guzmán *et al.*, 2013).

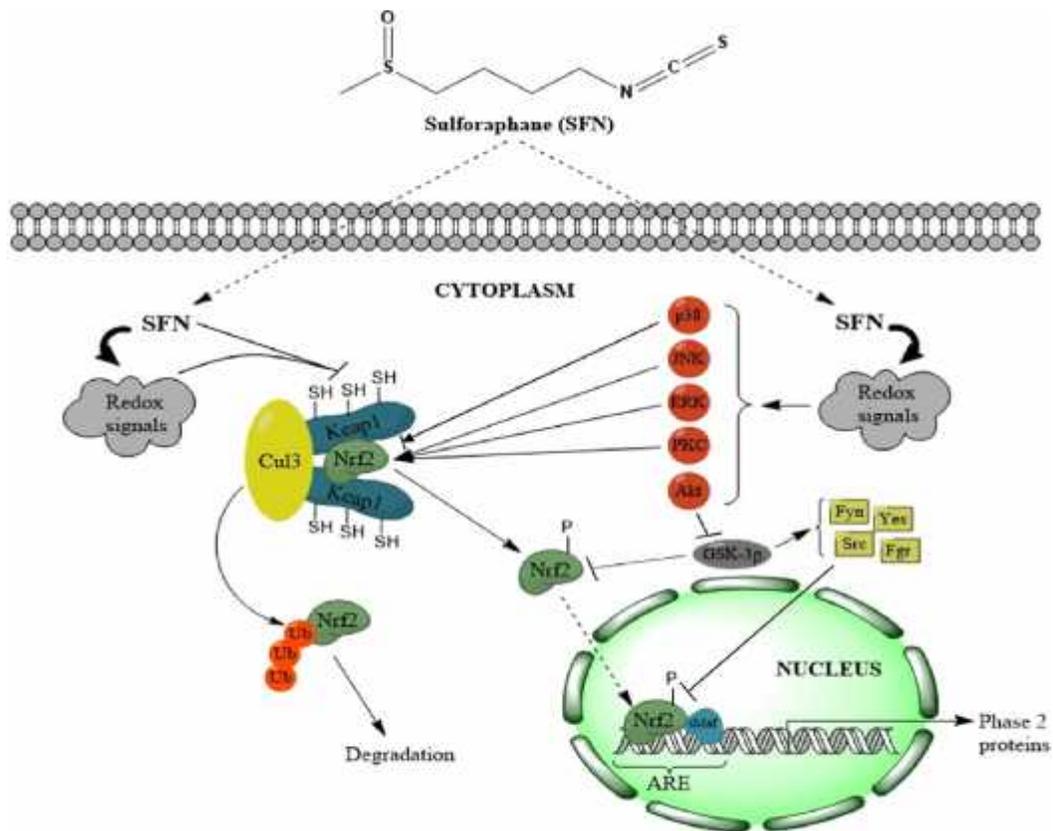


Figura 12. Mecanismos propuestos de cómo el SFN puede llevar a la inducción del factor de transcripción Nrf2 (Negrette-Guzmán, 2013). El SFN puede inducir señales redox que actúan en el complejo Keap1/Nrf2/Cul3 o sobre diferentes cinasas promoviendo la translocación de Nrf2 al núcleo llevando a la producción de proteínas de fase II.

Aunque en la mayoría de los trabajos se ha demostrado que la inducción de enzimas de fase II es el principal mecanismo de protección de SFN, resulta particularmente interesante el hecho de que muchos de los mecanismos citoprotectores relacionados con SFN están asociados con preservar la función mitocondrial (Guerrero-Beltrán *et al.*, 2010; Gaona-Gaona *et al.*, 2011; Juge *et al.*, 2007; Piao *et al.*, 2010; Priya *et al.*, 2011).

1.4.2.2 Efecto protector del SFN en cerebro

Se ha demostrado que el SFN tiene un efecto neuroprotector en modelos asociados con estrés oxidante. En un modelo de isquemia-reperfusión Zhao *et al.* (2006) mostró que la administración de una única inyección intraperitoneal de SFN (5 mg/kg) reduce el área de infarto en ratas, asociado con un incremento en la expresión de HO-1 cerebral. El mismo efecto protector se observó en un modelo de daño cerebral inducido por hipoxia-isquemia en ratas neonatas, en el cual la neuroprotección inducida por SFN se asoció con una disminución en los niveles de 8OH-dG, una supresión en la actividad de caspasa 3, así como una marcada reducción en los niveles de lipoperoxidación (Ping *et al.*, 2010).

Además, como se mencionó anteriormente, se ha demostrado que el SFN no solo presenta un efecto protector contra el estrés oxidante, sino que también evita el daño mitocondrial inducido por diferentes compuestos neurotóxicos. Miller *et al.* (2013) observaron que la administración de SFN (5 mg/kg) en ratones evita la inhibición del complejo I mitocondrial inducido por 4-HNE de manera *ex vivo* en mitocondrias aisladas de la corteza cerebral. Por otro lado, Greco y Fiskum (2010) observaron en mitocondrias aisladas del cerebro de ratas, que la inyección intraperitoneal con SFN (10 mg/kg) 40 h antes del aislamiento, evita la apertura del poro de transición de permeabilidad de la membrana interna mitocondrial (PTPm) que se induce por peróxido, lo que podría contribuir a la neuroprotección observada por SFN.

Además, en un estudio previo a este trabajo, se encontró que la administración de SFN (2 dosis de 5 mg/kg/24h) 30 min antes de la administración de QUIN previene las alteraciones conductuales y el daño histológico inducidas por el QUIN en el estriado de ratas. Este efecto neuroprotector se asoció con el restablecimiento de los niveles de glutatión (GSH) a las 4 h post-inyección, así como con un incremento en la producción de enzimas antioxidantes GPx, GR y -GCL a las 24 h post-inyección (Santana-Martínez *et al.*, 2010).

2. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades neurodegenerativas son un grupo de patologías caracterizadas por la pérdida progresiva y específica de ciertos grupos neuronales. Cada año estas enfermedades afectan aproximadamente a mil millones de personas en todo el mundo y causan 6.8 millones de muertes (WHO, 2006). Las consecuencias y repercusiones socioeconómicas de estos padecimientos son devastadoras, ya que afectan las funciones motoras y sensoriales del sistema nervioso tales como la memoria, el aprendizaje y el lenguaje, lo cual deteriora la calidad de vida de los pacientes. En la actualidad no existe ningún tratamiento capaz de detener la muerte neuronal acelerada en estas enfermedades. Los tratamientos actuales son básicamente sintomáticos. Debido a que la disfunción mitocondrial está asociada con el desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas y a que los antioxidantes SFN y Se son capaces de reducir el daño oxidante causado por QUIN, en el presente trabajo se exploró el efecto de estos antioxidantes sobre las alteraciones mitocondriales inducidas por QUIN en el estriado de la rata. El conocimiento de los mecanismos moleculares que participan en la disfunción mitocondrial generada en estas enfermedades, proporcionará información para encontrar futuros blancos terapéuticos.

3. HIPOTESIS

Dado que los antioxidantes selenio y SFN han demostrado tener un efecto protector en diversos modelos de neurotoxicidad a través de la disminución del estrés oxidante y la preservación de la función mitocondrial, se espera que su administración prevenga la disfunción mitocondrial inducida por QUIN.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Estudiar el efecto de los antioxidantes selenio y SFN sobre la disfunción mitocondrial inducida por la inyección intraestriatal de QUIN en el estriado de ratas.

4.2 Objetivos específicos

Determinar mediante un curso temporal con QUIN los cambios en la funcionalidad mitocondrial a través de la evaluación del consumo de oxígeno, el potencial de membrana, la actividad de los complejos mitocondriales (I, II, III y IV) y la capacidad de síntesis de ATP.

Determinar el efecto de la administración de los antioxidantes selenio y SFN en los diferentes grupos experimentales mediante la evaluación conductual de ratas utilizando la prueba de conducta de giro inducida por apomorfina, 7 días después de la inyección intraestriatal con QUIN.

Determinar a través del análisis histológico el grado de daño tisular en el estriado de los diferentes grupos experimentales.

Determinar la funcionalidad mitocondrial en cada uno de los grupos experimentales a través de la evaluación del consumo de oxígeno, el potencial de membrana, la actividad de los complejos mitocondriales (I, II, III y IV) y capacidad de síntesis de ATP.

5. METODOLOGÍA

5.1 Reactivos

SFN (Cat. No. S8044 lote 2712331) se adquirió en los laboratorios LKT (St. Paul, MN, USA); QUIN (Spectrum Cat. No. Q2014); Na₂SeO₃, ADP, citocromo c, antimicina A, NADP⁺, NADPH, hexocinasa, glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH), succinato de sodio dibásico, 4-(2-hidroxi-etil)piperazina-1-etanosulfónico (HEPES), D-manitol, ácido Bis(2-aminoetil) etilenglicol-N,N,N,N'-tetra acético (EGTA), safranina O, carbonilcianuro-p-trifluorometoxi-hidrazona (FCCP), rotenona, oligomicina A, paraformaldehído, cloruro de magnesio (MgCl₂), clorhidrato de Tris [hidroximetil] aminometano) (Tris-HCl), se adquirieron de Sigma Aldrich (St Louis, MO, EEUU). Manitol, NaOH, Tween 20, sacarosa se adquirieron en reactivos Golden Bell (México). Albúmina sérica bovina (ASB) se adquirió de Armesco (Cochran, Ohio USA). Decilubiquinona se adquirió en Enzo (Farmingdale NY, USA). Cianuro de potasio (KCN) y cloruro de potasio (KCl) se adquirieron en Mallinckrodt (México). Fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄), HCl y metanol se adquirieron de JT Baker (D.F., México). Los demás reactivos fueron grado analítico y se encuentran disponibles comercialmente.

5.2 Animales

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 270-300 g. Los animales se mantuvieron bajo condiciones constantes de temperatura, humedad e iluminación en ciclos 12:12 luz/oscuridad. Se colocaron en cajas de acrílico y se les suministró alimento y agua purificada *ad libitum*. Todos los procedimientos que se llevaron a cabo en las ratas fueron aprobados por el Comité Local de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (FQ/CICUAL/038/12) y se condujeron de acuerdo a los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, para el uso y cuidado de animales de laboratorio.

5.3 Cirugía estereotáxica

A los diferentes grupos experimentales se les realizó una cirugía estereotáxica, que consistió en una inyección intraestriatal de QUIN y/o solución salina dependiendo del grupo experimental. La cirugía se realizó con un equipo estereotáxico con bomba de infusión (Stoelting, Modelo 51500). El QUIN se disolvió en amortiguador de fosfatos salino (PBS) 0.1 M, ajustando su pH a 7.4 con NaOH 0.1 N. Las ratas que se trataron con QUIN recibieron una sola infusión de QUIN (240 nmol/1 μ l) y/o solución salina (1 μ l NaCl 0.9%), en el estriado derecho con una microjeringa Hamilton de 10 μ l, utilizando las siguientes coordenadas estereotáxicas: +0.5 mm anterior a bregma, -2.6 lateral a bregma y +4.5 mm ventral a la dura (Paxinos y Watson, 2007). Al término de la cirugía se le administró a cada animal 2.5 ml de solución Hartmann para su hidratación.

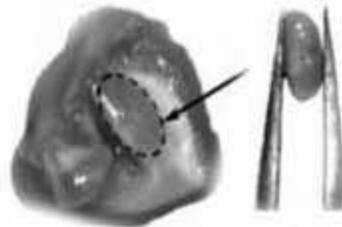
Estrategia experimental

Este proyecto se dividió en dos etapas, la primera fue determinar el tiempo en el cual el QUIN induce alteraciones en la función mitocondrial del estriado, la segunda etapa tuvo la finalidad de evaluar el efecto de la administración previa de los antioxidantes selenio y SFN sobre las alteraciones mitocondriales inducidas por QUIN en el estriado de ratas.

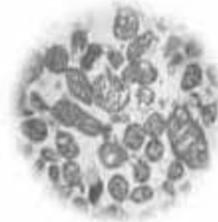
5.4 Curso temporal de QUIN

Se realizó un curso temporal a 2, 4, 8, 16 y 24 h con QUIN. Para ello, los animales se separaron aleatoriamente en grupos experimentales de 6-8 animales. A cada grupo de animales se les realizó la cirugía estereotáxica con 240 nmol/1 μ l de QUIN con su respectivo grupo sham (1 μ l de NaCl 0.9%). Posteriormente, los animales de cada grupo experimental se sacrificaron en los tiempos establecidos y se les realizó la disección del estriado dañado para proceder al aislamiento de la fracción mitocondrial, donde se determinó el índice de control respiratorio, el potencial transmembranal, la actividad de los complejos I, II, III y IV y la capacidad de síntesis ATP (complejo V), como se muestra en la Figura 13.

Temporal QUIN (n=6-8/grupo)
Sham
2 h
4 h
8 h
16 h
24 h



2. Disección del estriado



3. Aislamiento de la fracción mitocondrial



4. Análisis de la fracción mitocondrial

Consumo de oxígeno

Potencial transmembranal

Actividad de complejos I-IV

Capacidad de síntesis ATP

Figura 13. Esquema del curso temporal con QUIN.

5.5 Esquema de administración de selenio y SFN

Para evaluar el efecto de los antioxidantes selenio y SFN sobre la función mitocondrial, se dividieron a los animales en 3 grupos experimentales para selenio y 4 grupos experimentales para SFN de la siguiente manera:

Selenio

- 1) Grupo Sham: tratado con vehículo *i.p.* (solución salina) + una inyección intraestriatal con solución salina (1 μ l).
- 2) Grupo QUIN: tratado con vehículo *i.p.* + una inyección intraestriatal con QUIN (240 nmol/1 μ l).
- 3) Grupo QUIN+Na₂SeO₃: tratado con Na₂SeO₃ (0.623 mg/kg) por 9 días + una inyección intraestriatal con QUIN (240 nmol/1 μ l).

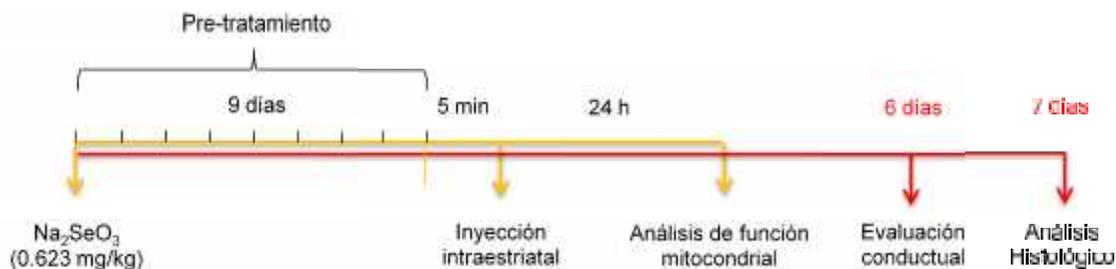


Figura 14. Esquema de administración de selenio.

SFN

- 1) Grupo Sham: tratado con vehículo i.p. (DMSO 2% + solución salina) + una inyección intraestriatal con solución salina (1 μ l).
- 2) Grupo QUIN: tratado con vehículo i.p. + una inyección intraestriatal con QUIN (240 nmol/1 μ l).
- 3) Grupo SFN: tratado con 2 dosis de SFN (5 mg/kg) + una inyección intraestriatal con solución salina (1 μ l).
- 4) Grupo QUIN+SFN: tratado con 2 dosis de SFN (5 mg/kg) + una inyección intraestriatal con QUIN (240 nmol/1 μ l).

