



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

LA ADMINISTRACIÓN DEL SELENIO INCREMENTA LA
EXPRESIÓN Y LA ACTIVIDAD DE LA TIORREDOXINA
REDUCTASA Y PROTEGE EN UN MODELO
EXPERIMENTAL DE NEURODEGENERACIÓN POR ÁCIDO
QUINOLÍNICO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

RAMÓN CARLOS LECONA VARGAS



MÉXICO, D.F.

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.



JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE	Profesor: MARINA GAVILANES RUIZ
VOCAL	Profesor: MARIA ELENA IBARRA RUBIO
SECRETARIO	Profesor: PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMÉNEZ
1er. SUPLENTE	Profesor: VANESSA REBECA MAYA AMPUDIA
2° SUPLENTE	Profesor: MARIO ADÁN MORENO EUTIMIO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE PATOLOGÍA VASCULAR CEREBRAL, INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA "MANUEL VELASCO SUÁREZ".

Este trabajo fue parcialmente apoyado por el proyecto de **CONACYT 103527**.

Se agradece a la **fundación AMSTRONG** por la beca otorgada al alumno durante el desarrollo de este trabajo en el periodo de julio a diciembre del 2011.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. PERLA D. MALDONADO JIMÉNEZ

SUSTENTANTE:

RAMÓN CARLOS LECONA VARGAS



Resumen

El aumento en la incidencia de las enfermedades neurodegenerativas está relacionada con el aumento en la esperanza de vida, son un conjunto de padecimientos progresivos y complejos, tienen en común la degeneración paulatina del sistema nervioso. Como últimas consecuencias se manifiestan alteraciones en la capacidad física y mental, que repercuten de manera importante en la calidad de vida de quien las padece. Debido a que no existe un tratamiento eficaz para revertir el daño ocasionado por este tipo de enfermedades, la búsqueda de tratamientos está justificada. En la actualidad existen diversos modelos experimentales que reproducen la fisiopatología asociada a estas enfermedades. En este trabajo se utilizaron ratas macho a las que se les indujo la neurodegeneración de manera química en el área estriatal del cerebro, se inyectó ácido quinolínico (QUIN), un agonista del glutamato. La administración de esta neurotoxina induce la sobreactivación de los receptores N-metil-D-aspartato (excitotoxicidad), lo que lleva a la despolarización neuronal celular, el ingreso de calcio y la generación de un estado prooxidante ya que hay evidencia de un incremento en el nivel de marcadores de daño por oxidación a proteínas, lípidos y DNA (Johri y Beal, 2011), que finalmente llevan a la muerte de las neuronas GABAérgicas en el tejido estriado.

Existen diversos sistemas antioxidantes que protegen del daño producido por las especies reactivas, pero cuando el estado oxidante es alto, ya no puede ser revertido. Entre esos antioxidantes tenemos al sistema de la tiorredoxina que consta de dos óxido-reductasas, la tiorredoxina (Trx) y la tiorredoxina reductasa (TrxR). Ambas son el mayor sistema disulfuro reductasa que proporciona electrones a un gran número de enzimas y contribuyen a la defensa contra el estrés oxidante.

En el presente trabajo se evaluó el efecto de la administración de selenito de sodio previa a la inyección de ácido quinolínico sobre: 1) las alteraciones histológicas mediante la tinción de hematoxilina y eosina (H&E); 2) el estado oxidante celular



(niveles de especies reactivas de oxígeno); 3) el daño a lípidos de membranas y al ADN (formación de 8-hidroxideoxiguanidina) por oxidación; y 4) los cambios en los niveles (inmunohistoquímica) y la actividad enzimática de la TrxR. En los resultados se observó que el selenito de sodio disminuyó el estado oxidante desde los 30 min y hasta las 24 h contribuyendo a la supervivencia celular, porque ejerció un aumento en la presencia de la TrxR y aumentó su actividad enzimática.

Estos resultados pueden tomarse como base para el planteamiento de nuevos estudios que determinen la funcionalidad del sistema Trx-TrxR en enfermedades neurodegenerativas cuya fisiopatología esté relacionada con el estrés oxidante.





CONTENIDO

	Página
Índice de figuras	I
Índice de gráficas	III
Índice de tablas	V
Abreviaturas	VI
1. Antecedentes	1
1.1 Enfermedades neurodegenerativas	1
1.1.1 Sintomatología	1
1.1.2 Fisiopatología	1
1.2 Excitotoxicidad	2
1.2.1 Glutamato (Glu)	2
1.2.2 Receptores de glutamato	3
1.2.2.1 Receptores tipo NMDA	4
1.2.2.2 Implicaciones patológicas del receptor NMDA	4
1.3 Estrés oxidante	6
1.3.1 Especies reactivas de oxígeno (ERO) y de nitrógeno (ERN)	8
1.3.1.1 Producción de ERO en la mitocondria	8
1.4 Ácido quinolínico (QUIN)	9
1.4.1 Vía de la Kinurenina	9
1.5 Antioxidantes	11
1.5.1 Selenio	11
1.5.1.1 Incorporación del selenio al organismo	11
1.5.2 Selenocisteína	12
1.5.3 Tiorredoxina reductasa (TrxR)	12
1.5.4 Tiorredoxina (Trx)	13



1.5.5 Sistema de la tiorredoxina – tiorredoxina reductasa (Trx – TrxR)	14
2. Planteamiento del problema	15
3. Hipótesis	16
4. Objetivo	17
5. Procedimiento experimental	18
5.1. Reactivos	18
5.2. Animales	18
5.3. Diseño experimental	18
5.4. Técnicas	20
5.4.1. Histología	20
5.4.2. Inmunohistoquímica	20
5.4.3. Actividad enzimática de la tiorredoxina reductasa	20
5.4.4. Formación de especies reactivas de oxígeno	20
5.4.5. Peroxidación de lípidos	20
6. Resultados	23
7. Discusión	32
8. Conclusiones	37
9. Referencias	38



Índice de Figuras

	Página
Figura 1. Clasificación de los receptores a Glutamato. N-Metil-D-Aspartato (NMDA), ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasol (AMPA) y ácido kaínico (KA).	3
Figura 2. Reducción univalente del O ₂ con la transferencia de un electrón.	7
Figura 3. Vía de la Kinurenina (Tomada de Stone et al., 2007).	10
Figura 4. Sistema de la tiorredoxina (Trx) - tiorredoxina reductasa (TrxR). La TrxR mantiene reducido el sitio activo disulfuro en la Trx y diversos sustratos consumiendo NADPH. La TrxR es un eficiente reductor de péptidos y proteínas incluyendo a las peroxirredoxinas (Prx) y al disulfuro de glutati6n (GSSG) (Tomado de Nordberg y Arnér, 2001).	14
Figura 5. Efecto del selenito de sodio (Se: 0.625 mg/kg/día, <i>i.p.</i> durante 5 días) y/o ácido quinolínico (Q: 240 nmol/ μ L, infundido intraestriatalmente 120 min después de la última inyección de Se) sobre los niveles de 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG empleando inmunohistoquímica) en el estriado de rata. Los cortes (5 μ m de grosor) se contratiñeron con hematoxilina. Se muestran imágenes representativas de cada grupo: control (Ct), Se, Q y Q+Se en cada tiempo estudiado (30 min, 2 h, 24 h y 7 días post lesión). Las células inmunorreactivas son mostradas con flechas, 40x.	23
Figura 6. Efecto del selenito de sodio (Se: 0.625 mg/kg/día, <i>i.p.</i> durante 5 días) y/o ácido quinolínico (Q: 240 nmol/ μ L, infundido intraestriatalmente 120 min después de la última inyección de Se) sobre la morfología del estriado de rata. Los cortes (5 μ m de grosor) se	



tiñeron con hematoxilina y eosina. Se muestran imágenes representativas de cada grupo: control (Ct), Se, Q y Q+Se en cada tiempo estudiado (30 min, 2 h, 24 h y 7 días post lesión). Los núcleos picnóticos se representan con un triángulo, el edema en el neurópilo con un asterisco y los núcleos lisados con flechas, 40 x.

25

Figura 7. Efecto del selenito de sodio (Se: 0.625 mg/kg/día, *i.p.* durante 5 días) y/o ácido quinolínico (Q: 240 nmol/ μ L, infundido intraestriatalmente 120 min después de la última inyección de Se) sobre los niveles de tiorredoxina reductasa (Inmunohistoquímica de TrxR) en el estriado de rata. Los cortes (5 μ m de grosor) se contratiñeron con hematoxilina. Se muestran imágenes representativas a 40x de cada grupo: control (Ct), Se, Q y Q+Se en cada tiempo estudiado (30 min, 2 h, 24 h y 7 días post lesión). Las células inmunorreactivas se muestran con flechas, 40X.

28



Índice de gráficas

Página

Gráfica 1. Porcentaje de células inmunorreactivas a 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG) en cada grupo: control (Ct), Se, Q y Q+Se y en cada tiempo estudiado (30 min, 2 h, 24 h y 7 días post lesión) después de la inyección de Q o SSI. Los datos se muestran como el promedio \pm EE (n=4). ^aP < 0.05 vs. grupo Ct; ^bP < 0.05 vs. grupo Q y ^cP < 0.05 vs. grupo Se. 24

Gráfica 2. Porcentaje de daño celular en cada grupo: control (Ct), Se, Q y Q+Se y en cada tiempo estudiado (30 min, 2 h, 24 h y 7 días post lesión) después de la inyección de Q o SSI. Los datos se muestran como el promedio \pm EE (n=4). ^aP < 0.05 vs. grupo Ct; ^bP < 0.05 vs. grupo Q y ^cP < 0.001 vs. grupo Se. 26

Gráfica 3. Porcentaje de células inmunorreactivas a tiorredoxina reductasa (TrxR) en cada grupo: control (Ct), Se, Q y Q+Se y en cada tiempo estudiado (30 min, 2 h, 24 h y 7 días post lesión) después de la inyección de Q o SSI. Los datos se muestran como el promedio \pm EE (n=4). ^aP < 0.05 vs. grupo Ct; ^bP < 0.05 vs. grupo Q y ^cP < 0.05 vs. grupo Se. 28

Gráfica 4. Efecto del selenito de sodio (Se: 0.625 mg/kg/día, *i.p.* durante 5 días) y/o ácido quinolínico (Q: 240 nmol/ μ L, intraestriatalmente infundido 120 min después de la última inyección de Se) sobre la actividad de la tiorredoxina reductasa (TrxR) en el estriado de rata. La actividad enzimática se expresó como el porcentaje con respecto al control en cada grupo: Se, Q y Q+Se y en cada tiempo estudiado (30 min, 2 h, 24 h y 7 días post lesión) después de la inyección de Q o SSI. Los datos se muestran como el promedio \pm EE



(n=4). ^aP < 0.01 vs. grupo Ct; ^bP < 0.05 vs. grupo Q y ^cP < 0.05 vs. grupo Se.

30

Gráfica 5. Efecto del selenito de sodio (Se: 0.625 mg/kg/día, *i.p.* durante 5 días) y/o ácido quinolínico (Q: 240 nmol/μL, intraestriatalmente infundido 120 min después de la última inyección de Se) sobre los niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO) en el estriado de rata. La producción de ERO se expresó como el porcentaje con respecto al control en cada grupo: Se, Q y Q+Se y en cada tiempo estudiado (30 min, 2 h, 24 h y 7 días post lesión) después de la inyección de Q o SSI. Los datos se muestran como el promedio ± EE (n=4). ^aP < 0.05 vs. grupo Ct; ^bP < 0.05 vs. grupo Q y ^cP < 0.05 vs. grupo Se.

30

Gráfica 6. Efecto del selenito de sodio (Se: 0.625 mg/kg/día, *i.p.* durante 5 días) y/o ácido quinolínico (Q: 240 nmol/μL, intraestriatalmente infundido 120 min después de la última inyección de Se) sobre los niveles de lípidos oxidados (LPx) en el estriado de rata. Los niveles de LPx se expresaron como el porcentaje con respecto al control en cada grupo: Se, Q y Q+Se y en cada tiempo estudiado (30 min, 2 h, 24 h y 7 días post lesión) después de la inyección de Q o SSI. Los datos se muestran como el promedio ± EE (n=4). ^aP < 0.01 vs. grupo Ct; ^bP < 0.05 vs. grupo Q y ^cP < 0.05 vs. grupo Se.

31



Tabla 1. Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno más comunes, así como la fuente productora, agente antioxidante y producto generado (Tomada de Nordberg y Arnér, 2001).	7
---	---



Abreviaturas

8-OHdG	8-hidroxideoxiguanosina
ANOVA	Análisis de la varianza
ADN	Ácido desoxirribonucleico
EE	Error estándar
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
ERO	Especies reactivas de oxígeno
GABA	Ácido γ -amino-butírico
H & E	Tinción de hematoxilina y eosina
LPx	Lipoperoxidación
NMDA	N-Metil-D-Aspartato
QUIN	Ácido quinolínico
Se	Selenito de sodio
Trx	Tiorredoxina
TrxR	Tiorredoxina reductasa



1. Antecedentes

1.1 Enfermedades neurodegenerativas

Las enfermedades neurodegenerativas son un conjunto de padecimientos que tienen en común ser progresivos y muy complejos, con degeneración paulatina del sistema nervioso que trae como principal consecuencia incapacidad física y mental. Se deben a un aumento en la muerte celular y a una disminución en los sistemas de reparación celular en áreas específicas del cerebro, que afectan la actividad física diaria, el equilibrio, la respiración y desencadenan desórdenes cognitivos y del habla que afectan tanto al individuo que las padece como a los que están en su entorno (Association, 1994).

Pueden originarse como un proceso crónico asociado al envejecimiento o por un daño severo agudo. La clasificación de estas enfermedades ha sido motivo de muchos estudios pues los síntomas iniciales suelen ser similares en los diferentes padecimientos (Martínez-Rojas y Feria-Velasco, 2009).

1.1.1 Sintomatología

Las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por ser muy diversas, con sintomatologías particulares en cada padecimiento; sin embargo todas tienen en común presentar problemas cognitivos (que son evidenciados en las pruebas neurofisiológicas), cambios en la personalidad y el estado de ánimo y sobretodo una dificultad para poder realizar las actividades diarias (caminar, trabajar, hablar) (Association, 1994). Cabe destacar que los síntomas se manifiestan una vez que hay un deterioro neuronal avanzado.

1.1.2 Fisiopatología

A pesar de compartir características similares, la fisiopatología de las enfermedades neurodegenerativas es muy extensa, algunas están asociadas a mutaciones genéticas, otras a la expansión de repetidos de tripletes como en la enfermedad de Huntington, en la que se origina una proteína poli glutaminada (The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993), otras a la



agregación de proteínas con enrollamiento anormal, y otras más a la formación de agregados fibrilares como la presencia de placas de péptido beta amiloide en la enfermedad de Alzheimer (Glennner y Wong, 1984); sin embargo, todas se pueden relacionar con el mecanismo de excitotoxicidad (Dong et al., 2009).

Las enfermedades neurodegenerativas presentan una merma selectiva neuronal en regiones específicas del cerebro. Por ejemplo, en la enfermedad de Huntington la pérdida neuronal se restringe a la zona estriatal, la corteza cerebral, el tálamo y el cerebelo (Rosas et al., 2003), mientras que en la enfermedad de Alzheimer la corteza entorrinal es una de las principales áreas afectadas, con progresión paulatina hacia el hipocampo (Attems et al., 2012).

1.2 Excitotoxicidad

La excitotoxicidad es un evento complejo que algunos autores definen como la muerte neuronal causada por la sobreactivación y la sobreexpresión de los receptores a glutamato e incluso por la sobre activación de los receptores sensibles a GABA (Mishra y Fritz, 2001; Nuñez et al., 2003). Como consecuencia de esta sobreactivación hay tres factores clave que se desencadenan: 1) la sobreactivación de los receptores para aminoácidos excitadores, 2) el incremento de Ca^{2+} en el citoplasma y 3) la consecuente generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN) (Coyle y Puttfarcken, 1993).

1.2.1 Glutamato

El glutamato (Rowley et al., 2012) es un aminoácido no esencial que posee dos grupos carboxilo y presenta carga. En el sistema nervioso central, a pesar de no atravesar la barrera hematoencefálica, el glutamato puede alcanzar concentraciones más elevadas que en el resto de los tejidos porque es sintetizado en la mitocondria a partir de glucosa y otros precursores (Pasantes et al., 1991), dicha concentración se encuentra entre 5 y 10 mmol/Kg (Sheldon y Robinson, 2007).



1.2.2 Receptores de glutamato

El glutamato ejerce sus acciones sobre receptores membranales ionotrópicos y metabotrópicos. Los receptores ionotrópicos están acoplados a canales iónicos y se clasifican de acuerdo a su afinidad por agonistas específicos en receptores para N-Metil-D-Aspartato (NMDA), para el ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasol y el ácido kaínico (KA); mientras que los metabotrópicos están acoplados a proteínas G y se clasifican por la homología en sus secuencias de aminoácidos en por lo menos 8 familias (Glu_m) (Figura 1) (Dingledine et al., 1999).

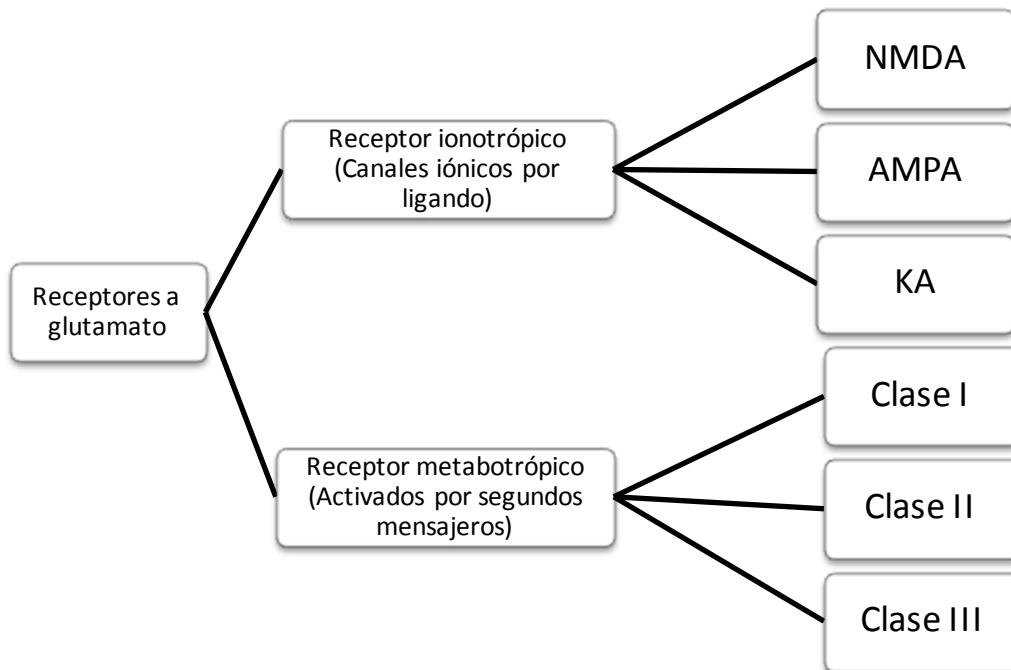


Figura 1. Clasificación de los receptores a glutamato. N-Metil-D-Aspartato (NMDA); ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasol (AMPA) y ácido kaínico (KA).