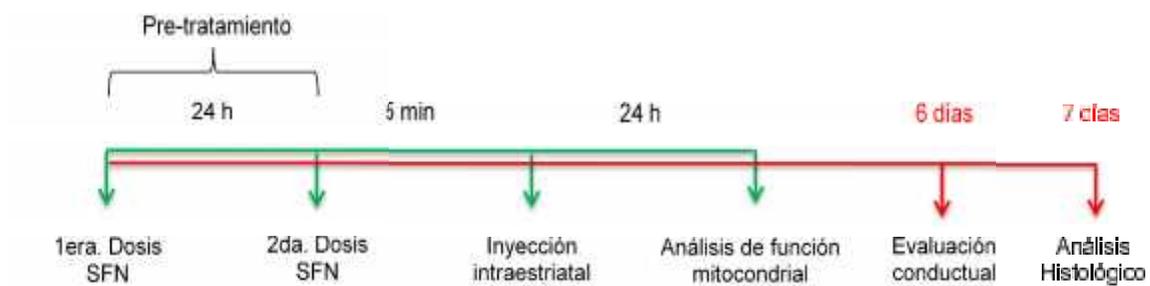


Figura 15. Esquema de administración de SFN.

El SFN se preparó en DMSO al 2% y se administró disuelto en NaCl al 0.9%. El Na_2SeO_3 se disolvió en agua destilada y el pH se ajustó a 7.0. Cinco minutos después de la última administración de selenio o SFN, los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (50 mg/kg), y posteriormente se les realizó la inyección intraestriatal a cada grupo.

Un grupo independiente de ratas recibió el tratamiento con selenio o SFN, para evaluar las alteraciones conductuales y realizar el análisis histológico de cada grupo experimental.

5.6 Aislamiento de la fracción mitocondrial:

Las mitocondrias se aislaron por el método reportado Chinopoulos *et al.* (2011), con algunas modificaciones. Después de realizar la cirugía estereotáxica, las ratas fueron sacrificadas por decapitación y el cerebro se extrajo rápidamente en hielo. Posteriormente, se disectó el estriado lesionado, y se homogenizó en amortiguador MSEGTA que contiene: manitol 225 mM, sacarosa 75 mM, HEPES 10 mM y EGTA 1 mM, disuelto en agua desionizada y ajustado a pH 7.4. El estriado se homogenizó en 2 ml de amortiguador MSEGTA y luego se transfirió a tubos eppendorf. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 500 g por 5 minutos. El sobrenadante obtenido se recentrifugó a 14,000 g por 10 minutos y el pellet resultante se resuspendió en amortiguador de aislamiento adicionado con digitonina al 10% para ser sometido a un paso más de centrifugación a 14,000 g por 10 minutos. La fracción mitocondrial se purificó utilizando un gradiente de Percoll, para lo cual el pellet obtenido en el paso anterior se resuspendió en 0.2 ml de Percoll al 12%. Éste volumen se transfirió cuidadosamente sobre 1 ml de Percoll al 24% y se centrifugó a 18,000 g por 15 minutos. Posteriormente, se retiró 0.7 ml de amortiguador y se le adicionaron 1.2 ml de MSEGTA, se mezclaron por inversión y se centrifugaron a 18,000 g por 5 minutos. Como último paso, se retiró 1.5 ml de amortiguador y se le adicionaron 1.5 ml de MSEGTA, se mezclaron por inversión para finalmente centrifugarlos a 14,000 g por 10 minutos. En el pellet se obtuvo la fracción mitocondrial purificada que fue resuspendida en 0.05 ml de amortiguador de aislamiento sin EGTA para alcanzar una concentración de proteína de 4-6 mg/ml.

5.7 Determinación de proteína

El contenido de proteína de la fracción mitocondrial aislada se determinó utilizando el método reportado por Lowry (1951). Este método se basa en la reducción del reactivo Folin-Fenol por la oxidación de aminoácidos aromáticos presentes en las proteínas, en una reacción catalizada por cobre. El ensayo se llevó a cabo utilizando una dilución 1:100 de la fracción mitocondrial y los valores obtenidos se extrapolaron a una curva estándar de ASB. Las muestras se midieron a 660 nm y el resultado se expresó en mg de proteína/ml.

5.8 Respiración mitocondrial

La respiración mitocondrial se determinó a través del consumo de oxígeno en la fracción mitocondrial aislada, usando un electrodo tipo Clark inmerso en una cámara con agitación y temperatura regulada (Strathkelvin). El ensayo se llevó a cabo en 0.15 ml de medio de respiración para mitocondrias que contiene: sacarosa 70 mM, manitol 220 mM, $MgCl_2$ 5 mM, KH_2PO_4 10 mM, HEPES 25 mM, EGTA 1 mM y BSA 0.2% a pH 7.4. Se adicionó de 40-80 μg de proteína mitocondrial a este medio, posteriormente se agregó el sustrato de oxidación succinato (10 mM) con rotenona (5 mM) para determinar el consumo de oxígeno a partir del complejo II. La respiración en el estado fosforilante (estado 3) se inició después de adicionar ADP a una concentración final de 100 μM . Una vez consumido el ADP (estado 4), se adicionó el inhibidor de la ATP sintasa “oligomicina A” para llegar al estado desacoplado. El índice de control respiratorio (ICR) se calculó mediante la división de las tasas del consumo de oxígeno de los estados 3 y 4 [Edo 3/Edo 4], esta estimación proporciona la tasa de acoplamiento entre la síntesis de ATP y el flujo de electrones. Los valores de ICR ≥ 2 indican mitocondrias desacopladas, mientras que los $ICR > 3$ se detectan en mitocondrias acopladas (Brand y Nicholls, 2011).

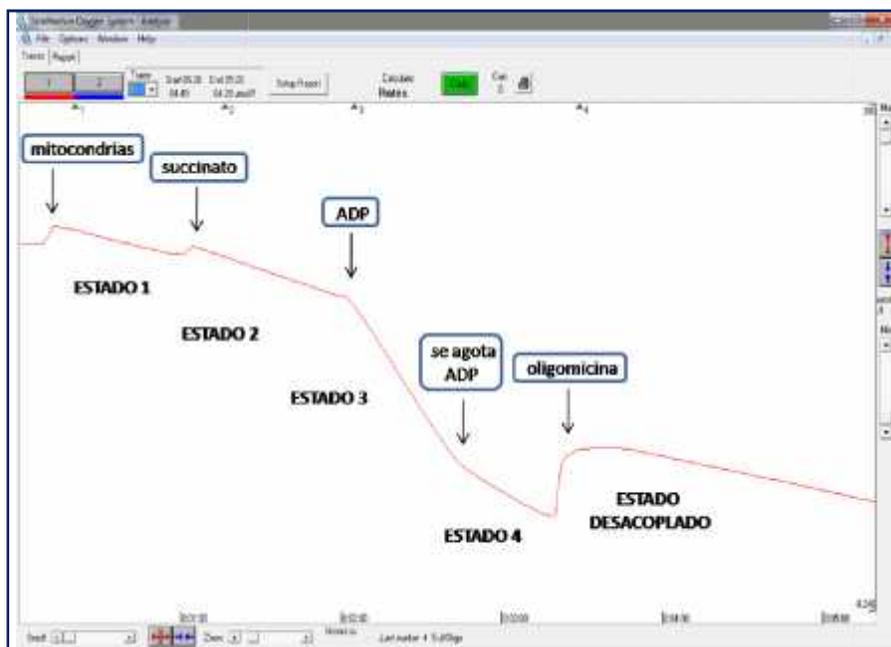


Figura 16. Trazo de oximetría de mitocondrias aisladas de estriado. El esquema muestra los diferentes estados de respiración en una muestra representativa del grupo Sham, utilizando succinato como sustrato para alimentar a la CTE por el complejo II.

5.9 Potencial transmembranal (ψ)

El potencial de membrana mitocondrial se determinó por el método descrito por Cano-Ramírez *et al.* (2012). Esta determinación se basa en el monitoreo de los cambios de fluorescencia de la Safranina O (compuesto catiónico liposoluble) que se registran al disipar el gradiente de protones en la mitocondria. La determinación se llevó a cabo en un medio que contenía Safranina O a una concentración 20 μM , con la posterior adición de 25 μg de proteína mitocondrial y succinato 140 μM como sustrato para alimentar a la CTE a través del complejo II. Los cambios en la fluorescencia se midieron en un espectrofluorómetro a $\lambda = 495$ y $\lambda = 586$ nm de excitación y emisión, respectivamente. Finalmente, el potencial se disipó al adicionar FCCP 200 μM y se calculó la diferencia de la fluorescencia medida entre la adición de los sustratos y la del FCCP. Los resultados se expresaron como el cambio en las unidades de fluorescencia/mg proteína ($\Delta \text{UF}/\text{mg}$ proteína).

5.10 Actividad enzimática de los complejos mitocondriales

Actividad del complejo I

La actividad del complejo I se determinó por el método descrito por Long *et al.* (2009), el cual se basa en la reducción del 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP), un aceptor artificial de electrones. El DCPIP es reducido cuando recibe a los electrones provenientes de la oxidación de la decilubiquinona a ubiquinol por el complejo I, que transfiere a su vez los electrones a partir del NADH provisto en la reacción (Figura 17). El ensayo se llevó a cabo utilizando una mezcla de reacción que contenía: DCPIP 160 μM , NADH 80 μM , ASB 3 mg/ml, Q 60 μM , antimicina A 2 μM y KCN 2 mM, disuelto en amortiguador de fosfato de potasio 10 mM ajustado a pH 7.4. La reacción se inició por la adición de 20 μg de proteína mitocondrial y la disminución en la absorbancia del DCPIP fue seguida a 600 nm por 3 min en un lector de placas (Biotek). En una reacción paralela, se determinó la actividad insensible a rotenona al adicionar rotenona 4 μM a la mezcla de reacción. Los cálculos para obtener la actividad se realizaron con el coeficiente de extinción molar del DCPIP ($19.1 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Actividad del complejo II

La actividad específica la enzima SDH se determinó, al igual que la actividad del complejo I, por la reducción del DCPIP en un ensayo espectrofotométrico previamente descrito por Kirby *et al.* (2007). Las mitocondrias aisladas se sometieron a ciclos de congelación-descongelación en nitrógeno líquido para incrementar la exposición de la enzima a los sustratos. El ensayo se llevó a cabo utilizando una mezcla de reacción que contenía: DCPIP 50 μM , succinato 20 mM, antimicina A 2 μM , rotenona 5 μM , KCN 2 mM y 20 μg de proteína mitocondrial en amortiguador de fosfatos de potasio 20 mM ajustado a pH 7.4. La reacción se inició adicionando decilubiquinona 50 μM . La reducción del DCPIP se monitoreó a 600 nm durante 5 minutos en un lector de placas (Biotek). Para realizar los cálculos de la actividad se utilizó el coeficiente de extinción molar del DCPIP ($19.1\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

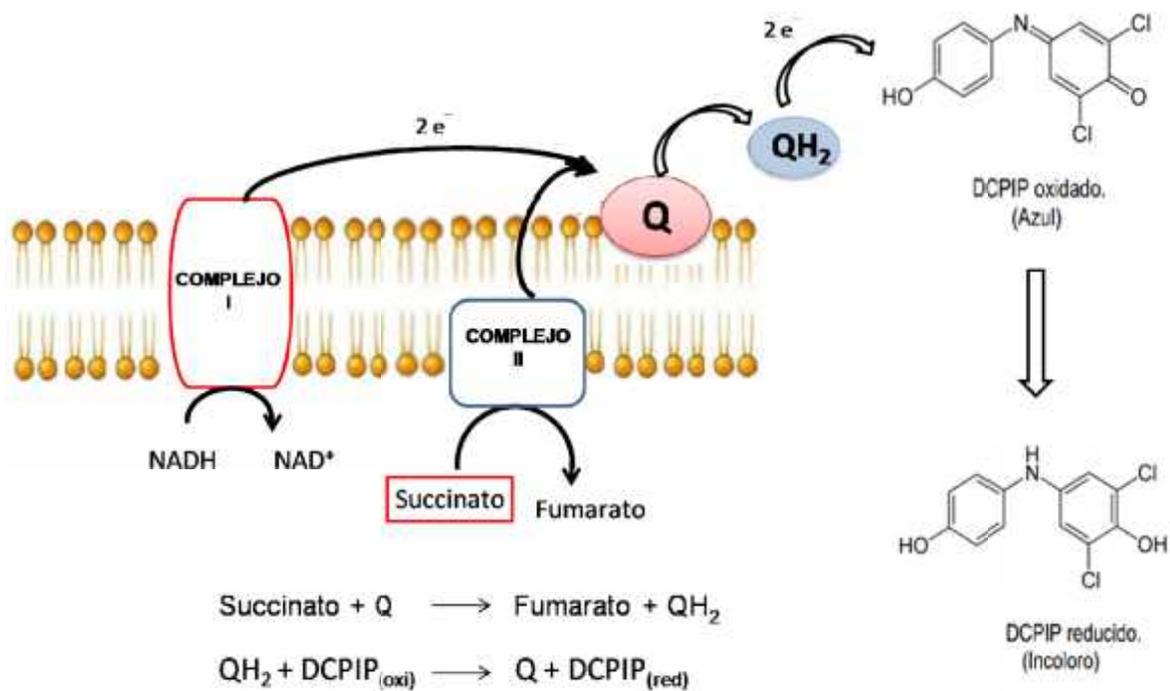


Figura 17. Método utilizado para determinar la actividad de los complejos I y II de la CTE. La reducción del DCPIP comienza cuando el Ubiquinol (QH₂), forma oxidada de la Ubiquinona (Q), es reoxidado por el DCPIP presente en el medio de reacción.

Actividad del complejo III

La actividad del complejo III se evaluó a través de un ensayo espectrofotométrico previamente descrito por Spinazzi *et al.* (2012). Esta técnica se basa en la reducción del citocromo *c* por el complejo III, la reacción se monitoreó a 550 nm, debido a que a esta longitud de onda sólo puede ser detectado el citocromo *c* en su forma reducida, por lo que se observa un aumento en la absorbancia a medida que este compuesto se reduce. El ensayo se llevó a cabo utilizando una mezcla de reacción que contenía: citocromo *c* oxidado 75 μM , KCN 500 μM , EDTA 100 μM , ajustado a pH 7.5, Tween-20 (0.025%) y 2.5 μg de proteína mitocondrial en amortiguador de fosfatos 25 mM a pH 7.5. La reacción se inició al agregar una solución de ubiquinol (QH_2) 100 μM . Inmediatamente se observó un incremento en la absorbancia a 550 nm el cual fue medido durante 2 min. La actividad específica de este complejo se calculó por la diferencia entre la actividad total del complejo III menos la actividad producida adicionando antimicina A 10 μM como inhibidor específico y se expresó como nmol/min/mg de proteína total. Para calcular la actividad se utilizó el coeficiente de extinción molar del citocromo *c* reducido ($18.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Actividad del complejo IV

La actividad del complejo IV se evaluó a través de un ensayo espectrofotométrico previamente descrito por Spinazzi *et al.* (2012), registrando la oxidación del citocromo *c* reducido mediante la disminución de la absorbancia a 550 nm durante 2 minutos. El ensayo se llevó a cabo utilizando una mezcla de reacción que contenía: citocromo *c* reducido 60 μM , en amortiguador de potasio 25 mM ajustado a pH 7.0. La reacción se inició al agregar 2.5 μg de proteína mitocondrial. La actividad específica de este complejo se estimó por el porcentaje de inhibición con KCN 10 μM y se expresó como nmol/min/mg de proteína total. Para realizar los cálculos de la actividad se utilizó el coeficiente de extinción molar del citocromo *c* reducido ($18.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

5.11 Capacidad de síntesis de ATP

La capacidad de síntesis de ATP se midió indirectamente a través de un ensayo enzimático acoplado a enzimas previamente descrito por Cano-Ramírez *et al.* (2012), que se basa en la detección del incremento en la producción de NADPH a partir de NADP⁺ (Figura 18). Para llevar a cabo este ensayo, se adicionó 20 µg de proteína mitocondrial a una mezcla de reacción que contenía: hexocinasa 4.5 U/ml, G6PDH 2 U/µl, glucosa 22 mM, NADP⁺ 1.4 mM y succinato 15 mM. La producción de NADPH se registró a partir de la adición de ADP 100 µM. El cambio en la absorbancia debido a la reducción de NADP⁺ se midió a 340 nm en un lector de placas (Biotek). El ATP proveniente de otras fuentes independientes de la CTE, se descartó al realizar el ensayo en presencia de oligomicina A. Para realizar los cálculos de la actividad se utilizó el coeficiente de extinción molar del NADPH (6,622 M⁻¹ cm⁻¹).

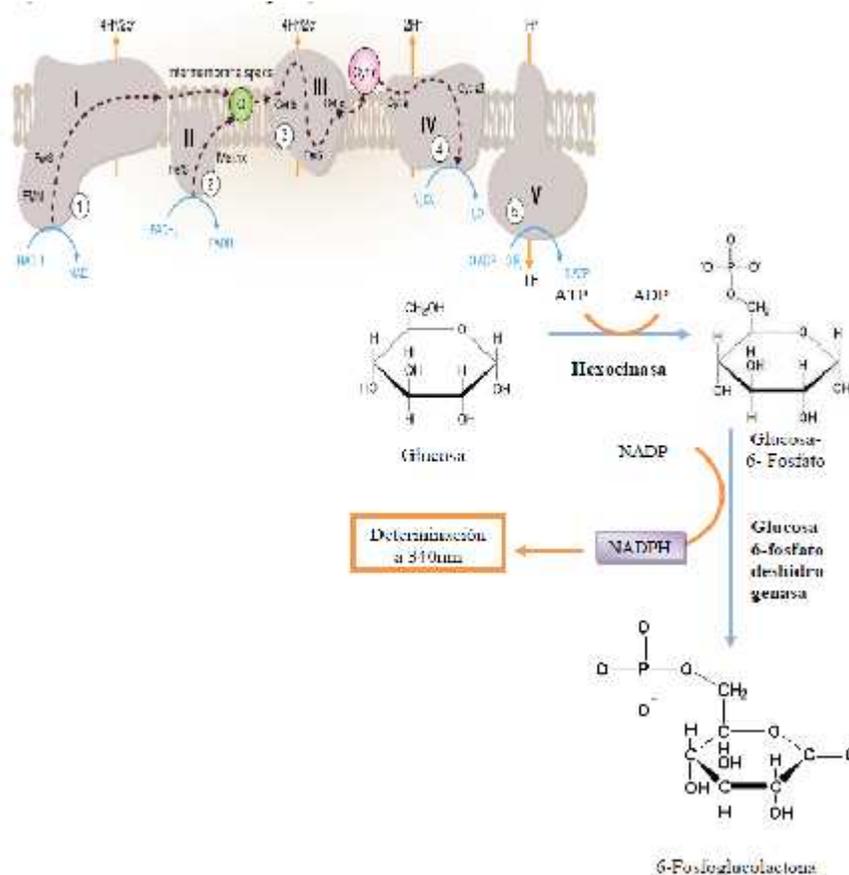


Figura 18. Método utilizado para detectar la síntesis de ATP. El ATP formado por la ATPasa es utilizado por la enzima hexocinasa para transformar la glucosa a glucosa 6-fosfato, ésta última es transformada en 6-fosfogluconato, por la enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), la cual reduce a la par a la coenzima NADP⁺ a NADH.

5.12 Conducta de giro

Las alteraciones conductuales de cada grupo se evaluaron mediante la prueba de conducta de giro inducida por apomorfina, de acuerdo a lo previamente descrito por Santana-Martínez *et al.* (2014). Seis días después de la inyección con QUIN, a cada uno de los grupos experimentales se les administró apomorfina (1 mg/kg) de manera subcutánea y se separaron en cajas de policarbonato individuales. Cinco minutos después, se cuantificó el número de giros ipsilaterales al lado lesionado durante 1 h. Cada giro se definió como un giro completo de 360°. Los datos se expresaron como el número total de giros ipsilaterales por hora.

5.13 Análisis histológico

Para realizar el análisis histológico, los animales fueron perfundidos 7 días después de la inyección intraestriatal con QUIN. Para este fin, los animales de todos los grupos experimentales fueron anestesiados con una dosis letal de pentobarbital (0.5 ml *i.p.*) y se perfundieron transcardialmente con solución NaOH 0.9% + heparina (2000 U/L v/v), seguido de paraformaldehído al 4% a 4°C. Los cerebros se removieron y se post-fijaron en paraformaldehído al 4% por 3 días para incluirlos posteriormente en parafina. Los tejidos se cortaron en un micrótopo HistoStat 820 (American Instrument Exchange, Inc., Haverhill, MA, USA). Las secciones estriatales se cortaron con un grosor de 5 µm con espacios de 100 µm, para cubrir una distancia total de 300 µm (100 µm anterior y 100 µm posterior al sitio de inyección). Se tomaron 10 cortes de la parte inicial, 10 de la parte media y 10 de la parte final de la lesión. Las secciones se tiñeron con hematoxilina-eosina para visualizar la arquitectura del parénquima neuronal y las demás estructuras.

5.14 Análisis estadístico

Los datos se analizaron con el programa estadístico Prism 6 (GraphPad, San Diego, USA), mediante una prueba ANOVA de una vía seguida de la prueba de comparaciones múltiples: Dunnet, cuando se analizó el curso temporal de QUIN y Bonferroni para el resto de los experimentos. Los valores se expresaron como el promedio \pm error estándar de la media (EEM), las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a valores de $p < 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1 Análisis ultraestructural de la fracción mitocondrial.

La calidad de la fracción mitocondrial aislada de estriado se estimó por microscopía electrónica (Figura 19). El método de purificación de la fracción mitocondrial a través de gradiente de Percoll mejora la obtención del número de mitocondrias, así como también favorece la eliminación de detritos celulares. Como se muestra en las imágenes, las membranas interna y externa, así como las crestas transversales mitocondriales se encuentran bien conservadas, lo cual es un indicativo de preservación mitocondrial.

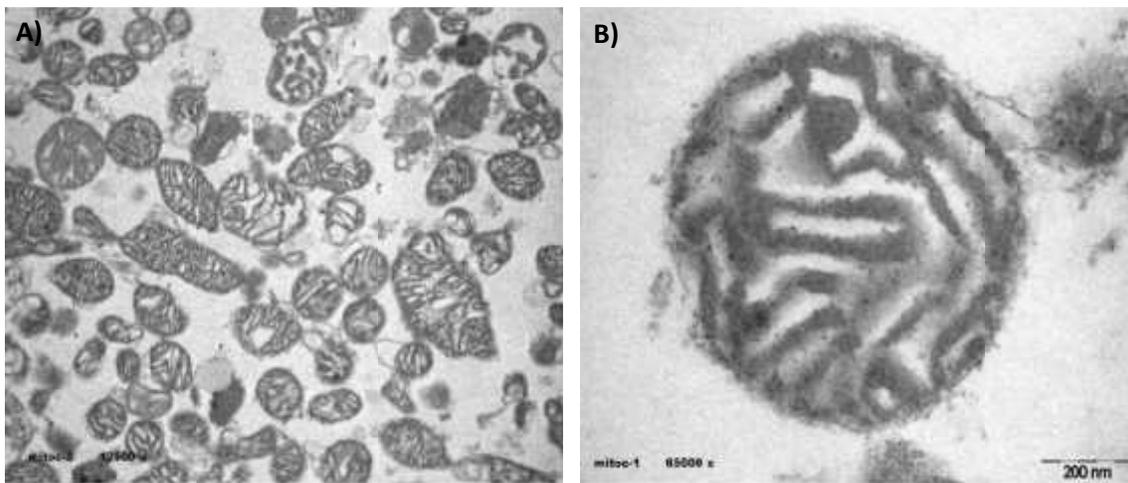


Figura 19. Análisis ultraestructural de la fracción mitocondrial aislada de tejido estriado. A) Aspecto panorámico que muestra la heterogeneidad mitocondrial, B) Muestra representativa de una mitocondria en la que se aprecia su integridad ultraestructural, barra representativa 200 nm.

6.2 Curso temporal de QUIN en mitocondrias aisladas del estriado.

Con el objeto de determinar si la inyección intraestriatal con QUIN induce cambios a tiempos cortos en la función mitocondrial en el estriado, se realizó un curso temporal a 2, 4, 8, 16 y 24 h, en las que se midió el consumo de oxígeno, potencial transmembranal, capacidad de síntesis de ATP y actividad de los complejos mitocondriales I, II, III y IV.

6.2.1 El QUIN disminuye el consumo de oxígeno mitocondrial.

Los efectos de la administración de QUIN sobre el consumo de oxígeno se determinaron a través del análisis de oximetría de los estados 3 y estado 4 de la respiración, utilizando succinato como sustrato de oxidación (complejo II).

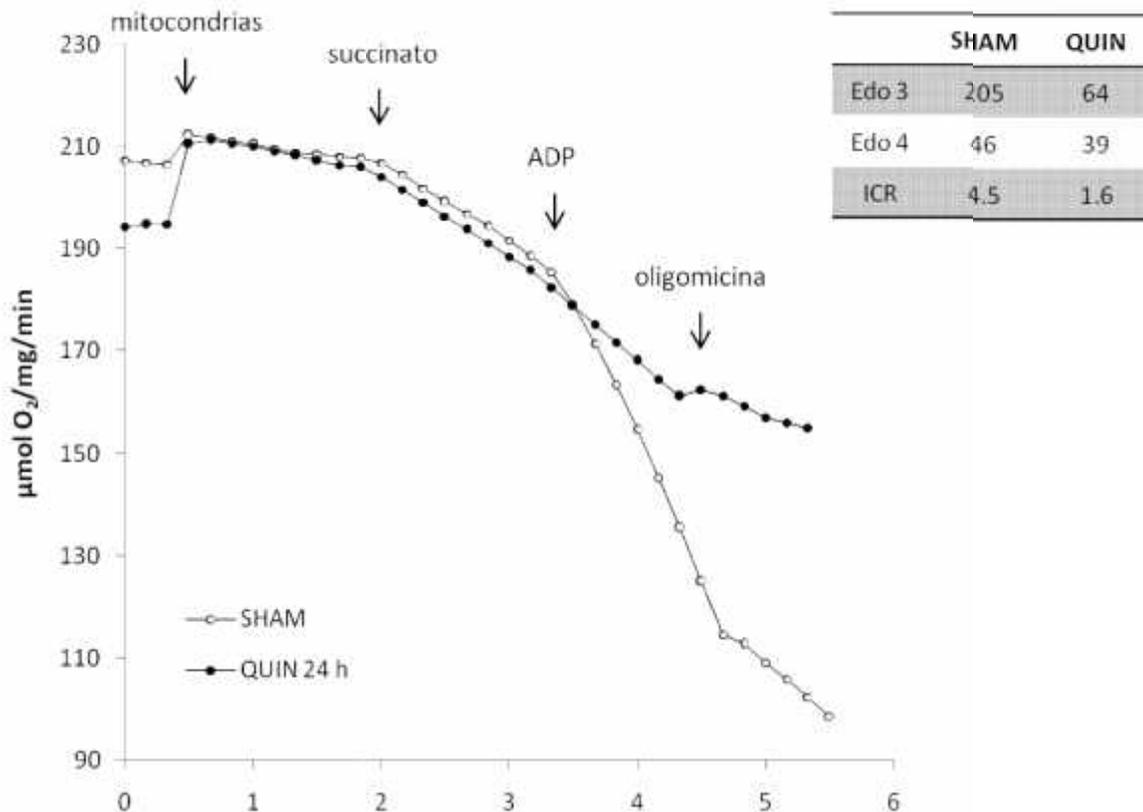


Figura 20. Consumo de oxígeno de mitocondrias aisladas de estriado de los grupos experimentales sham y QUIN a 24 h post-lesión de dos muestras representativas. Las flechas indican la adición de los distintos sustratos utilizados en el ensayo. En el cuadro se observan los valores de los estados 3 y 4 con su respectivo ICR.

El QUIN induce una disminución significativa en el estado 3 de respiración mitocondrial a los tiempos de 2, 4, 16 y 24 h (**p<0.001 vs. sham). Sin embargo, en el grupo de ratas sacrificadas a las 8 h post-inyección, no se observaron cambios en el estado 3 de respiración con respecto al grupo sham. Al analizar el estado 4 inducido por la adición de oligomicina, no se observaron cambios significativos entre ninguno de los grupos experimentales analizados. Los valores de respiración de cada uno de los grupos experimentales se muestran en la Tabla 3.

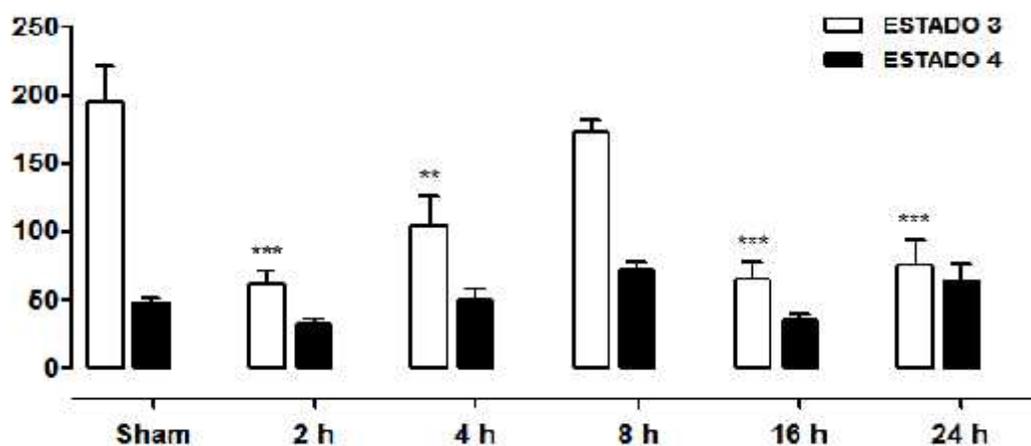


Figura 21. Efecto del QUIN sobre los estados 3 y 4 de respiración en mitocondrias de estriado. Los resultados se expresan como el promedio \pm EEM. Las diferencias se analizaron usando ANOVA de una vía seguida de la prueba de Dunnett. Las diferencias se consideraron significativas a ***p<0.001 vs. sham, (n=6-8).

Tabla 3. Efecto de la inyección intraestriatal de QUIN sobre los estados 3 y 4 de respiración.

	Sham	2 h	4 h	8 h	16 h	24 h
Edo 3	195±25	62±9***	104±21***	172±10	65±12***	58±9***
Edo 4	48±4	32±4	50±8	71±7	34±5	51±6

Promedio \pm EEM. ANOVA de una vía seguida de la prueba de Dunnett. ***p<0.001, de experimentos independientes, (n=6-8).