Los receptores ionotrópicos destacan por ser muy permeables a iones y su función es dependiente de la conformación estereoquímica (Coyle y Puttfarcken, 1993). La composición proteica de estos receptores consta de complejos oligoméricos que estructuralmente son 4 subunidades polipeptídicas y cada una de ellas contiene 3 dominios transmembranales (TM1, TM3 y TM4) y un bucle citosólico que se alinea al canal. Las diferentes combinaciones dan lugar a receptores funcionalmente



diferentes pero con el mismo agonista, el glutamato (Vandenberghe y Bredt, 2004).

En cuanto a los receptores metabotrópicos, se sabe que median los efectos lentos del glutamato y se clasifican en tres grupos distintos, siendo los de clase I los que se activan por una fosfolipasa C, mientras que los de clase II y III están acoplados negativamente a una adenilato ciclasa (Flores-Soto et al., 2012).

1.2.2.1 Receptores tipo NMDA

Los receptores de NMDA, a diferencia de los otros tipos de receptores, destacan por su dependencia al voltaje y se mantienen bloqueados por acción del Mg^{2+} . Son permeables a cationes como Na^+ , K^+ y Ca^{2+} ; y constan de un sitio de unión a glutamato, a glicina, a poliaminas, a Zn^{2+} y a Mg^{2+} , donde también se une un antagonista farmacológico no competitivo denominado MK-801 ((+)-5-metil-10,11-dihidroxi-5H-dibenzo (a,d) cicloheptano-5,10-imina maleato) (de Bartolomeis et al., 2013).

1.2.2.2 Implicaciones patológicas del receptor NMDA

Además de ejercer importantísimas funciones en los procesos sinápticos de plasticidad neuronal, el glutamato es el principal responsable de la fisiopatología de algunas enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson, Huntington y esclerosis lateral amiotrófica, así como en condiciones patológicas de accidente cerebrovascular, hipoxia e isquemia/reperfusión. Por esa razón debe estar finamente regulado en el momento y en las concentraciones indicadas (Mattson, 2000). Dicha regulación se debe a la presencia simultánea de receptores de tipo NMDA y no NMDA. Los receptores NMDA se caracterizan por ser dependientes de voltaje, ser bloqueados por Mg^{2+} y tener una alta permeabilidad a Ca^{2+} ; por su parte los receptores no NMDA son independientes del voltaje, provocan el influjo de Na^+ y la salida de K^+ con despolarización de la membrana plasmática y la expulsión de Mg^{2+} . Si dicho escenario no se encuentra correctamente regulado, la activación de los receptores NMDA con ayuda del



glutamato y su coagonista la glicina, permitirían la entrada de más Na^+ y Ca^{2+} a la célula (Estrada-Sánchez et al., 2008). En un estado no patológico la regulación de esta maquinaria requiere de la eliminación del glutamato en el espacio sináptico, ya sea por difusión, degradación enzimática o por la recaptura, este último permite la recuperación del glutamato que nuevamente será utilizado (Raiteri et al., 2002). Dicha recaptura requiere a la ATPasa de Na^+/K^+ para ayudarse del gradiente iónico y así transportar al glutamato desde el espacio sináptico de las neuronas y las células gliales a su interior para mantener el nivel de glutamato por debajo de los límites excitotóxicos.

Al ser activados los receptores ionotrópicos glutamatérgicos se inicia la despolarización de la célula nerviosa, desencadenando la salida de K^+ y la entrada simultánea de Na^+ y Ca^{2+} . El desajuste en la homeostasis de Ca^{2+} origina que la bomba de Ca^{2+} , el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y las proteínas intracelulares de Ca^{2+} se saturen. Tras este evento, la mitocondria capta el exceso de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial, acumulándose el exceso de cargas positivas y desencadenando su despolarización irreversible por la activación del poro de transición mitocondrial, lo que consecuentemente reduce la síntesis de ATP por la suspensión de la fosforilación oxidativa (Mattson et al., 2000). Tras la activación del poro, el Ca^{2+} retorna al citosol, promoviendo así la generación de radicales libres a nivel mitocondrial, ya que la membrana mitocondrial interna no continua siendo una barrera para los protones, lo que lleva a la disipación de la fuerza otorgada por el gradiente, dicho evento anula completamente el metabolismo en este organelo y promueve la generación de ERO incluyendo radicales superóxido y óxido nítrico que fomentarán la lipoperoxidación (LPx) de las diversas membranas (membrana celular, retículo endoplásmico, mitocondria, etc.), alterando los transportadores de la membrana y los canales iónicos (Sugaya et al., 1998). Mientras tanto en el citoplasma, la activación de diversas vías de señalización intracelular dependientes de proteínas cinasas o fosfatasa estimularán la producción de enzimas catabólicas, que simultáneamente generarán daño a proteínas, material genético, citoesqueleto y desestabilizarán las membranas (Kawasaki et al., 1997).



Se sabe que el óxido nítrico puede difundir a la terminal presináptica glutaminérgica y con ello estimular la liberación de más glutamato (Nicholls y Ward, 2000).

Además, el gradiente alterado de Na^+ debido a la entrada masiva de este ión, alterará la funcionalidad de las bombas, canales iónicos y transportadores. De igual manera el influjo de Cl^- además de perturbar los mecanismos de transporte, estimulará la liberación de glutamato y desencadenará más daño por excitotoxicidad (Mattson, 2000).

1.3 Estrés oxidante

El estrés oxidante está descrito como la condición patológica en la que la generación de ERO está excedida respecto a su neutralización (Sies y Cadenas, 1985). En otras palabras, es la pérdida de una condición de equilibrio que está relacionada con problemas en la producción o distribución de las ERO. Cuando no existe un balance se fomenta el daño celular en membranas, proteínas y ADN, terminando en un mal funcionamiento celular y promoviendo afecciones como enfermedades cardiovasculares, aterosclerosis, hipertensión, isquemia / reperfusión, diabetes, alergias, artritis reumatoide, cáncer, enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson, Huntington, etc. (Galli et al., 2005).

1.3.1 Especies reactivas de oxígeno (ERO) y de nitrógeno (ERN)

Las especies reactivas son moléculas derivadas del O_2 y del N_2 que se caracterizan por ser altamente reactivas, algunas tienen en su capa de valencia electrones no apareados (Figura 2). Comprenden especies como el anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), el radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$), el ozono (O_3), entre otros (Simic et al., 1989).

Dichas especies juegan papeles vitales en los sistemas biológicos, entre los que destaca el óxido nítrico (NO) en la señalización celular (Palmer et al., 1987), el



ácido hipocloroso (HOCl) que es transformado en $\cdot\text{OH}$, ya sea por una reacción tipo Fenton o por reducción a ion cloruro con la formación de $\cdot\text{OH}$, que participa en la defensa antimicrobiana en el fagosoma (Rosen et al., 1990). Algunas ERO, como el H_2O_2 , también actúan como segundos mensajeros en la señalización intracelular de hormonas, factores de crecimiento, citocinas y neurotransmisores (Thannickal y Fandburg, 2000) e incluso son factores mitogénicos (Valko et al., 2007). Cuando los procesos de formación y de neutralización pierden el equilibrio se desencadenan problemas como el cáncer donde ocurren modificaciones químicas en el DNA por acción de los $\cdot\text{OH}$ (Marnett, 2000).

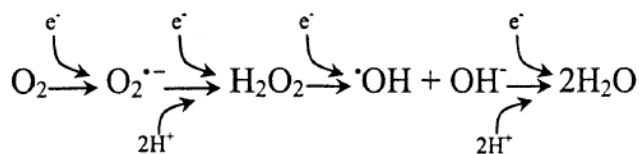


Figura 2. Reducción univalente del O_2 con la transferencia de un electrón.

Las ERO pueden formarse también por agentes físicos como la radiación y la luz ultravioleta (Brenneisen et al., 1998); por procesos químicos no enzimáticos como las reacciones tipo Fenton y Haber-Weiss (Sharpe, 2003); por xenobióticos o como parte del metabolismo celular (Henkler et al., 2012) (Tabla 1).

Tabla 1. Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno más comunes, así como la fuente productora, agente antioxidante y producto generado (Tomada de Nordberg y Arnér, 2001).

ERO / ERN	Principal productor	Agente antioxidante	Producto(s)
Anión Superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$)	Fosforilación oxidativa Fagocitos activos Xantina oxidasa Flavoenzimas	Superóxido dismutasa Superóxido reductasa en bacterias	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ H_2O_2
Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)	Superóxido dismutasa NADPH-oxidasa de neutrófilos Glucosa oxidasa Xantina oxidasa	Glutación peroxidasa Catalasa Peroxirredoxinas	$\text{H}_2\text{O} + \text{GSSG}$ $\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ H_2O
Radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$)	Metales de transición		
Óxido nítrico (NO)	Sintasa de óxido nítrico	Glutación	GSNO



Los principales blancos moleculares de las ERO y las ERN son los dobles enlaces en los lípidos, los residuos de cisteína y metionina en las proteínas y la posición C8 en la desoxiguanosina del DNA (Mailloux y Harper, 2012).