Posteriormente, se calculó el ICR mediante la división de las tasas del consumo de oxígeno de los estados 3 y 4 [Edo 3/Edo 4], esta estimación proporciona la tasa de acoplamiento entre la síntesis de ATP y el flujo de electrones. El tratamiento con QUIN provocó una disminución del ICR a partir de las 2 h post-inyección, siendo el tiempo de 24 h donde se encontraron los valores más bajos del ICR (1.33 ± 0.26) con respecto al grupo sham (4.28 ± 0.33).

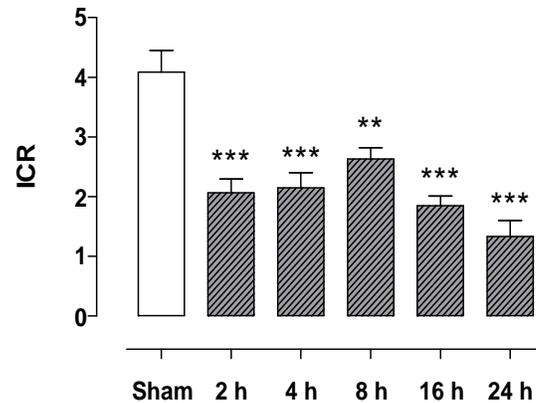


Figura 22. Efecto del QUIN sobre el ICR en mitocondrias de estriado. Los resultados se expresan como el promedio \pm EEM. Las diferencias se analizaron usando ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett. Las diferencias se consideraron significativas a $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ vs. sham, (n=6-8).

6.2.2 El QUIN provoca la pérdida del

Otro parámetro para determinar la integridad y funcionalidad mitocondrial es la cuantificación del . Los efectos de la administración de QUIN sobre el se determinaron a través de los cambios en la fluorescencia del compuesto safranina O, utilizando succinato como sustrato de oxidación (complejo II).

La inyección intraestriatal con QUIN induce una disminución significativa del a los tiempos de 4, 16 y 24 h post-lesión, siendo este último tiempo donde se observa una mayor disminución con respecto al grupo sham (** $p < 0.001$). Interesantemente, el grupo de ratas sacrificadas a las 8 h post-inyección, no presentaron diferencias significativas con respecto al grupo sham.

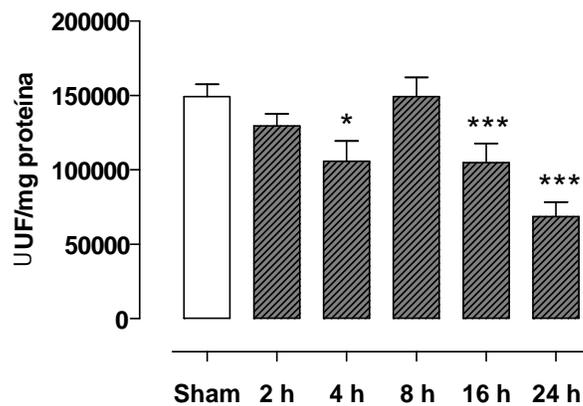


Figura 23. Efecto del QUIN sobre el de mitocondrias de estriado. Los datos están expresados como promedio \pm EEM. Las diferencias se analizaron usando ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett. Las diferencias se consideraron significativas a $*p < 0.05$ y $***p < 0.001$ vs. sham, (n=6-8).

6.2.3 El QUIN induce cambios en la actividad de los complejos mitocondriales.

Para poder explicar de una forma más detallada los cambios que induce esta neurotoxina en la función mitocondrial, se planeó analizar la actividad de los complejos mitocondriales I, II, III, IV y la capacidad de síntesis de ATP por complejo V.

La actividad de los complejos I y II se determinaron indirectamente por la reducción del compuesto DCPIP, como se describe en la sección de material y métodos. Los resultados muestran que la administración de QUIN disminuye la actividad del complejo I a partir de las 8 h post-lesión ($28.1 \pm 7.4\%$), observándose una disminución más pronunciada al tiempo de 24 h ($46.3 \pm 7.2\%$) (** $p > 0.001$ vs. sham). En el caso del complejo II, su actividad sólo se observa disminuida sólo a las 24 h post-inyección en un ($33.6 \pm 7.9\%$) (* $p < 0.05$ vs. sham).

La actividad de complejos III y IV se determinó por la reducción del citocromo c. La administración de QUIN disminuyó la actividad del complejo III a partir de las 8 h post-inyección ($37.5 \pm 5.7\%$), observándose una disminución del ($50.8 \pm 8.8\%$) y ($44.4 \pm 8.4\%$) a los tiempos de 16 y 24 h, respectivamente (** $p < 0.001$ vs. sham). En el caso del complejo IV no se observaron cambios a los tiempos de 2, 4 y 8 h post-inyección con respecto al grupo sham. Sin embargo, en el tiempo de 16 h se observa una reducción de su actividad del ($48.4 \pm 6.2\%$), alcanzando una disminución mayor a las 24 h ($64.3 \pm 8.5\%$) (** $p < 0.001$ vs. sham).

Finalmente, la capacidad de síntesis de ATP, se midió de manera indirecta a través de la detección del incremento en la producción de NADPH a partir de NADP^+ . Los resultados muestran que la administración de QUIN induce una disminución en la capacidad de producción de ATP por el complejo V a partir de las 4 h post-inyección ($62.5 \pm 4.5\%$), observando los niveles más bajos a las 24 h ($61.2 \pm 6.6\%$) con respecto al grupo sham.

Los resultados muestran que la inyección intraestriatal con QUIN induce una pérdida de la funcionalidad mitocondrial a tiempos cortos, siendo más evidente el daño a las 24 h post-lesión. Por esta razón, seleccionamos este periodo para determinar el efecto de los antioxidantes selenio y SFN en el estriado de ratas inyectadas con QUIN.

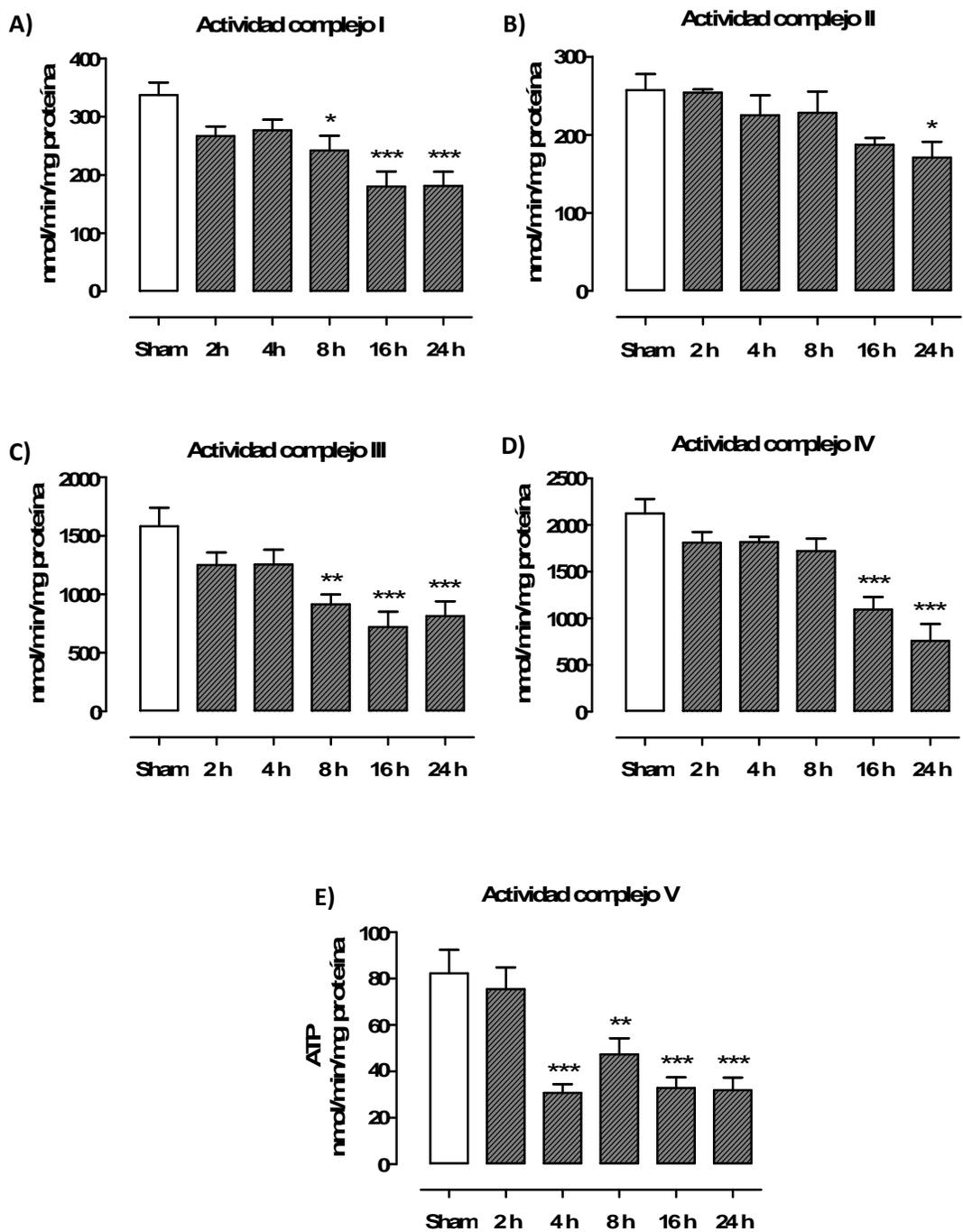


Figura 24. Efecto del QUIN sobre la actividad de los complejos mitocondriales. Los datos están expresados como promedio \pm EEM. Las diferencias se analizaron usando ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett. Las diferencias se consideraron significativas a * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. sham, (n=6-8).

6.3 Efecto de la administración de Na_2SeO_3 sobre la disfunción mitocondrial inducida por QUIN.

6.3.1 El Na_2SeO_3 previene la conducta de giro inducida por QUIN.

Para determinar si la administración de Na_2SeO_3 induce un efecto protector en el estriado de las ratas lesionadas con QUIN, realizamos la prueba de conducta de giro inducida por apomorfina, en la cual se encontró que las ratas lesionadas con QUIN tuvieron un marcado incremento en el número de giros ipsilaterales con respecto al grupo sham (276 ± 45), mientras que el grupo de ratas tratadas con Na_2SeO_3 atenuaron de manera significativa (151 ± 70) la ejecución de los giros ipsilaterales inducidos por QUIN ($\#p < 0.05$ vs. QUIN).

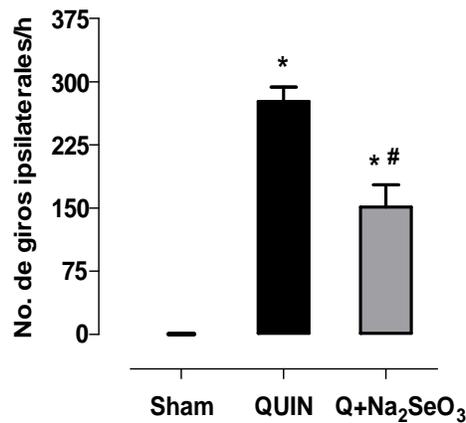


Figura 25. Efecto de Na_2SeO_3 sobre la conducta de giro inducida por apomorfina. Los datos están expresados como promedio \pm EEM. Las diferencias se analizaron usando ANOVA de una vía seguido de la prueba de Bonferroni. Las diferencias se consideraron significativas a $*p < 0.001$ vs. sham y $\#p < 0.05$ vs. QUIN, de experimentos independientes, ($n=7$).

6.3.2 El Na_2SeO_3 no previene la disminución del consumo de oxígeno inducida por QUIN.

La inyección intraestriatal de QUIN disminuye de manera significativa el estado 3 de respiración mitocondrial utilizando succinato como sustrato de oxidación ($***p < 0.001$ vs. sham). Además, se encontró que la administración de Na_2SeO_3 no previene la pérdida del estado 3 inducida por QUIN. Por otra lado, al analizar el estado 4 inducido por oligomicina, no se observaron cambios entre ninguno de los grupos experimentales. La administración intraestriatal de QUIN produce una disminución del ICR obteniendo valores de 1.32 ± 0.37 , mientras que el grupo sham presenta valores de 4.8 ± 0.52 ($***p < 0.001$ vs. sham). El pre-tratamiento con Na_2SeO_3 tampoco logró evitar la pérdida del ICR inducido por QUIN a 24 h.

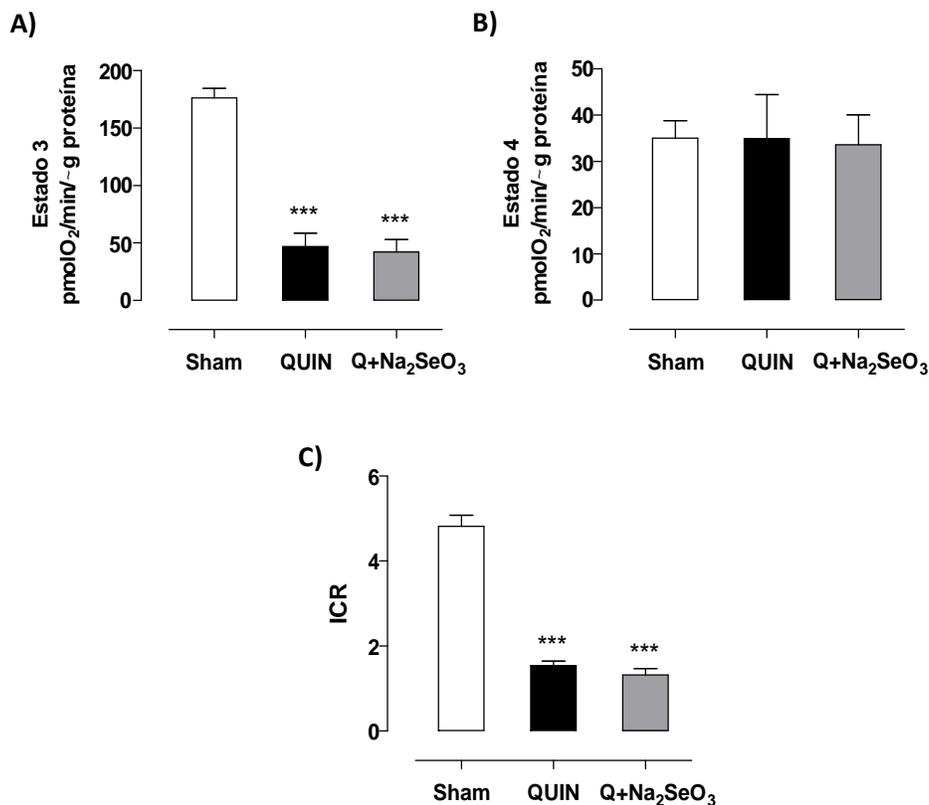


Figura 26. Efecto de Na_2SeO_3 sobre el consumo de oxígeno mitocondrial. A) Estado 3 de respiración en presencia de ADP, B) Estado 4 de respiración inducido por oligomicina, C) Índice de control respiratorio (ICR). Los datos están expresados como el promedio \pm EEM. Las diferencias se analizaron usando ANOVA de una vía seguido de la prueba de Bonferroni. Las diferencias se consideraron significativas a $***p < 0.001$ vs. sham, (n=6).

6.3.3 El Na_2SeO_3 no previene la pérdida del Ca^{2+} , ni la capacidad de síntesis de ATP mitocondrial.

A pesar de que el tratamiento con Na_2SeO_3 no modificó la pérdida del consumo de oxígeno inducida por el QUIN, decidimos analizar el efecto de este compuesto sobre el Ca^{2+} y la capacidad de síntesis de ATP por el complejo V. La administración de QUIN (24 h post-inyección) induce una disminución del Ca^{2+} del 39.8 ± 3.6 con respecto al grupo sham ($*p < 0.05$). Sin embargo, como se puede observar en la Figura 27, el pre-tratamiento con Na_2SeO_3 no previno la pérdida del Ca^{2+} inducida por el grupo QUIN (39 ± 23.2). Además, al analizar la actividad del complejo V, se encontró que el QUIN disminuye (59.9 ± 10.8) la actividad de este complejo ($***p < 0.001$ vs. sham), mientras que en el grupo de Na_2SeO_3 no se observa una recuperación de su actividad con respecto al grupo QUIN (57.2 ± 17.3). Estos datos nos indican que la protección observada por la administración de Na_2SeO_3 no se encuentra asociada a la protección en la funcionalidad mitocondrial.

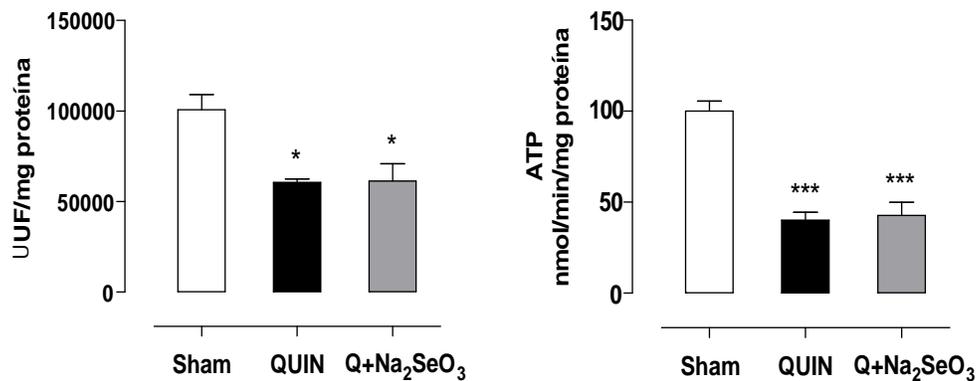


Figura 27. Efecto de Na_2SeO_3 sobre el Ca^{2+} y capacidad de síntesis de ATP. Los datos están expresados como el promedio \pm EEM. Las diferencias se analizaron usando ANOVA de una vía seguido de la prueba de Bonferroni. Las diferencias se consideraron significativas a $*p < 0.05$ y $***p < 0.001$ vs. sham, (n=6).

6.4 Efecto de SFN sobre las alteraciones mitocondriales inducidas por QUIN

6.4.1. El SFN previene la conducta de giro inducida por QUIN

Para evaluar el efecto de la administración de SFN sobre las alteraciones motoras inducidas por el QUIN, se realizó la prueba de conducta de giro inducida por apomorfina a los 7 días después de la inyección intraestriatal. Como se muestra en la Figura 28, las ratas lesionadas con QUIN mostraron un marcado número de giros ipsilaterales después de la administración de apomorfina con respecto al grupo sham (250 ± 41), mientras el grupo de ratas tratadas con SFN atenúo de manera significativa el número de giros ipsilaterales inducidos por QUIN 105 ± 11 (-58% vs. QUIN).

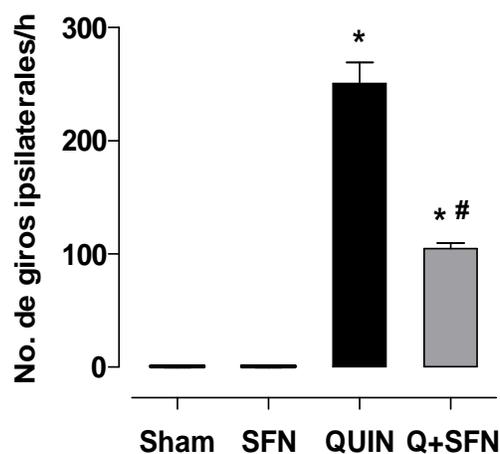


Figura 28. Efecto de SFN sobre la conducta de giro inducida por apomorfina. Los datos están expresados como el promedio \pm EEM. Las diferencias se analizaron usando ANOVA de una vía seguido de la prueba de Bonferroni. Las diferencias se consideraron significativas a $*p < 0.01$ y $\#p < 0.05$ vs. sham, (n=6).

6.4.2 El SFN atenúa el daño histológico inducido por QUIN

El análisis histológico de los cortes coronales del cerebro con la tinción de H&E en los diferentes grupos experimentales se muestra en la Figuras 29-31. Las micrografías son representativas del lóbulo derecho de cada grupo experimental obtenidas 7 días después de la administración del QUIN. En cada una de las imágenes representativas, se observa el sitio de lesión a consecuencia de la aguja y el área dañada por la difusión del QUIN.

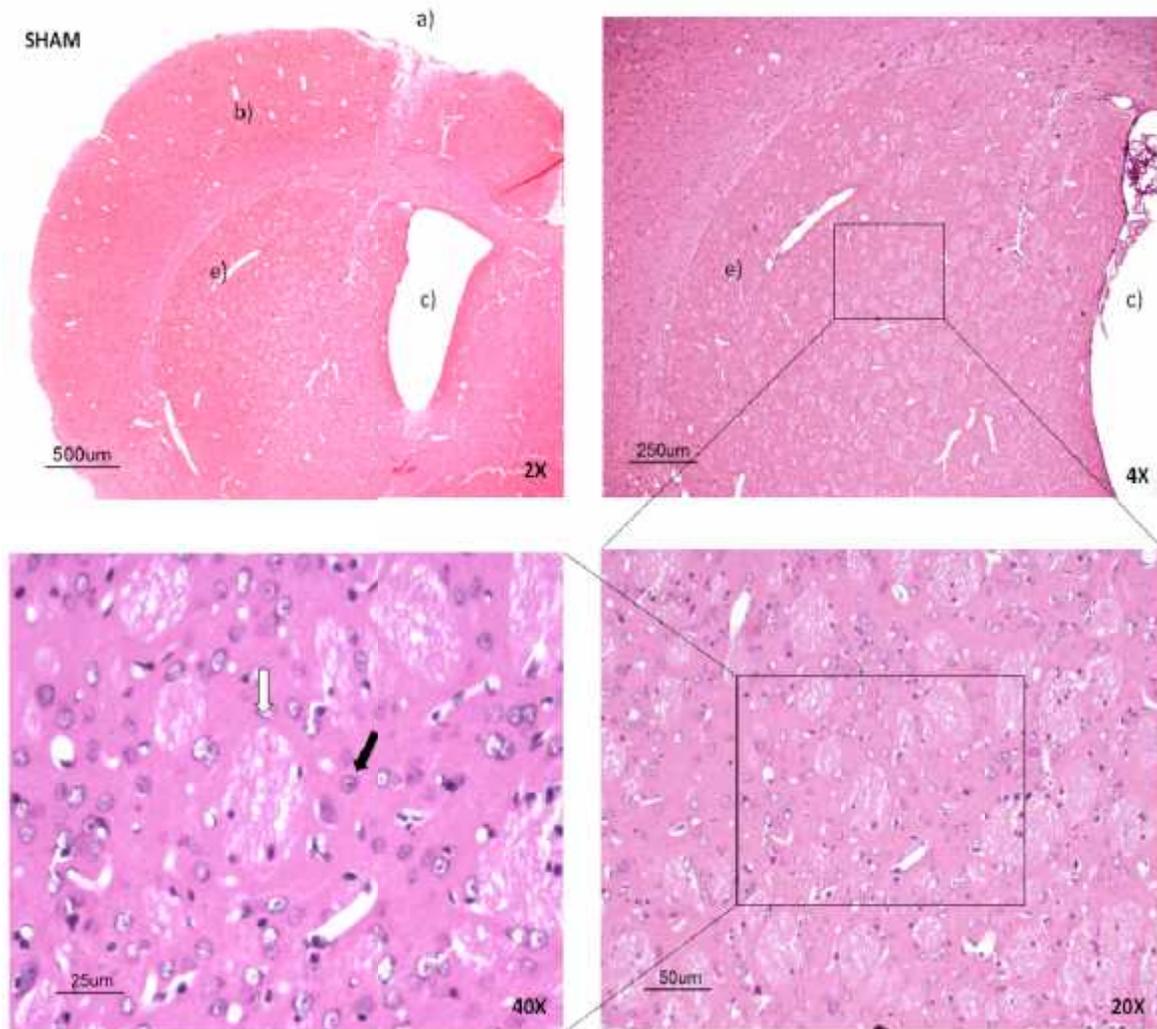


Figura 29. Tinción con H&E del lóbulo derecho del grupo sham. Las micrografías fueron tomadas con los objetivos 2x, 4x, 20x y 40x. a) sitio de inyección intraestriatal con solución salina, b) corteza, c) ventrículo, e) estriado. Se observan preservación del parénquima, células características del estriado (flecha negra) y estriosomas delimitados característicos del estriado (flecha blanca).

Como se puede observar en la Figura 30, el grupo tratado con QUIN presenta una mayor destrucción del tejido estriado, lo cual se acompaña por edema y daño en el neurópilo, producto del proceso agudo de inflamación generado por QUIN. Además, se observa una la pérdida del parénquima y de las células que delimitan la corteza del cuerpo estriado. Por otra parte, se observan núcleos picnóticos característicos de muerte celular por necrosis.

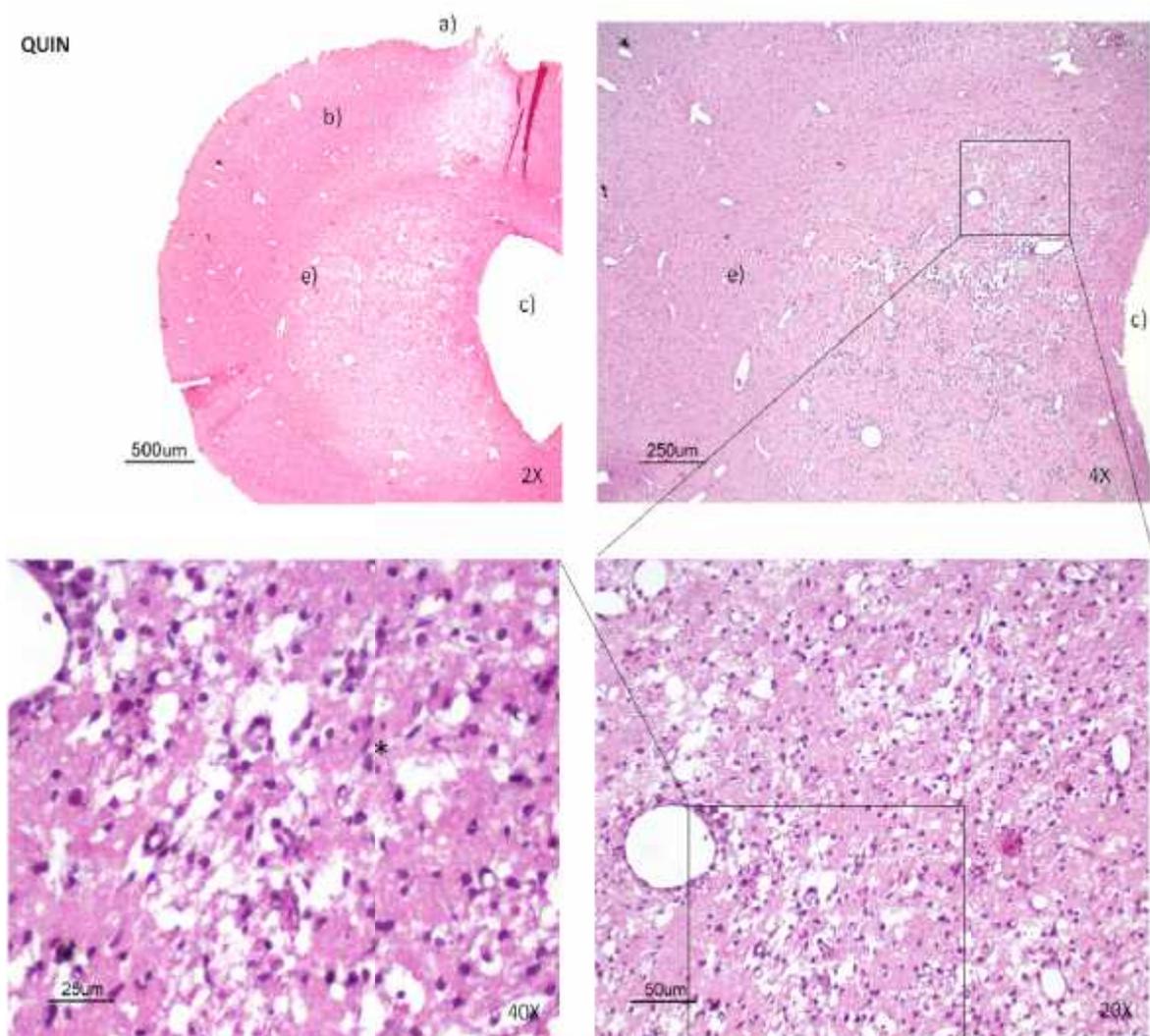


Figura 30. Tinción con H&E del lóbulo derecho del grupo QUIN. Las micrografías fueron tomadas con los objetivos 2x, 4x, 20x y 40x. a) sitio de inyección intraestriatal con solución salina, b) corteza, c) ventrículo, e) estriado. Se observa destrucción del tejido estriado y pérdida de los estriosomas. Se observan núcleos picnóticos característicos de muerte por necrosis (*).

Interesantemente, la administración de SFN redujo manera considerable el daño tisular causado por esta neurotoxina, lo cual ha sido reportado recientemente por Santana-Martínez et al. (2014) (Figura 31).