1.3.1.1 Producción de ERO en la mitocondria

Las ERO y ERN se originan como parte del metabolismo celular en los organismos aerobios por diversos organelos, destacándose la mitocondria. Ahí se llevan a cabo las reacciones de óxido reducción que provienen de los procesos oxidativos del metabolismo donde se destaca la cadena transportadora de electrones que tiene como aceptor final de electrones al O_2 . Este sistema transportador de electrones consume aproximadamente el 85% del O_2 utilizado en las células y cerca de un 5% es convertido en ERO causando daño en los transportadores y desencadenando una serie de desórdenes neurodegenerativos (Hwang et al., 2010).

Para que se produzca energía es vital en todo organismo aerobio que haya una correcta transferencia de electrones a través de los complejos enzimáticos en la membrana mitocondrial. Se ha demostrado que en los complejos I y III y en las deshidrogenasas de glicerol-3-fosfato, 2-oxaglutarato y piruvato se forma $O_2^{\bullet-}$ y $\bullet OH$ (Grivennikova y Vinogradov, 2006).

El $\bullet OH$ y las demás ERO formadas pueden dañar la membrana interna mitocondrial y los complejos de la cadena respiratoria, permitiendo la liberación de iones metálicos de transición (como el hierro), el cual destaca por ser un catalizador en reacciones tipo Fenton. Dicho fenómeno se puede considerar como una reacción en cadena, ya que el daño se seguiría generando. A pesar de esto, el organismo tiene una fina homeostasis, es decir la mitocondria posee enzimas como la superóxido dismutasa dependiente de manganeso (MnSOD) que cataliza la conversión de $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 y la glutatión peroxidasa (GPx), que transforma el H_2O_2 en H_2O (Tabla 1) (Nordberg y Arnér, 2001).



Este ambiente altamente oxidante incrementa la permeabilidad mitocondrial debido al citocromo C que incrementa el Ca^{2+} intracelular (Kroemer et al., 1998), el cual en las neuronas actúa como un segundo mensajero liberando neurotransmisores, induciendo la expresión genes, contribuyendo a la proliferación celular, la excitabilidad y la apoptosis (Buchholz et al., 2007). Debido a la activación de diversas enzimas entre ellas proteasas, lipasas y endonucleasas se favorece la degradación de diferentes componentes celulares trayendo consigo muerte celular (Rosa y Rapoport, 2009).

1.4 Ácido quinolínico (QUIN)

El QUIN (ácido piridin-2,3-dicarboxílico) es un compuesto que consta de un anillo piridínico, con dos sustituciones carboxilo. Es un agonista endógeno competitivo de los receptores de glutamato con cierta selectividad por los de tipo NMDA. Ocasiona neurodegeneración en el cerebro de mamíferos por un evento excitotóxico al despolarizar las neuronas elevando la concentración intracelular de Ca^{2+} , disminuyendo la tasa de ATP, activando la óxido nítrico sintasa (nNOS) con generación excesiva de óxido nítrico (Albin y Greenamyre, 1992). Así mismo, induce una disfunción progresiva en mitocondrias (Bordelon et al., 1997). Se ha reportado que el daño inducido por el QUIN puede ser controlado por algunas moléculas antioxidantes como la S-alilcisteína, diferentes compuestos polifenólicos, el selenio, entre otros (Braidy et al., 2010).

1.4.1 Vía de la Kinurenina

El QUIN se encuentra de manera endógena en el cerebro, se produce a partir de la oxidación del triptófano –un aminoácido esencial- con la ayuda de la triptófano dioxigenasa, que genera como metabolito final la nicotinamida adenina dinucleótido (Figura 3). Esta ruta metabólica produce un intermediario llamado kinurenina, un antagonista de los receptores de NMDA (Perkins y Stone, 1982), se cree que tiene acción neuroprotectora (Demeter et al., 2013) y además es producida principalmente por los astrocitos. La kinurenina es degradada



principalmente por 2 vías catabólicas a 3-hidroxicinurenina o a ácido kinurénico. En la primera vía, el ácido 3-hidroxiantranílico (obtenido con la kinurerinasa) y la 3-hidroxicinurenina son los principales responsables de la generación de radicales libres (Stone y Darlington, 2002) y en estados inflamatorios donde hay activación del sistema inmune por el interferón- γ se observa un incremento de la 3-hidroxicinurenina (Saito et al., 1992).

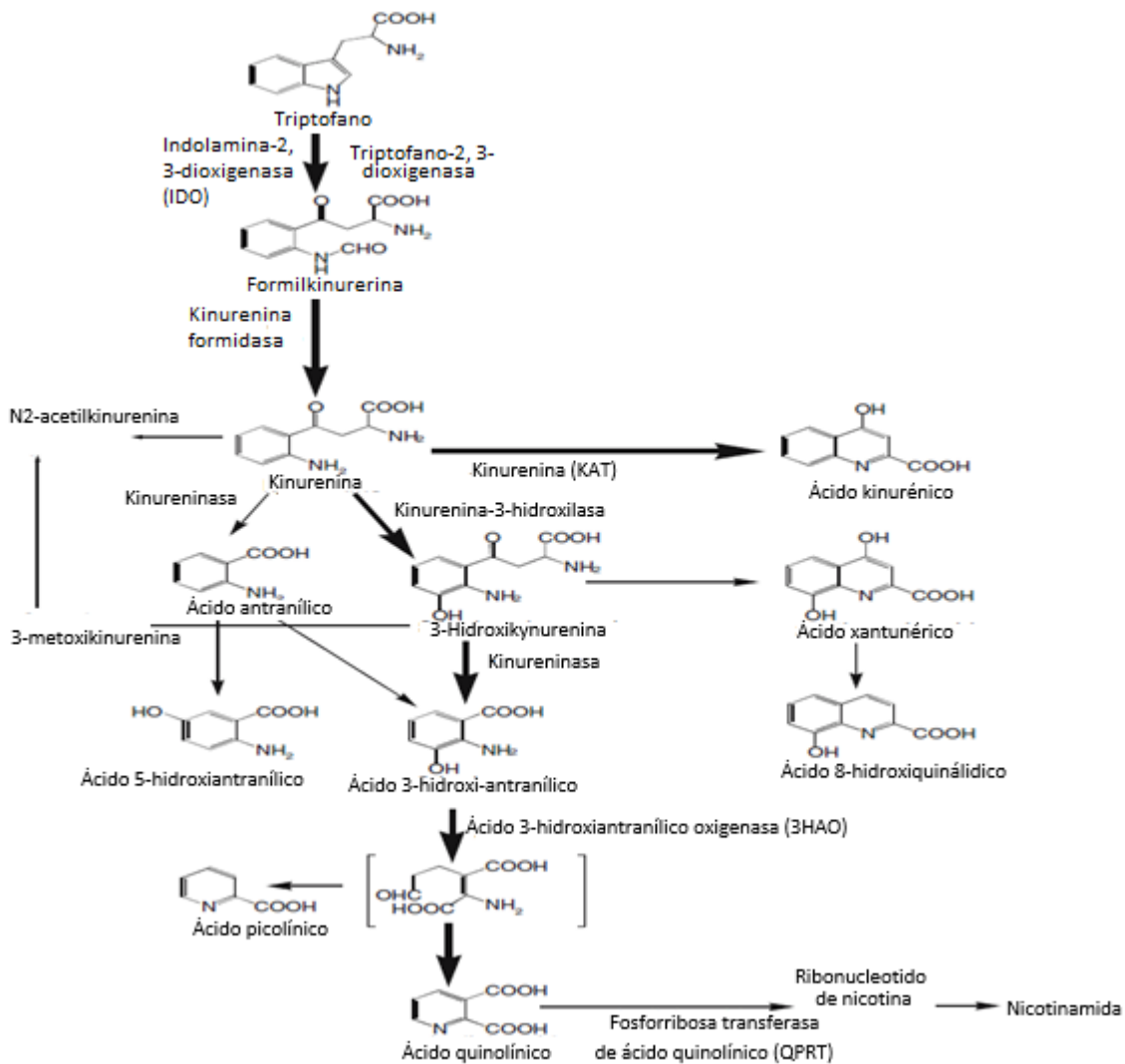


Figura 3. Vía de la kinurenina (Tomada de Stone et al., 2007).



1.5 Antioxidantes

La acumulación de ERO en la neurona y la generación de estrés oxidante es minimizada por agentes quelantes o atrapadores de radicales libres. Estos son la primera línea de defensa contra las agresiones y pueden ser clasificados en no enzimáticos y enzimáticos. Los primeros incluyen algunas vitaminas como el ácido ascórbico (vitamina C), el α -tocoferol (vitamina E), el ácido retinoico, los flavonoides, los carotenoides y principalmente el glutatión; mientras que en el segundo grupo se incluye a la SOD, la GPx, la catalasa, la TrxR, etc. Los antioxidantes son sustancias capaces de detener la formación de radicales libres que podrían desencadenar un daño celular, se encuentran intracelularmente y extracelularmente para garantizar la homeostasis (Surapaneni y Jainu, 2014).