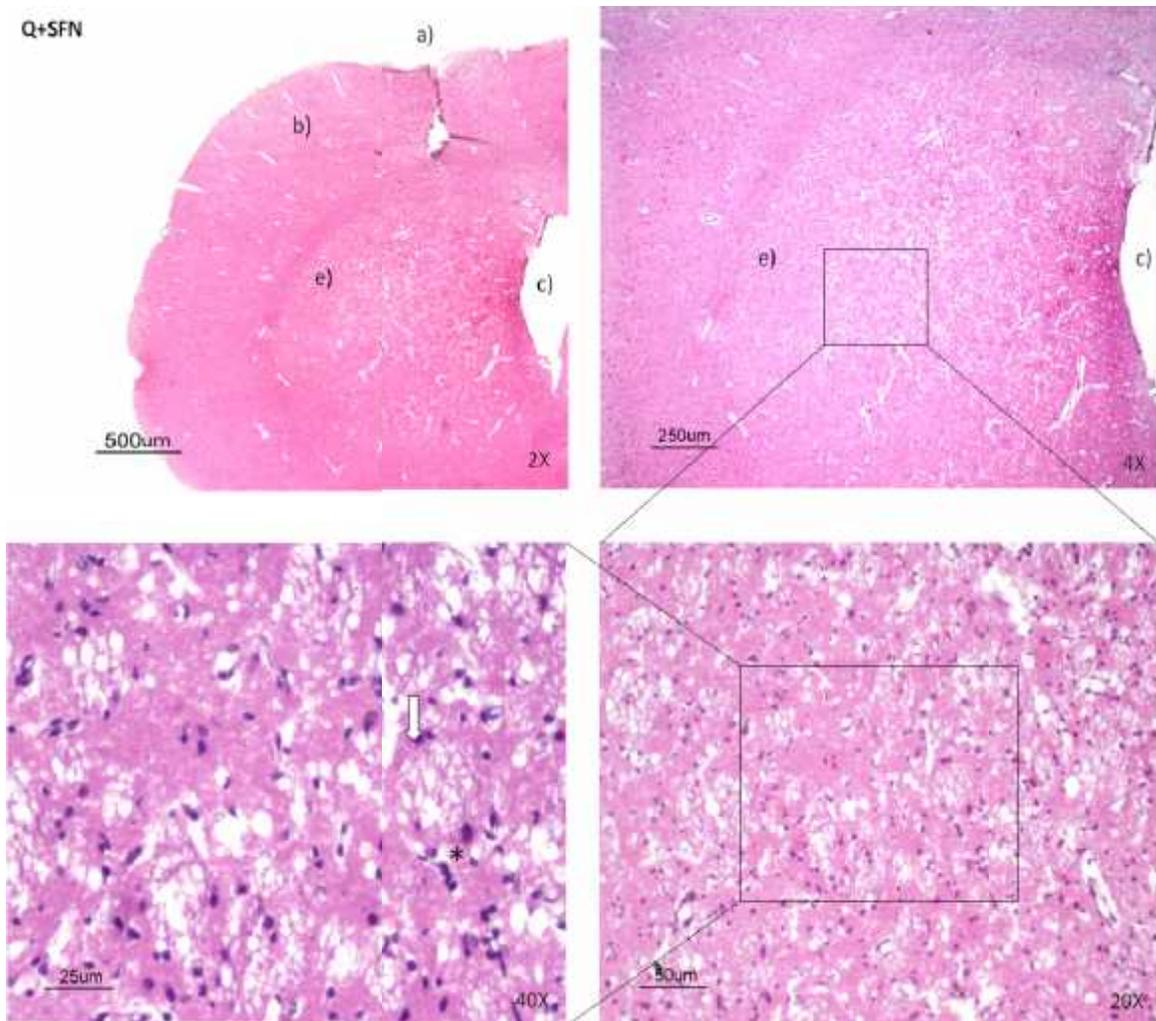


Figura 31. Tinción con H&E del lóbulo derecho del grupo Q+SFN. Las micrografías fueron tomadas con los objetivos 2x, 4x, 20x y 40x. a) sitio de inyección intraestriatal con solución salina, b) corteza, c) ventrículo, e) estriado. Se distinguen algunos estriosomas conservados (flecha blanca).

6.4.3. El SFN previene la disminución del consumo de oxígeno inducida por QUIN.

Los resultados muestran que la inyección intraestriatal de QUIN, disminuye el estado 3 de respiración 24 h después de su administración (* $p < 0.001$ vs. Sham y SFN). De forma interesante, el pre-tratamiento con dos dosis de 5 mg/kg de SFN en ratas lesionadas con el QUIN (Q+SFN) evitó la disminución del estado 3 ($^{\#}p < 0.05$ vs. QUIN). Al analizar el estado 4 de respiración inducido con oligomicina no se observaron diferencias significativas entre ninguno de los grupos experimentales. Por otra parte, al analizar el ICR se encontró que la administración de QUIN indujo una disminución del ICR en las mitocondrias aisladas de estriado, obteniendo valores de (1.8 ± 0.1) ($***p < 0.001$ vs. Sham y SFN). Sin embargo, el pre-tratamiento con SFN mejoró los valores obtenidos de ICR, indicando que las mitocondrias se encontraban acopladas después del daño inducido por el QUIN 24 h después de su administración (3.0 ± 0.2) ($^{\#}p < 0.05$ vs. QUIN). La administración de SFN induce una recuperación del consumo de oxígeno en mitocondrias aisladas de estriado dañadas con el QUIN.

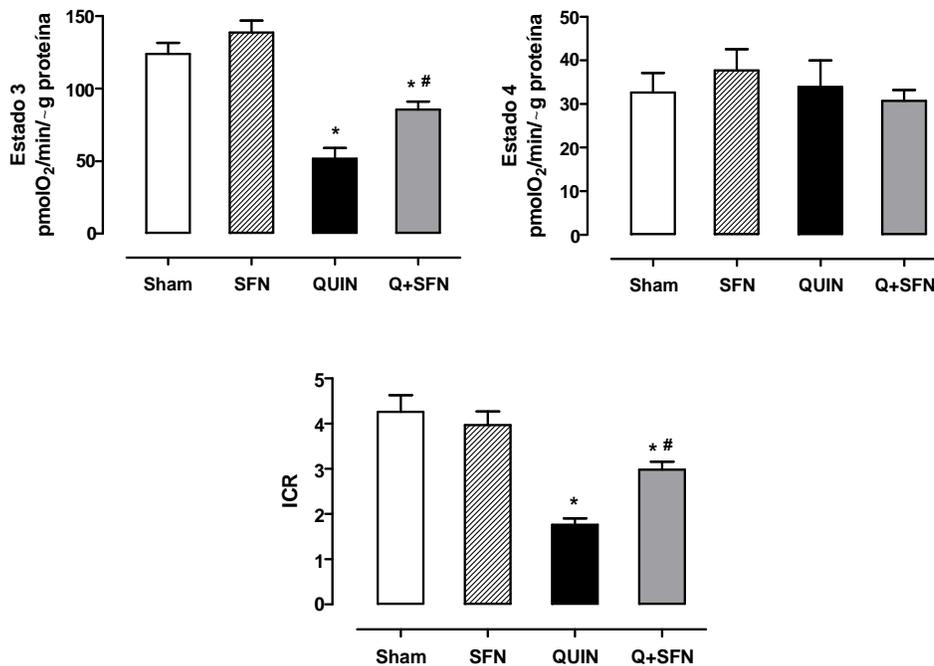


Figura 32. Efecto de SFN sobre el consumo de oxígeno mitocondrial. Los datos están expresados como el promedio \pm EEM. Las diferencias se analizaron usando ANOVA de una vía seguido de la prueba de Bonferroni. Las diferencias se consideraron significativas a $*p < 0.001$ vs. sham y SFN, $^{\#}p < 0.05$ vs. QUIN, (n=7-12).

Tabla 3. Efecto de SFN sobre la disminución en el consumo de oxígeno inducido por QUIN a 24 h post-lesión.

	Sham	SFN	QUIN	Q+SFN
Edo 3	123.8 ± 7.7	137.9 ± 7.0 ^{ns}	51.6 ± 7.3 ^{***}	85.3 ± 5.6 ^{*,#}
Edo 4	32.5 ± 4.5	40.8 ± 4.5 ^{ns}	33.9 ± 6.1 ^{ns}	30.7 ± 2.5 ^{ns}
ICR	4.2 ± 0.4	3.7 ± 0.3 ^{ns}	1.8 ± 0.1 ^{***}	3.0 ± 0.2 ^{*,#}

Promedio ± EEM. ANOVA de una vía seguida de la prueba de Bonferroni. *p<0.05, ***p<0.001 vs. sham, #p<0.05 vs. QUIN y ^{ns}, sin diferencia significativa con respecto al grupo sham, (n=7-12).

6.4.4 El SFN previene la pérdida del [] inducida por QUIN

El análisis del [] no mostró diferencias entre los grupos experimentales sham y SFN. Sin embargo, la administración de QUIN disminuyó el [] en un 42.8 ± 2.4 con respecto al grupo sham y un 38.2 ± 2.6 con respecto al grupo SFN (*p 0.001 vs. sham y SFN). Como se observa en la Figura 33, la administración de dos dosis de 5 mg/kg de SFN en ratas lesionadas con QUIN a 24 h post-lesión, previno la pérdida del [] 20.2 ± 4.7, (#p 0.05 vs. QUIN). El grupo Q+SFN no mostró diferencias significativas con respecto al grupo SFN. Sin embargo si presentó diferencia significativa con respecto al grupo sham (*p 0.05 vs. Sham).

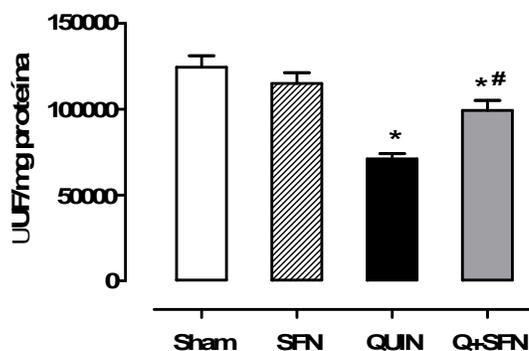


Figura 33. Efecto de SFN sobre el []. Los datos están expresados como el promedio ± EEM. Las diferencias se analizaron usando ANOVA de una vía seguida de la prueba de Bonferroni. Las diferencias se consideraron significativas a *p<0.01 vs. sham y SFN, #p<0.05 vs. QUIN, (n=8-16).

6.4.5 El SFN previene la disminución de la actividad de los complejos mitocondriales.

Para poder determinar si la protección observada por SFN está asociada a cambios en la función de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, se determinó su actividad. El análisis sobre la actividad del complejo I mostró que la administración de QUIN disminuye en un $(50.5 \pm 4.1\%)$ su actividad a las 24 h post-inyección con respecto al grupo sham y en un $(47.8 \pm 4.3\%)$ con respecto al grupo SFN ($***p < 0.001$). De manera interesante, se observó que el grupo Q+SFN evitó la disminución de la actividad de este complejo $(18.7 \pm 7.7\%)$ ($\#p < 0.05$ vs. QUIN). Por otra parte, al analizar la actividad del complejo II, se observó que la administración de SFN no logró prevenir la disminución de la actividad de este complejo inducida por el QUIN, ya que se presentó una disminución del $(32.9 \pm 8.5\%)$, con respecto al grupo sham ($*p < 0.05$), la cual no alcanzó a ser significativa con el grupo del QUIN.

Por otra parte, el análisis sobre la actividad del complejo III mostró que no hay diferencias significativas entre ninguno de los diferentes grupos experimentales, aunque se observa una ligera disminución en la actividad de este complejo en el grupo de QUIN. Al analizar la actividad de la citocromo c oxidasa se observó que este complejo presenta una alta susceptibilidad a la administración de QUIN ya que disminuyó en $(56 \pm 7.4\%)$ con respecto al grupo sham ($***p < 0.001$ vs. sham). De manera interesante, el grupo Q+SFN evitó la disminución de la actividad de este complejo a pesar del daño inducido por el QUIN ($\#p < 0.001$ vs. QUIN). Finalmente, al medir la capacidad de síntesis de ATP por el complejo V, se observó que el grupo QUIN también disminuye su actividad en un $(68.1 \pm 11.9\%)$ con respecto al grupo sham y en $(70.3 \pm 11\%)$ con respecto al grupo SFN ($***p < 0.001$). A pesar de que el grupo Q+SFN presentó una disminución significativa con respecto al grupo sham y SFN, éste mostró un incremento en la actividad del complejo V con respecto al grupo QUIN ($\#p < 0.05$ vs. QUIN). A pesar de que se observa que la administración de 5 mg/kg de SFN en el grupo de ratas lesionadas con QUIN evita el daño inducido por esta neurotoxina, la administración de SFN en ratas normales no indujo un incremento en la actividad de ninguno de los complejos mitocondriales (Figura 34). El pre-tratamiento con SFN evitó la reducción en la tasa de activación de los complejos mitocondriales I y IV, mientras previno la disminución de la capacidad de síntesis de ATP en las mitocondrias aisladas de estriado.

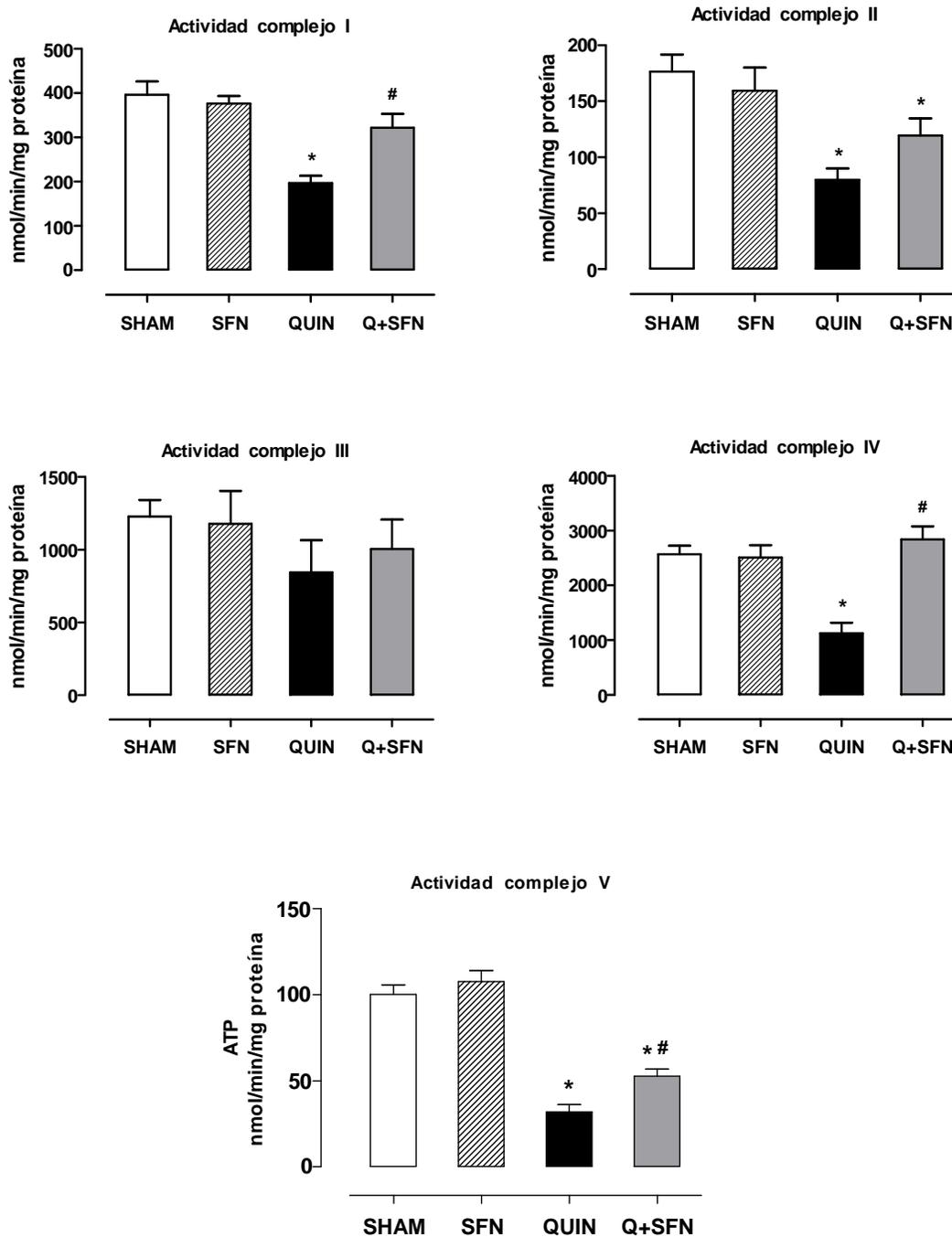


Figura 34. Efecto de SFN sobre la actividad de los complejos mitocondriales. Los datos están expresados como el promedio \pm EEM. Las diferencias se analizaron usando ANOVA de una vía seguido de la prueba de Bonferroni. Las diferencias se consideraron significativas a * $p < 0.001$ vs. Sham y SFN y # $p < 0.01$ vs. QUIN, (n=6-12).

7. DISCUSIÓN

El QUIN es una neurotoxina que induce muerte neuronal por excitotoxicidad a través de la sobreactivación de los rNMDA e incremento de las concentraciones de calcio citosólico, seguido por alteraciones en la función mitocondrial, liberación de citocromo *c*, disminución en la producción de ATP, formación de NO[•] y de otros radicales libres (Pérez de la Cruz *et al.*, 2012). Se ha sugerido que estas alteraciones son responsables de la pérdida de las neuronas medianas espinosas GABAérgicas y de las alteraciones motoras que desarrollan los diferentes modelos animales de esta enfermedad. A pesar de que la disfunción mitocondrial ha sido propuesta como un evento crítico en el proceso de muerte celular durante la enfermedad de Huntington y en otros trastornos neurodegenerativos (Coyle y Puttfarcken, 1993), se desconoce si ésta ocurre durante las etapas iniciales de la enfermedad. Similar a lo observado por Bordelon *et al.* (1997), en nuestro modelo de QUIN, el análisis del curso temporal mostró una disminución significativa de la función mitocondrial durante las etapas iniciales de la excitotoxicidad (2, 4, 16 y 24 h), determinada por el consumo de oxígeno (Fig.15). Interesantemente, sólo en el tiempo de 8 h la función mitocondrial no mostró cambios, lo cual puede explicarse por la escasa o nula afectación en el potencial transmembranal y en la actividad de los complejos I, II, IV y V (Fig. 18). Este restablecimiento temporal del daño mitocondrial podría estar asociado con la activación de mecanismos de compensación como son la fusión y la fisión mitocondrial, los cuales son procesos que se activan en respuesta ante el daño generalizado de la mitocondria o en respuesta a cambios en el metabolismo (Youle y Van der Bliek, 2012). Una observación que apoya esta propuesta es que la fusión mitocondrial maximiza la OXPHOS por estimulación complementaria entre mitocondrias, en respuesta al estrés tóxico, siempre y cuando el estrés se encuentre por debajo del umbral crítico (Youle y Van der Bliek, 2012). Sin embargo, este periodo de recuperación parece no ser relevante para la progresión del daño excitotóxico ya que después de 24 h se observa la máxima disminución de todos los parámetros usados para determinar el daño mitocondrial.

Debido a que el estrés oxidante está asociado con el desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas, se ha sugerido que el tratamiento farmacológico con compuestos antioxidantes como el Na₂SeO₃ y SFN podría representar una nueva alternativa terapéutica.

Diversos estudios han descrito el efecto protector de Na_2SeO_3 en el modelo de neurotoxicidad inducida por el QUIN (Maldonado *et al.*, 2012; Sreekala y Indira, 2009; Santamaría *et al.*, 2003). En estos trabajos se caracterizó el efecto protector de selenio a través de marcadores neuroquímicos y conductuales, el cual estuvo asociado con la inhibición de la señalización pro-apoptótica a través de la vía NF- κ B (Santamaría *et al.*, 2005). Además, los efectos protectores del selenio están relacionados con el estado redox celular el cual es regulado por la activación catalítica de la GPx que es responsable de la detoxificación del H_2O_2 y por el sistema Trx/TrxR que está involucrado en la defensa celular durante el estrés oxidante inducido por QUIN (Santamaría *et al.*, 2005; Maldonado *et al.*, 2012). Nuestros resultados son compatibles con estos trabajos ya que la administración de Na_2SeO_3 durante 9 días, atenúo significativamente la conducta de giro inducida por QUIN. Sin embargo, al analizar los diferentes parámetros de funcionalidad mitocondrial, se concluye que el Na_2SeO_3 no evita la pérdida del potencial de membrana, el consumo de oxígeno, ni la capacidad de síntesis de ATP. Esto sugiere que en el modelo de daño inducido por QUIN, el restablecimiento de la funcionalidad mitocondrial no está asociado con el efecto protector de Na_2SeO_3 . Sin embargo, es posible que dicha protección si se relacione con la disminución del estrés oxidante a través de la activación y expresión de las selenoproteínas GPx y TR a tiempos tempranos como ya ha sido observado por Maldonado *et al.* (2012).

Por otra parte, mediante el uso de diferentes modelos de toxicidad se ha observado que la administración del SFN no solo induce la disminución del estrés oxidante, a través de la inducción de enzimas antioxidantes citoprotectoras dependientes de la vía Keap1-Nrf2-ARE, sino que también es capaz de preservar la función mitocondrial (Greco y Fiskum, 2011; Guerrero-Beltrán *et al.*, 2010; Miller *et al.*, 2013; Piao *et al.*, 2010). Nuestros resultados son similares a los observados por Santana-Martínez *et al.*, (2014), en los cuales el pre-tratamiento de las ratas con SFN atenúa las alteraciones conductuales e histológicas causadas por QUIN.

Miller *et al.*, (2013), observaron que la administración de SFN (5 mg/kg) en ratones, atenúa el daño mitocondrial inducido por el 4-hidroxi-2-nonenal de manera *ex vivo*. Esta protección en la función mitocondrial se asoció con un incremento en la respiración mitocondrial por el complejo I. Sin embargo, el tratamiento con SFN no mostró cambios en la respiración mitocondrial por el complejo

Contrario a esto, nuestro análisis de oximetría mitocondrial utilizando succinato como sustrato, mostró que el tratamiento con 2 dosis de 5 mg/kg de SFN previene la disminución del estado 3 de respiración inducido por QUIN (Figura 26). Además, se observó que la administración de dicho compuesto logró prevenir la disminución del ICR inducido por el QUIN, obteniendo valores de 3, lo cual es un indicativo de acoplamiento mitocondrial entre los procesos de respiración y fosforilación. Estos resultados muestran que el tratamiento con SFN inhibe el deterioro de la respiración mitocondrial por el complejo II, disminuyendo el daño inducido por el QUIN.

Por otro lado, nuestros resultados muestran que el pre-tratamiento con SFN, preserva el potencial de membrana mitocondrial 24 h después del daño inducido por el QUIN. Diversos trabajos han mostrado el mismo efecto con el pre-tratamiento con SFN. Guerrero-Beltrán *et al.* (2010), observaron que la administración de SFN (5 μ M) en las células renales LLC-PK1, preserva el potencial de membrana mitocondrial, después del daño inducido por cisplatino. Además, recientemente, se reportó que el pre-tratamiento con SFN incrementa los niveles de GSH y los niveles de las enzimas antioxidantes GPx y GR a las 24 h post-inyección. Este resultado es compatible con nuestros resultados en los que la preservación del potencial transmembranal fue observado después de 24 h de la inyección con el QUIN.

Finalmente, para evaluar si el tratamiento con SFN es capaz de restablecer la pérdida de su actividad a las 24 h post-inyección, analizamos los cambios en la actividad de los diferentes complejos mitocondriales. Nuestros resultados sugieren que el tratamiento de los animales normales con SFN no induce un incremento en la actividad de ninguno de los complejos evaluados con respecto al grupo sham. Sin embargo, en el grupo de ratas Q+SFN no se observó disminución de la actividad de los complejos I y IV. Estos resultados sugieren que la preservación de la actividad de los complejos I y IV, mantiene el gradiente electroquímico en el espacio intramembranal, evitando la pérdida del potencial de membrana. Esto a su vez puede explicar el incremento observado en la capacidad de síntesis de ATP que fue evaluada a través de la actividad del complejo V.

8. CONCLUSIÓN

Las alteraciones en la función motora causadas por la inyección intraestriatal de QUIN en ratas son atenuadas con la administración intraperitoneal de Na_2SeO_3 o SNF. El mecanismo de protección de ambos antioxidantes es diferente; el primero podría estar asociado con la sobreexpresión y activación de las enzimas dependientes de selenio, mientras que el segundo está relacionado con la inhibición de la destrucción tisular y con el restablecimiento de la función mitocondrial.

10. LITERATURA CITADA

1. Allan CB, Lacourciere GM, Stadtman TC (1999). Responsiveness of selenoproteins to dietary selenium. *Annu Rev Nutr* 19:1-16.
2. Andersen JK (2004). Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med* 10:18-25.
3. Andreyev AY, Kushnareva YE, Starkov AA (2005). Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry* 70(2):200-214.
4. Arundine M, Tymianski M (2003). Molecular mechanism of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium*. 34(4-5):325-337.
5. Beal MF, Hyman BT, Koroshetz W (1993). Do defects in mitochondrial energy metabolism underlie the pathology of neurodegenerative diseases? *Trends Neurosci* 16(4):125-131.
6. Betteridge DJ (2000). What is oxidative stress? *Metabolism* 49(2):3-8.
7. Bordelon YM, Chesselet MF, Nelson D, Welsh F, Ereciska M (1997). Energetic dysfunction in quinolinic acid-lesioned rat striatum. *J Neurochem* 69(4):1629-1639.
8. Braidy N, Grant R, Adams S, Brew BJ, Guillermin GJ (2009). Mecanismo for quinolinic acid cytotoxicity in human astrocytes and neurons. *Neurotox Res* 16(1):77-86.
9. Brand MD, Nicholls DG (2011). Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J* 435(2): 297-312.
10. Cano-Ramírez D, Torres-Vargas CE, Guerrero-Castillo S, Uribe-Carvajal S, Hernández-Pando R, Pedraza-Chaverri J, Orozco-Ibarra M (2012). Effect of glycolysis inhibition on mitochondrial function in rat brain. *J Biochem Mol Toxicol*. 26(5):206-211.
11. Castillo C, Benedito JL, López-Alonso M (2001). Importancia del estrés oxidativo en ganado vacuno: en relación con el estado fisiológico (preñez y parto) y la nutrición. *Archivos de Medicina Veterinaria* 33(1):5-20.

12. Chen J, Berry MJ (2003). Selenium and selenoproteins in the brain and brain diseases. *J Neurochem.* 86(1):1-12.
13. Chinopoulos C, Zhang SF, Thomas B, Ten V, Starkov AA. 2011. Isolation and functional assessment of mitochondria from small amounts of mouse brain tissue. *Methods Mol Biol* 793:311-324.
14. Chirino YI, Orozco-Ibarra M, Pedraza-Chaverri J (2006). [Role of peroxy nitrite anion in different diseases] *Rev Invest Clin* 58(4):350-358.
15. Coyle JT y Puttfarcken P (1993). Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science.* 262(5134):689-695.
16. Cuadrado A, Moreno-Murciano P, Pedraza-Chaverri J (2009). The transcription factor Nrf2 as a new therapeutic target in Parkinson's disease. *Expert Opin Ther Targets* 13(3): 319-329.
17. Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ (1997). Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J* 324(1):1-18.
18. Dietary Reference (2000). Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium and Carotenoids The National Academy of Science.
19. Dinkova-Kostova AT, Talalay P (2008). Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins. *Mol Nutr Food Res* 52(1): 128-138.
20. Dorado-Martínez C, Rugerio-Vargas C, Rivas-Arancibia S (2003). Estrés oxidativo y neurodegeneración. *Rev Fac Med UNAM* 46(6):229-235.
21. Fahey JW, Talalay P (1999). Antioxidant functions of sulforaphane: a potent inducer of Phase II detoxication enzymes. *Food Chem Toxicol* 37(9-10): 973-979.
22. Gandhi S, Abramov AY (2012). Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. *Oxid Med Cell Longev* 2012:1-11.
23. Gaona-Gaona L, Molina-Jijón E, Tapia E, Zazueta C, Hernández-Pando R, Calderón-Oliver M, Zarco-Márquez G, Pinzón E, Pedraza-Chaverri J (2011). Protective effect of sulforaphane pretreatment against cisplatin-induced liver and mitochondrial oxidant damage in rats. *Toxicology* 286(1-3):20-27.

24. González-Cortés C, Salinas-Lara C, Gómez-López MA, Tena-Suck ML, Pérez-De La Cruz V, Rembao-Bojórquez D, Pedraza-Chaverri J, Gómez-Ruiz C, Galván-Arzate S, Ali SF, Santamaría A (2008). Iron porphyrinate Fe (TPPS) reduces brain cell damage in rats intrastrially lesioned by quinolinate. *Neurotoxicol Teratol* 30(6):510-519.
25. Greco T, Fiskum G (2010). Brain mitochondria from rats treated with sulforaphane are resistant to redox-regulated permeability transition. *J Bioenerg Biomembr* 42(6):491-497.
26. Guerrero-Beltrán CE, Calderón-Oliver M, Martínez-Abundis E, Tapia E, Zarco-Márquez G, Zazueta C, Pedraza-Chaverri J (2010). Protective effect of sulforaphane against cisplatin-induced mitochondrial alterations and impairment in the activity of NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 and glutamyl cysteine ligase: studies in mitochondria isolated from rat kidney and in LLC-PK1 cells. *Toxicol Lett* 199(1):80-92.
27. Guerrero-Beltrán CE, Calderón-Oliver M, Pedraza-Chaverri J, Chirino YI (2012). Protective effect of sulforaphane against oxidative stress: recent advances. *Exp Toxicol Pathol* 64(5):503-508.
28. Halliwell B, Gutteridge J. 2007. Radicales libres en la biología y la medicina. 4ta. ed. Oxford, University Press. USA pp:48-94.
29. Hansberg Torres Wilhelm (2002). Mensaje Bioquímico, Depto. Bioquímica, Fac Med, UNAM Vol XXVI:19-54.
30. Hansford R, George S, Indies W (2001). Oxidative phosphorylation: Pathway overview; occurrence; the chemiosmotic model. Editorial Jonh Wiley & Sons. Chichester. Ency pp. 1-8. Chichester.
31. Hatefi Y (1985). The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annu Rev Biochem* 54:1015-1069.
32. Haweks WC, Wilhelmsen EC, Tappel AL (1985). Abundance and tissue distribution of selenocysteine- containing proteins in the rat. *J Inorg Biochem* 23(2):77-92.

33. Holtzclaw WD, Dinkova-Kostova AT, Talalay P (2004). Protection against electrophile and oxidative stress by induction of phase 2 genes: the quest for the elusive sensor that responds to inducers. *Adv Enzyme Regul* 44: 335–367.
34. Hu R, Hebbar V, Kim BR, Chen C, Winnik B, Buckley B, Soteropoulos P, Toliás P, Hart RP, Kong AN (2004). In vivo pharmacokinetics and regulation of gene expression profiles by isothiocyanate sulforaphane in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 310(1): 263-271.
35. Jones DP (2006). Disruption of mitochondrial redox circuitry in oxidative stress. *Chem Biol Interact* 163(1-2):38-53.
36. Juge N, Mithen RF, Traka M (2007). Molecular basis for chemoprevention by sulforaphane: a comprehensive. *Cell Mol Life Sci* 64(9):1105-1127.
37. Kalonia H, Kumar P, Kumar A, Nehru B (2010). Protective effect of rofecoxib and nimesulide against intra-striatal quinolinic acid-induced behavioral, oxidative stress and mitochondrial dysfunctions in rats. *Neurotoxicology* 31(2): 195-203.
38. Kirby DM, Thorburn DR, Turnbull DM, Taylor RW (2007). Biochemical assays of respiratory chain complex activity. *Methods Cell Biol* 80:93-119.
39. Kryukov GV, Castellano S, Novoselov SV, Lobanov AV, Zehrab O, Guigó R, Gladyshev VN (2003). Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science* 300(5624):1439-1443.
40. Long J, Ma J, Luo C, Mo X, Sun L, Zang W, Liu J (2009). Comparison of two methods for assaying complex I activity in mitochondria isolated from rat liver, brain and heart. *Life Sci* 85(7-8):276-280.
41. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1):265-275.
42. Magesh S, Chen Y, Hu L (2012). Small molecule modulators of Keap1-Nrf2-ARE pathway as potential preventive and therapeutic agents. *Med Res Rev* 32(4):687-726.