1.5.1 Selenio

Es un elemento no metálico descubierto en 1817 por Jöns Berzelius, su número atómico es 34, se ha clasificado como un elemento traza o micronutriente en la dieta debido a que se encuentra en alimentos como la leche, el pescado, las frutas, los vegetales, los cereales, etc. (Kumar y Krishnaswamy, 1997), siendo diferente la cantidad de ingesta de este micronutriente en el mundo. Consumimos este elemento en forma de sales inorgánicas como el selenito de sodio, el selenato de sodio y también unido de manera covalente en varias formas orgánicas como selenocisteína y selenometionina (Darvesh y Bishayee, 2010).

Es el componente de diversas proteínas microbianas como la GPx, la ácido nicotínico hidroxilasa, la xantina deshidrogenasa y la glicina reductasa en *Clostridium sp* (Turner y Stadtman, 1973).

1.5.1.1 Incorporación del selenio al organismo

El principal consumo de Selenio de manera inorgánica es en sales de selenito y selenato de sodio y de manera orgánica en forma de selenometionina. La tasa de absorción es mayor al 90% en especies monogástricas y aves de corral. Requiere de transporte activo en el duodeno a excepción del selenito que es por difusión



simple, mientras que el mecanismo del selenato es por cotransporte. En circulación, el selenito es rápidamente seleccionado por los eritrocitos y transportado en el torrente sanguíneo por la selenoproteína P, una glicoproteína extracelular descubierta en 1993, que también sirve como principal reservorio de este elemento traza. En la sangre, el selenio es distribuido al hígado donde es reducido a selenuro de hidrógeno (H_2Se) por el glutatión y la glutatión reductasa, para posteriormente ser transportado por la albúmina e incorporarse a la síntesis de proteínas. Después de estar en su forma de selenuro y ser distribuido, intracelularmente sufrirá metilaciones para transformarse en el ion trimetil selenio $[(CH_3)_3Se^+]$ (Mehdi et al., 2013), el cual servirá de molde para la producción de selenometionina o selenocisteína. La selenoproteína P es altamente expresada en cerebro, hígado y testículos (Fairweather-Tait et al., 2010).

1.5.2 Selenocisteína

Considerado como el aminoácido número 21, la selenocisteína es un análogo de la cisteína (cys) intercambiando azufre por selenio. Se encuentra en 25 selenoproteínas y selenoenzimas de importancia humana, algunas expresadas de manera constitutiva y otras en diferentes órganos y tejidos (Kryukov et al., 2003). Para incorporar este elemento se requiere una compleja maquinaria enzimática (catabólica y anabólica), factores de transcripción, tRNA, un factor de elongación específico denominado SelB o EF-Sec, el cual reconoce al elemento SECIS (elemento de incorporación de Sec) presente en los mRNA de las selenoproteínas, el cual tiene la función de suprimir la terminación de la cadena proteica e incorporar a Sec a la proteína naciente, pues el codón que codifica para este aminoácido es UGA (irónicamente el codón que codifica la terminación de una cadena proteica) (Kossinova et al., 2013).

1.5.3 Tiorredoxina reductasa (TrxR)

La TrxR es una selenoproteína que pertenece a la familia de las piridino-nucleótido-disulfuro-oxido reductasas y a su vez es una flavoenzima dimérica. En cuanto a su existencia en los reinos hay dos tipos, 1) una de bajo peso molecular



(alrededor de 70 KDa), que se encuentra en bacterias, archaeae y eucariotas inferiores y 2) una de alto peso molecular (de 110 KDa o mayor) que se encuentra en eucariotas superiores (Williams et al., 2000). Fue descubierta por Moore y colaboradores (Moore et al., 1964), mientras que su aislamiento y purificación comprendió entre 1970 y 1982, cuando encontraron una alta homología con la glutatión reductasa (Luthman y Holmgren, 1982). En cuanto a su actividad catalítica esta enzima tiene una secuencia conservada en el sitio carbonilo terminal (-Gly-Cys-Sec-Gly-COOH) que le proporciona su actividad redox (Zhong et al., 1998).

En el humano existen tres isoformas de esta enzima codificadas en diferentes genes, la TrxR 1 que es citosólica, la TrxR 2 que es mitocondrial y la TrxR 3 mejor conocida como tiorredoxina glutarredoxina reductasa, que se encuentra confinada a testículos, en contraste con la TrxR 1 y la TrxR 2 que se expresan de manera constitutiva en todas las células y tejidos (Sun et al., 2001).

También se ha demostrado que la TrxR es esencial para la viabilidad ya que en embriones de ratones knock out, la letalidad ocurre cuando hay falta de TrxR (Bösl et al., 1997).

1.5.4 Tiorredoxina (Trx)

Las Trx son un grupo de proteínas que actúan como antioxidantes, facilitan la reducción de diversos sustratos a través de un intercambio tiol – disulfuro. Se encuentran ampliamente distribuidas en mamíferos y procariotas y está relacionada con la regulación del sistema inmune, la producción de factores de transcripción, etc. Existen tres distintas isoformas de Trx codificadas en distintos genes, la más estudiada es la Trx-1 de 12 KDa, la Trx-2 mitocondrial de 60 aminoácidos y una tercera en espermatozoides (Nordberg y Arnér, 2001). Constan de una estructura de 5 β -plegadas y 4 α -hélices y un estrecho segmento de hélice que se encuentra en el centro de láminas β (Lu y Holmgren, 2014).



1.5.5 Sistema de la tiorredoxina – tiorredoxina reductasa (Trx-TrxR)

El sistema de la Trx-TrxR comprende al NADPH, la TrxR y la Trx (Figura 4). Es el mayor sistema disulfuro reductasa que provee electrones a un gran número de enzimas y es muy importante para la síntesis de DNA, la regulación del sistema inmune y la defensa contra el estrés oxidante (Lu y Holmgren, 2014).

La Trx es un donador específico de electrones para algunas peroxirredoxinas, reduce diversos factores de transcripción incluyendo la proteína p53, NF- κ B y AP-1, previene la apoptosis uniéndose a la señal reguladora de apoptosis cinasa 1 (ASK-1) siempre y cuando no se encuentre oxidada (Nordberg y Arner, 2001).

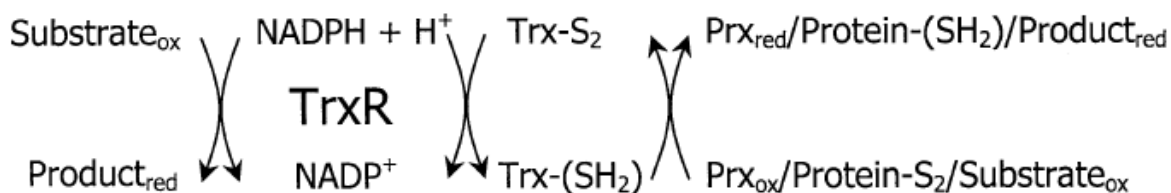


Figura 4. Sistema de la Tiorredoxina (Trx) - tiorredoxina reductasa (TrxR). La TrxR mantiene reducido el sitio activo disulfuro en la Trx y diversos sustratos consumiendo NADPH. La TrxR es un eficiente reductor de péptidos y proteínas incluyendo a las peroxirredoxinas (Prx) y al disulfuro de glutatión (GSSG) (Tomado de Nordberg y Arnér, 2001).



2. Planteamiento del problema

En la actualidad no existe un tratamiento preventivo y eficiente que pueda revertir los daños excitotóxicos en células presentados en las enfermedades neurodegenerativas, ya que se ha evidenciado que uno de los mecanismos de daño neuronal es mediante el estrés oxidante. Se ha reportado que la administración en ratas, de dosis bajas de Se (1 $\mu\text{g}/100$ g de peso) previene el daño en el tejido cerebral, disminuye el estrés oxidante y la concentración de neurotransmisores inducidos por el QUIN, mientras que las dosis altas (50 mg/100 g de peso) son tóxicas (Sreekala e Indira, 2009). Por otro lado, la administración previa de Se (0.625 mg/kg de peso, por 5 días, i.p.) disminuye la LPx e incrementa la actividad de la GPx 2 horas después de la administración del QUIN y además, atenúa el daño neuronal, la conducta rotatoria y la depleción de GABA 7 días después de la administración del QUIN (Santamaría et al., 2003). Dos años después, Santamaría y colaboradores (2005) reportaron que el efecto protector del Se, podría estar asociado con su capacidad de inhibir los eventos proapoptóticos ya que disminuyó los niveles de I κ B- α , incrementó la translocación nuclear de NF- κ B y evitó la activación de caspasa-3 y la fragmentación del DNA inducidos por el QUIN, todo esto a través de un mecanismo que probablemente involucre la activación temprana de la GPx (una selenoproteína). Sin embargo, ningún otro estudio se ha realizado desde entonces. Debido a que el sistema Trx-TrxR es un eficiente sistema antioxidante, el cual ha sido poco estudiado a nivel sistema nervioso, y a que la TrxR es una selenoproteína que podría estar siendo regulada por el tratamiento con Se, en este trabajo se evaluó el efecto de la administración previa selenito de sodio (0.625 mg/kg de peso, por 5 días, i.p) sobre la cantidad y la actividad de la TrxR-1.



3. Hipótesis

La administración previa de selenito de sodio aumentará la actividad enzimática y la cantidad de tioredoxina reductasa, y disminuirá los efectos producidos por la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) sobre la oxidación de biomoléculas en el modelo con QUIN y contrarrestará los efectos tóxicos causados por esa neurotoxina.