43. Maldonado PD, Molina-Jijón E, Villeda-Hernández J, Galván-Arzate S, Santamaría A, Pedraza-Chaverrí J (2010). NAD(P)H oxidase contributes to neurotoxicity in an excitotoxic/prooxidant model of Huntington's disease in rats: protective role of apocynin. *J Neurosci Res* 88(3):620-629.
44. Maldonado PD, Pérez-De La Cruz V, Torres-Ramos M, Silva-Islas C, Lecona-Vargas R, Lugo-Huitrón R, Blanco-Ayala T, Ugalde-Muñiz P, Vázquez-Cervantes GI, Fortoul TI, Ali SF (2012). Santamaría A. Selenium-induced antioxidant protection recruits modulation of thioredoxin reductase during excitotoxic/pro-oxidant events in the rat striatum. *Neurochem Int* 61(2):195-206.
45. Mancuso M, Coppede F, Migliore L, Siciliano G, Murri L (2006). Mitochondrial dysfunction, oxidative stress and neurodegeneration. *J Alzheimers Dis* 10(1):59-73.
46. Mark LP, Prost RW, Ulmer JL, Smith MM, Daniels DL, Strottmann JM, Brown WD, Hancein-Bey L (2001). Pictorial review of glutamate excitotoxicity: fundamental concepts for neuroimaging. *AJNR Am J Neuroradiol* 22(10):1813-1824.
47. Mehta SL, Kumari S, Mendeleev N, Li PA (2012). Selenium preserves mitochondrial function, stimulates mitochondrial biogenesis, and reduces infarct volume after focal cerebral ischemia. *BMC Neurosci* 13:79.
48. Mercadal CG, Santamaria TM, Piquet DR, Gimeno BM (2005). Importancia del selenio en la práctica clínica. *Química Clínica* 24(3):141-148.
49. Metzler D (2003). *Biochemistry: The Chemical Reactions of Living Cells*. Editorial Academic Press, 2a. Edición, Massachusetts, USA.
50. Miller DM, Singh IN, Wang JA, Hall ED (2013). Administration of the Nrf2-ARE activators sulforaphane and carnosic acid attenuates 4-hydroxy-2-nonenal-induced mitochondrial dysfunction *ex vivo*. *Free Radic Biol Med* 57:1-9.

51. Moreno-Sánchez R, Hernández-Esquivel L, Rivero-Segura NA, Marín-Hernández A, Neuzil J, Ralph SJ, Rodríguez-Enríquez S (2013). Reactive oxygen species are generated by the respiratory complex II--evidence for lack of contribution of the reverse electron flow in complex I. *FEBS J.* 280(3):927-938.
52. Nakao N, Grasbon-Frodl EM, Widner H, Brundin P (1996). Antioxidant treatment protects striatal neurons against excitotoxic insults. *Neuroscience* 73(1):185-200.
53. Negrette-Guzmán M, Huerta-Yepez S, Tapia E, Pedraza-Chaverri J (2013). Modulation of mitochondrial functions by the indirect antioxidant sulforaphane: a seemingly contradictory dual role and an integrative hypothesis. *Free Radic Biol Med* 65:1078-1089.
54. Nicholls DG, Budd SL (1998). Mitochondria and neuronal glutamate excitotoxicity. *Biochim Biophys Acta* 1366(1-2):97-112.
55. Nonn L, Williams RR, Erickson RP, Powis G (2003). The absence of mitochondrial thioredoxin 2 causes massive apoptosis, exencephaly, and early embryonic lethality in homozygous mice. *Mol Cell Biol.* 23(3):916-922.
56. Paxinos G and Watson C (1998). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, San Diego.
57. Pérez-De La Cruz V, Carrillo-Mora P, Santamaría A (2012). Quinolinic Acid, an endogenous molecule combining excitotoxicity, oxidative stress and other toxic mechanisms. *Int J Tryptophan Res* 5:1-8.
58. Pérez-De La Cruz V, González-Cortés C, Galván-Arzate S, Medina-Campos ON, Pérez-Severiano F, Ali SF, Pedraza-Chaverri J, Santamaría A (2005). Excitotoxic brain damage involves early peroxynitrite formation in a model of Huntington's disease in rats: protective role of iron porphyrinate 5, 10, 15, 20-tetrakis (4-sulfonatophenyl) porphyrinate iron (III). *Neuroscience* 135(2):463-474.
59. Pérez-Rojas JM, Guerrero-Beltrán CE, Cruz C, Sánchez-González DJ, Martínez-Martínez CM, Pedraza-Chaverri J (2011). Preventive effect of tert-butylhydroquinone on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Food Chem Toxicol* 49(10): 2631-2637.

60. Piao CS, Gao S, Lee GH, Kim do S, Park BH, Chae SW, Chae HJ, Kim SH (2010). Sulforaphane protects ischemic injury of hearts through antioxidant pathway and mitochondrial K(ATP) channels. *Pharmacol Res* 61(4): 342-348.
61. Pieczenik SR, Neustadt J (2007). Mitochondrial dysfunction and molecular pathways of disease. *Exp Mol Pathol* 83(1):84-92.
62. Ping Z, Liu W, Kang Z, Cai J, Wang Q, Cheng N, Wang S, Wang S, Zhang JH, Sun X (2010). Sulforaphane protects brains against hypoxic-ischemic injury through induction of Nrf2-dependent phase 2 enzyme. *Brain Res* 1343:178-185.
63. Priya DK, Gayathri R, Gunassekaran GR, Sakthisekaran D (2011). Protective role of sulforaphane against oxidative stress mediated mitochondrial dysfunction induced by benzo(a)pyrene in female Swiss albino mice. *Pulm Pharmacol Ther* 24(1):110-117.
64. Ramaswamy S, McBride JL, Kordower JH (2007). Animal models of Huntington's disease. *ILAR J* 48(4):356-373.
65. Rayman MP (2004). The use of high-selenium yeast to raise selenium status: how does it measure up? *Br J Nutr* 92(4):557-573.
66. Ríos C, Santamaría A (1991). Quinolinic acid is a potent lipid peroxidant in rat brain homogenates. *Neurochem Res.* 16(10):1139-1143.
67. Rodríguez-Martínez E, Camacho A, Maldonado PD, Pedraza-Chaverrí 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.
68. Salinas G. 2010. Mensaje Bioquímico, Depto. Bioquímica, Fac Med, UNAM. Vol XXXIV: 121-133.
69. Santamaría A, Jiménez-Capdeville ME, Camacho A, Rodríguez-Martínez E, Flores A, Galván-Arzate S (2001). *In vivo* hydroxyl radical formation after quinolinic acid infusion into rat corpus striatum. *Neuroreport* 12(12):2693-2696.

70. Santamaría A, Salvatierra-Sánchez R, Vázquez-Román B, Santiago-López D, Villeda-Hernández J, Galván-Arzate S, Jiménez-Capdeville ME, Ali SF. (2003). Protective effects of the antioxidant selenium on quinolinic acid-induced neurotoxicity in rats: *in vitro* and *in vivo* studies. *J Neurochem* 86(2): 479-488.
71. Santamaría A, Vázquez-Román B, La Cruz VP, González-Cortés C, Trejo-Solís MC, Galván-Arzate S, Jara-Prado A, Guevara-Fonseca J, Ali SF (2005). Selenium reduces the proapoptotic signaling associated to NF-kappaB pathway and stimulates glutathione peroxidase activity during excitotoxic damage produced by quinolinate in rat corpus striatum. *Synapse* 58(4):258-266.
72. Santamaría A, Jiménez-Capdeville ME, Camacho A, Rodríguez-Martínez E, Flores A, Galván-Arzate S. 2001. In vivo hydroxyl radical formation after quinolinic acid infusion into rat corpus striatum. *Neuroreport*. 12: 2693-2696.
73. Santana-Martínez RA, Galván-Arzate S, Hernández-Pando R, Chánez-Cárdenas ME, Avila-Chávez E, López-Acosta G, Pedraza-Chaverrí J, Santamaría A, Maldonado PD. 2014. Sulforaphane reduces the alterations induced by quinolinic acid: modulation of glutathione levels. *Neuroscience*. 272:188-198.
74. Saraste M (1999). Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. *Science*. 283(5407):1488-1493.
75. Sas K, Robotka H, Toldi J, Vécsei L (2007). Mitochondria, metabolic disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders. *J Neurol Sci* 257(1-2):221-239.
76. Schwarcz R, Köhler C (1983). Differential vulnerability of central neurons of the rat to quinolinic acid. *Neurosci Lett* 38(1):85-90.
77. Severino PC, Muller Gdo A, Vandresen-Filho S, Tasca CI (2011). Cell signaling in NMDA preconditioning and neuroprotection in convulsions induced by quinolinic acid. *Life Sci* 89(15-16):570-576.
78. Spinazzi M, Casarin A, Pertegato V, Salviati L, Angelini C (2012). Assessment of mitochondrial respiratory chain enzymatic activities on tissues and cultured cells. *Nat Protoc* 7:1235-1246.

79. Tarozzi A, Angeloni C, Malaguti M, Morroni F, Hrelia S, Hrelia P (2013). Sulforaphane as a potential protective phytochemical against neurodegenerative diseases. *Oxid Med Cell Longev* 415078.
80. Tasset I, Pérez de la Cruz V, Elinos- Calderón D, Carrillo-Mora P, González-Herrera IG, Luna López A, Konigsberg M, Pedraza-Chaverrí J, Maldonado PD, Syed FA, Túnez I, Santamaría A (2010). Protective effect of Tert-Butylhydroquinone on the Quinolinic-Acid-induced toxicity in rat striatal slices: Role of the Nrf-2 antioxidant response element pathway. *Neurosignals* 18(1):24-31.
81. Uchida K (2003). 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. *Prog Lipid Res* 42(4):318-343.
82. Wallace DC, Fan W, Procaccio V (2010). Mitochondrial energetics and therapeutics. *Annu Rev Pathol* 5:297-348.
83. Wolff SP, Dean RT (1986). Fragmentation of proteins by free radicals and its effect on their susceptibility to enzymic hydrolysis. *Biochem J* 234(2): 399-403.
84. Youle RJ, Van der Bliek AM (2012). Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science*. 337(6098):1062-1055.
85. Zádori D, Klivényi P, Vámos E, Fülöp F, Toldi J, Vécsei L (2009). Kynurenines in chronic neurodegenerative disorders: future therapeutic strategies. *J Neural Transm* 116(11):1403-1409.
86. Zafar KS, Siddiqui A, Sayeed I, Ahmad M, Salim S, Islam F (2003). Dose-dependent protective effect of selenium in rat model of Parkinson's disease: neurobehavioral and neurochemical evidences. *J Neurochem* 84(3): 438-446.
87. Zhang Y, Munday R, Jobson HE, Munday CM, Lister C, Wilson P, Fahey JW, Mhaweche-Fauceglia P (2006). Induction of GST and NQO1 in cultured bladder cells and in the urinary bladders of rats by an extract of broccoli (*Brassica oleracea italica*) sprouts. *J Agric Food Chem*. 54(25):9370-9376.

88. Zhao J, Kobori N, Aronowski J, Dash PK (2006). Sulforaphane reduces infarct volume following focal cerebral ischemia in rodents. *Neurosci Lett* 393(2-3):108-112.

89. http://www.fmv-uba.org.ar/grado/medicina/ciclo_biomedico/segundo_a%C3%B1o/bioquimica/acro.pdf.

ABREVIATURAS

4-HNE	4-hidroxi-2, 3-nonenal
8-OHdG	8-hidroxi-2'-deoxiguanosina
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADP	adenosin difosfato
ANOVA	análisis de varianza
ARE	elementos de respuesta antioxidante
ASB	albúmina sérica bovina
ATP	adenosin trifosfato
Ca²⁺	calcio
CAT	catalasa
CCCP	carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona
CH₃SeCys	metil-selenocisteína
CTE	cadena de transporte de electrones
Cu²⁺	cobre
Cu_a²⁺	centro de cobre a presente en el complejo IV
Cu_b²⁺	centro de cobre b presente en el complejo IV
DCPIP	2,6-diclorofenolindofenol
DNP	2,4-dinitrofenol
DMSO	dimetilsulfóxido
EEM	error estándar de la media
EGTA	ácido etilenglicol tetra-acético
EH	enfermedad de Huntington
ERK	cinasa regulada por señal extracelular
ERN	especies reactivas de nitrógeno
ERO	especies reactivas de oxígeno
FAD	flavín adenina dinucleótido
FADH₂	flavín adenina dinucleótido en estado reducido
FCCP	carbonilcianuro-p-trifluorometoxihidrazona
Fe²⁺	hierro
Fe-S	centros hierro-azufre
FPM	Fuerza protón motriz

G6PDH	glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GCL	glutamato-cisteína ligasa
GR	glutación reductasa
GSH	Glutación
GST	glutación-S-transferasa
H⁺	protones
H₂O₂	peróxido de hidrógeno
HC	hexocinasa
HCl	ácido clorhídrico
HEPES	4-(2-hidroxiethyl) piperazina-1-etanosulfónico
HO-1	hemooxigenasa-1
HOCl	ácido hipocloroso
ICR	Índice de control respiratorio
ID	iodotironina-5-deiodinasa
KCl	cloruro de potasio
KCN	cianuro de potasio
Keap-1	proteína asociada a ECH similar a Kelch
KH₂PO₄	fosfato de potasio monobásico
Maf	proteínas proto-oncogénicas
MARK	proteína cinasa activada por mitógenos
ME	membrana externa
Mg²⁺	magnesio
MgCl₂	cloruro de magnesio
MI	membrana interna
MSEGTA	amortiguador mitocondrial
Na₂SeO₃	selenito de sodio
NAD⁺	nicotinamida adenina dinucleótido
NADH	nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NADP⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NaOH	hidróxido de sodio
NMDAr	receptores N-metil-D-aspartato

nNOS	óxido nítrico sintasa neuronal
NQO1	quinona oxidoreductasa
NR2A, NR2B	subunidades de los receptores NMDA
NRF1	factor respiratorio nuclear 1
Nrf2	factor nuclear relacionado al factor eritroide 2
NF-	factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
¹O₂	oxígeno singulete
O₂	oxígeno
O₂^{·-}	superóxido
OH[·]	radical hidroxilo
OH⁻	ión hidroxilo
ON[·]	óxido nítrico
ONOO⁻	peroxinitrito
OXPHOS	fosforilación oxidativa
P/O	relación moles de ATP sintetizados por mol de O ₂ usado
PCG-1	co-activador relacionado con el receptor de estrógenos
P_i	fosfato inorgánico
PKC	proteína cinasa c
PTPm	poro de permeabilidad de la membrana interna mitocondrial
Q	ubiquinona (oxidada)
QH₂	ubiquinol (reducida)
QUIN	ácido quinolínico
RNA	ácido ribonucleído
ROO[·]	radical peroxilo
RR	ribonucleótido reductasa
SDH	succinato deshidrogenasa
Se⁰	selenio elemental
Se⁻²	selenuro
Se⁴⁺	selenito
Se⁶⁺	selenato
SeCys₂	selenocisteína

SeMet	selenometionina
SeP	selenoproteína
SFN	sulforafano
SOD	Superóxido dismutasa
SOD- Cu-Zn	superóxido dismutasa dependiente de cobre-zinc
SOD-Mn	superóxido dismutasa dependiente de manganeso
TCA	ciclo de los ácidos tricarbónicos
TR	tioredoxina reductasa
Trp	triptofano
Trx	tioredoxina
Zn²⁺	zinc
μ_{H+}	gradiente electroquímico de protones