4. Objetivo

Evaluar el efecto de la administración de selenito de sodio previa al daño ocasionado por QUIN evaluando las alteraciones histológicas en cortes cerebrales, la actividad enzimática y cantidad de tioredoxina reductasa, y el daño oxidativo que ocasiona la formación de ERO sobre el ADN y las membranas.



5. Procedimiento experimental

5.1 Reactivos

El selenito de sodio, la albúmina sérica bovina, el Tween 20, el Tritón X-100, la parafina, el H₂O₂ 3%, la hematoxilina, la eosina, el ácido 5,5'-ditio-bis(-nitrobenzoico) (DTNB), el hidrato de aurotioglucosa, el EDTA y el NADPH se obtuvieron de Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA).

El xilol y el etanol se obtuvieron de J. T. Baker. (México, México)

El Kit de inmunohistoquímica (Universal L SAB-System HRP), se obtuvo de DAKO (Carpinteria, CA, USA).

El anticuerpo monoclonal anti-TrxR (número cas SC-20147) y el policlonal anti-8-OHdG (número cas SA-237) se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology, Inc (Dallas, TX, USA) y Biomol International, Inc (Miami, FL, USA), respectivamente.

5.2 Animales

Se emplearon ratas macho de la cepa Wistar con un peso de 280 a 310 g, las cuales fueron proporcionadas por el bioterio de la Facultad de Medicina, UNAM. Los animales se colocaron en cajas de acrílico transparente (n=4), con libre acceso a alimento (Laboratory Rodent Diet 5001; PMI Feeds Inc., Richmond, IN, USA) y agua *ad libitum* durante todo el experimento. Los animales se mantuvieron en condiciones constantes de temperatura (25°C ± 3°C), humedad (50 ± 10%) e iluminación (ciclos de 12 h de luz y 12 h de oscuridad). Todos los procedimientos experimentales que se realizaron en los animales se llevaron a cabo de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud y se apegaron a los lineamientos del Comité de Ética del Instituto. Se realizaron todos los esfuerzos para minimizar el sufrimiento de los animales.



5.3 Diseño experimental

Los animales se dividieron al azar en 4 grupos ($n = 4$), como se menciona a continuación:

Control (Ct).

Selenito de sodio (Se).

Ácido quinolínico (Q).

Ácido quinolínico + selenito de sodio (Q + Se).

Se administró solución salina isotónica (SSI) (grupos Ct y Q) o selenito de sodio (grupos Se y Q+Se) 0.625 mg/kg/día, *i.p.*, durante 5 días previos a la lesión con QUIN. El quinto día se administró intraestriatalmente 1 μ L de SSI (grupos Ct y Se) o QUIN (grupos Q y Q+Se) equivalente a 240 nmol, disuelto en solución salina. Para la administración intraestriatal de QUIN y de SSI, se empleó un equipo estereotáxico y una microjeringa Hamilton. Los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (0.2 mL/250g, *i.p.*) y la administración se realizó en las siguientes coordenadas: +0.5 mm anterior al bregma, -2.6 mm lateral al bregma y +4.5 mm ventral a la dura (Paxinos y Watson, 2006). Para medir la actividad enzimática de la TrxR, se obtuvieron los cerebros a los 30 min, 2 h, 24 h y 7 días post-lesión con SSI o QUIN, los cuales se congelaron a -70°C hasta su uso. En otro grupo de animales, se evaluó el daño histológico y los niveles de 8-OHdG en los mismos tiempos, estos animales se perfundieron con SSI y heparina (500 ml SSI/2 ml de heparina 5000 U) fría vía transcardiaca y posteriormente se fijaron con p-formaldehído 10%, se extrajeron los cerebros y se dejaron reposar durante 7 días en p-formaldehído 4% para su posterior inclusión en parafina.



5.4 Técnicas

5.4.1 Histología

Se emplearon cortes coronales con un grosor de 5 μm (cortados en un micrótopo), los cuales fueron desparafinados e hidratados sumergiendo las muestras en los tiempos indicados de la siguiente manera:

Xilol I 100% 30 min.

Xilol II 100% 5 min.

Xilol-Etanol 100% (1:1) 5 min.

Etanol I 100% 3 min.

Etanol II 100% 3 min.

Etanol I 96% 3 min.

Etanol II 96% 3 min.

Luego se tiñeron con hematoxilina de Harris y eosina (H&E) y posteriormente se deshidrataron y se montaron con una resina.

La cuantificación se realizó en el estriado derecho tomando 4 campos al azar en cada cerebro. Los resultados se expresaron como el porcentaje de células dañadas por cada campo.

5.4.2 Inmunohistoquímica

Se emplearon cortes coronales de 5 μm de grosor, los cuales fueron hidratados y desparafinados. Se inhibió la actividad de la peroxidasa endógena con H_2O_2 1% durante 30 min y se realizó una permeabilización con Tritón 0.2%. Posteriormente se bloquearon los tejidos con una solución de albúmina sérica bovina 1% y se incubaron con el anticuerpo primario anti-TrxR (1:50) o anti-8-OHdG (1:300) durante 24 h a temperatura ambiente. Se empleó un kit universal (anticuerpo secundario y peroxidasa) durante 1 h de incubación, para revelarlos con diaminobencidina (DAB). La contratinción se realizó con hematoxilina de Harris. La cuantificación se realizó en el estriado derecho eligiendo al azar 4 zonas en cada



cerebro. Los resultados se expresaron como el porcentaje de células inmunorreactivas.

5.4.3 Actividad enzimática de la tiorredoxina reductasa

Se empleó el método modificado por Hill y colaboradores (1997), basándose en la reducción directa del DTNB en ausencia y presencia de aurotioglucosa –un inhibidor de la TrxR-.

Se preparó una mezcla de reacción en amortiguador de fosfatos 100 mM pH = 7.0, que contenía EDTA 10 mM, albúmina sérica bovina 0.02%, DTNB 12 mM y NADPH 1 mM. A 25 μ L del homogenizado estriatal se adicionaron 0.975 mL de la mezcla de reacción y se leyó la densidad óptica a 412 nm durante 1 min cada 15 seg. De la misma manera, se preparó otro tubo pero a éste se le adicionó hidrato de aurotioglucosa 0.02 mM. Se leyó la densidad óptica y se obtuvo la diferencia de densidades ópticas del tubo que no contenía aurotioglucosa con el tubo que si la contenía. La actividad se expresó como los μ moles de DTNB reducidos por minuto, empleando el coeficiente de extinción molar de $\epsilon = 13.6 \times 10^3 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$. La actividad se expresó como mU/mg de proteína.

5.4.4 Formación de especies reactivas de oxígeno

Las especies reactivas de oxígeno fueron detectadas por fluorescencia utilizando un espectrofotómetro Perkin-Elmer LS50 a 488nm como longitud de onda excitatoria y 532nm como longitud de onda de emisión, se emplearon 600 μ L de homogeneizado de tejido estriado el cual se incubó con 75 μ L de DCFH-DA (diacetato de diclorofluoroceína) por 30 min a 37°C en agitación. Después de la incubación las muestras se enfrían y centrifugan a 3000g por 15 min. La concentración se calculó interpolando mediante una curva de calibración. Los resultados están expresados como porcentaje de producción de ERO.



5.4.5 Peroxidación de lípidos

Para determinar la cantidad de lípidos peroxidados se homogeneizaron los tejidos estriados (1:20 m/v) en amortiguador de Krebs (pH 7.4), el cual tiene como composición 19mM de NaCl, 5mM de KCl, 2mM de CaCl₂, 1.2mM de Mg SO₄, 5mM de glucosa, 13mM de NaH₂PO₄ y 3mM de Na₂HPO₄. Se utilizaron 500μL de reactivo TBA (ácido 2-tiobarbitúrico) sobre 250μL de homogeneizado, se incubó a 94°C durante 20 minutos, se enfrió y se centrifugó a 3000g por 15 min. La densidad óptica del sobrenadante se estimó a 535nm en espectrofotómetro. La concentración de malonaldehído (MDA) se calculó con una curva de estándar.



6. Resultados

Se cuantificó mediante inmunohistoquímica el nivel de 8-OHdG (un marcador de daño oxidativo en el ADN) en tejido estriado. Las células positivas se distinguen por presentar coloración marrón, mientras que las células no teñidas se contrastan con hematoxilina (coloración azul) (Figura 5). La inmunorreactividad observada indica que a las 2 h post lesión, el grupo Q presenta el daño más significativo, en contraste con el grupo Q+Se dónde a ese mismo tiempo la cantidad de células inmunopositivas es menor (Gráfica 1).

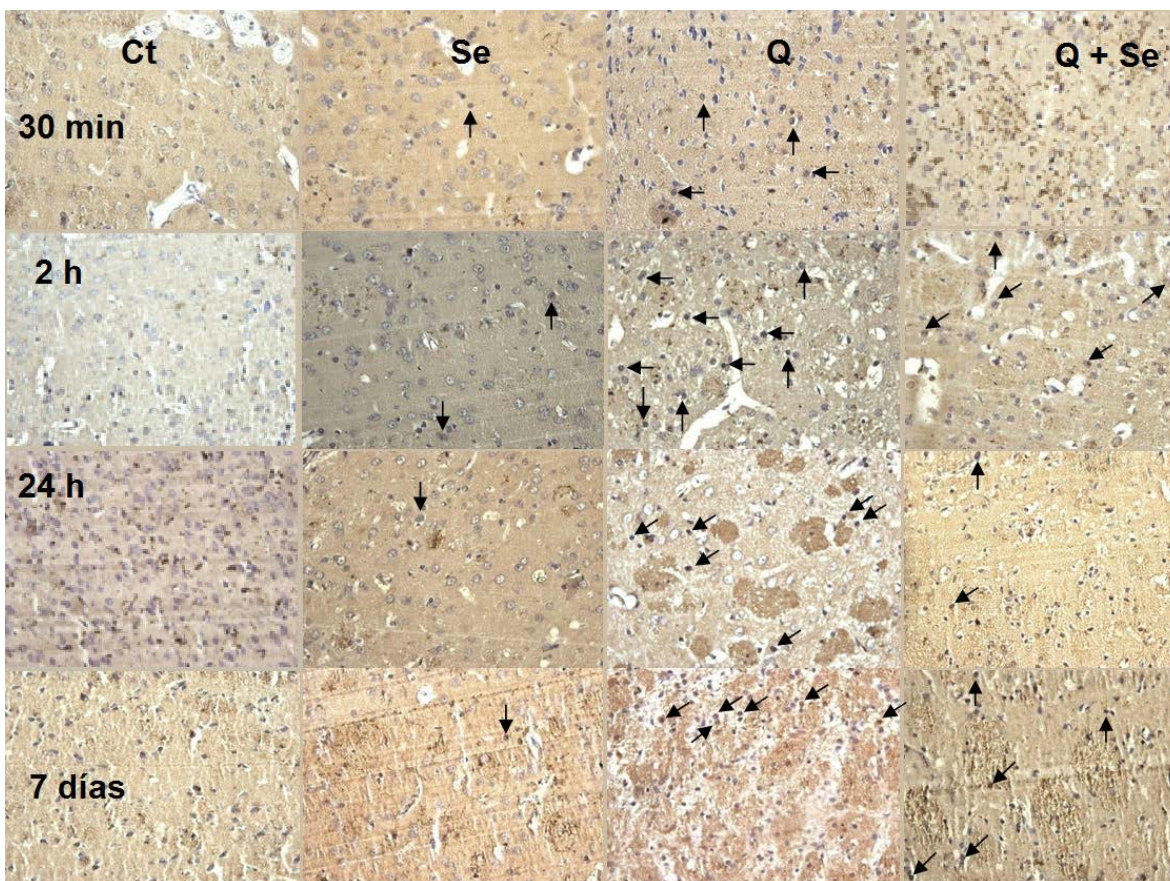
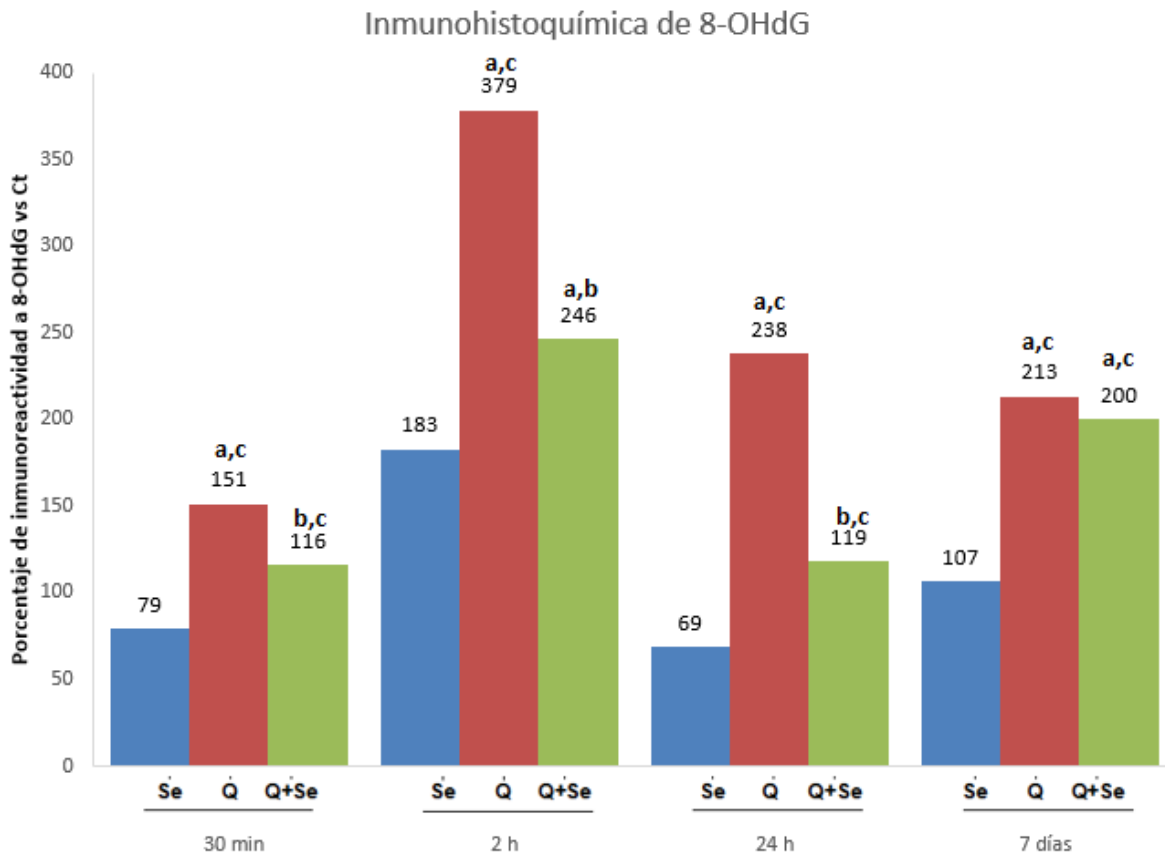


Figura 5. Efecto del selenito de sodio (Se: 0.625 mg/kg/día, *i.p.* durante 5 días) y/o ácido quinolínico (Q: 240 nmol/ μ L, infundido intraestriatalmente 120 min después de la última inyección de Se) sobre los niveles de 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG empleando inmunohistoquímica) en el estriado de rata. Los cortes (5 μ m de grosor) se contratiñeron con hematoxilina. Se muestran



imágenes representativas de cada grupo: control (Ct), Se, Q y Q+Se en cada tiempo estudiado (30 min, 2 h, 24 h y 7 días post lesión). Las células inmunorreactivas son mostradas con flechas, 40X.



Gráfica 1. Porcentaje de células inmunorreactivas a 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG) en cada grupo: control (Ct), Se, Q y Q+Se y en cada tiempo estudiado (30 min, 2 h, 24 h y 7 días post lesión) después de la inyección de Q o SSI. Los datos se muestran como el promedio \pm EE (n=4). ^aP < 0.05 vs. grupo Ct; ^bP < 0.05 vs. grupo Q y ^cP < 0.05 vs. grupo Se.

En contraste a la bien preservada apariencia que se observa en el tejido estriado del grupo Ct, la infusión de QUIN en ratas indujo un daño celular gradual desde los 30 min y hasta los 7 días cuando el daño fue mayor, evidenciado por una extensa pérdida celular a lo largo del estriado, abundantes núcleos picnóticos y destrucción del neuropilo (Figura 6).



El tratamiento con selenito de sodio sólo, no produjo cambios en la apariencia normal del estriado, la cual fue muy similar a la del grupo Ct (Figura 6).

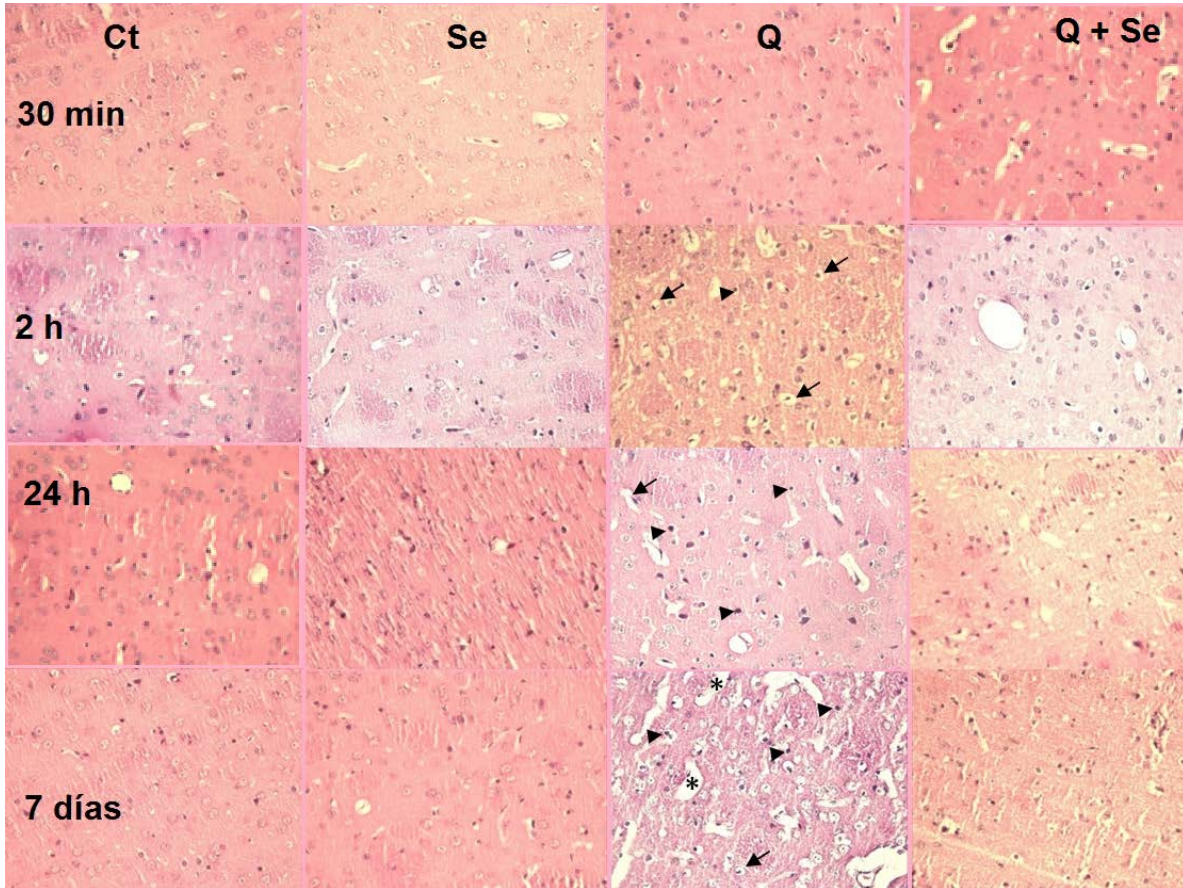
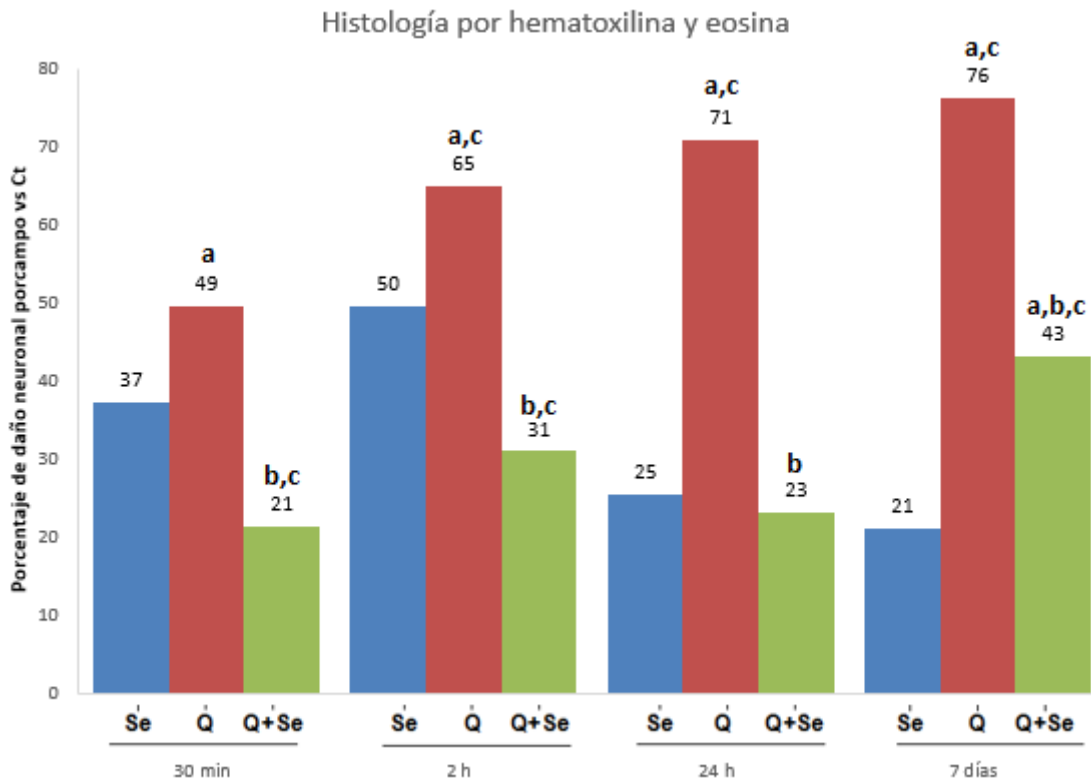


Figura 6. Efecto del selenito de sodio (Se: 0.625 mg/kg/día, *i.p.* durante 5 días) y/o ácido quinolínico (Q: 240 nmol/ μ L, intraestriatalmente infundido 120 min después de la última inyección de Se) sobre la morfología del estriado de rata. Los cortes (5 μ m de grosor) se tiñeron con hematoxilina y eosina. Se muestran imágenes representativas de cada grupo: control (Ct), Se, Q y Q+Se en cada tiempo estudiado (30 min, 2 h, 24 h y 7 días post lesión). Los núcleos picnóticos se señalan con un triángulo, el edema en el neuropilo con un asterisco y los núcleos lisados con flechas, 40 x.

Por otro lado, el tratamiento con selenio previno el daño histológico manteniendo la morfología celular hasta las 24 h y al séptimo día evitó considerablemente el deterioro que el QUIN ejerce (Gráfica 2).



Gráfica 2. Porcentaje de daño celular en cada grupo: control (Ct), Se, Q y Q+Se y en cada tiempo estudiado (30 min, 2 h, 24 h y 7 días post lesión) después de la inyección de Q o SSI. Los datos se muestran como el promedio \pm EE (n=4). ^aP < 0.05 vs. grupo Ct; ^bP < 0.05 vs. grupo Q y ^cP < 0.001 vs. grupo Se.

En el grupo Ct la reactividad basal contra la TrxR fue moderada, como lo muestran las pocas células inmunorreactivas (Figura 7). En la gráfica 3 este grupo se representa como la línea basal o cero. En contraste, los grupos Se, Q y Q+Se mostraron una intensa reactividad a los 30 min (46%, 62% y 60% con respecto al control, respectivamente) y a las 2 h (37%, 57% y 49% con respecto al control, respectivamente), pero este efecto se observó de forma moderada a las 24 h en los grupos Se y Q+Se (19% y 31% con respecto al control, respectivamente), regresando a niveles basales a los 7 días (Figura 7 y Gráfica 3).

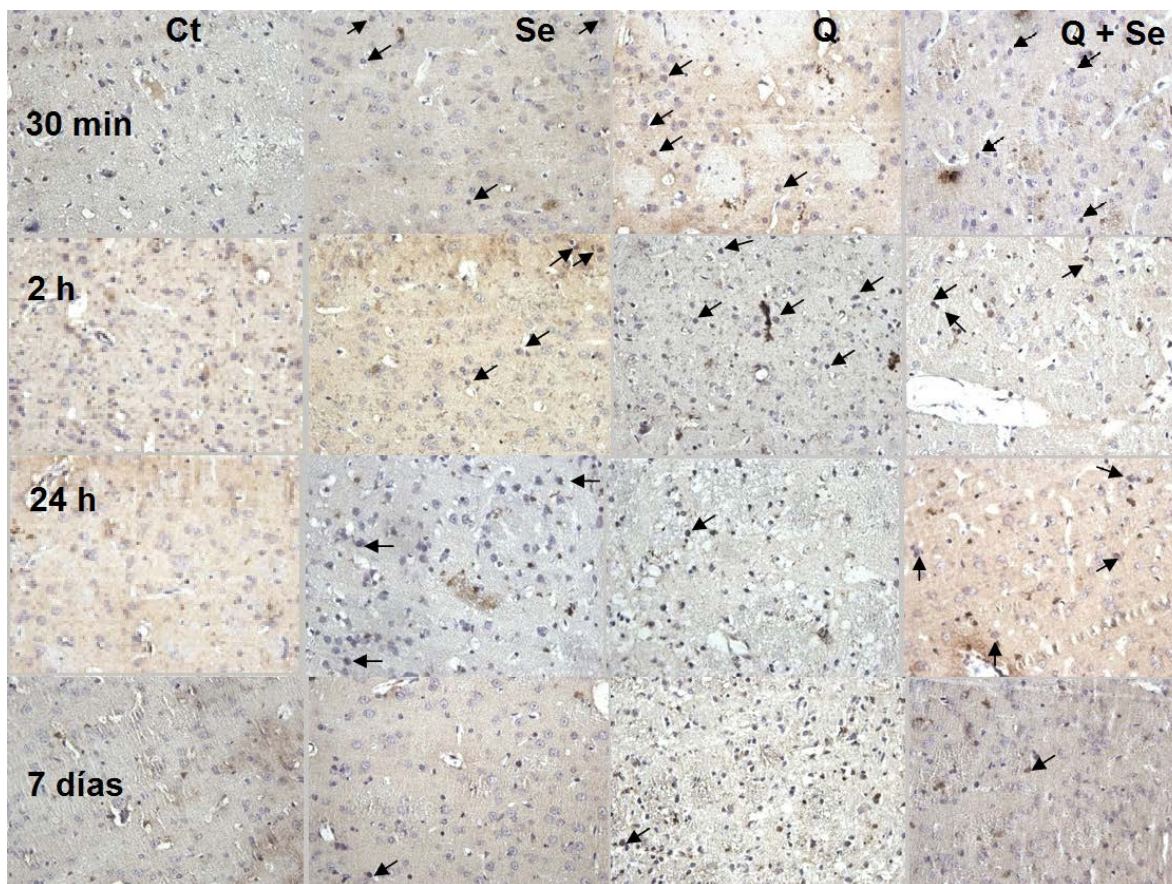
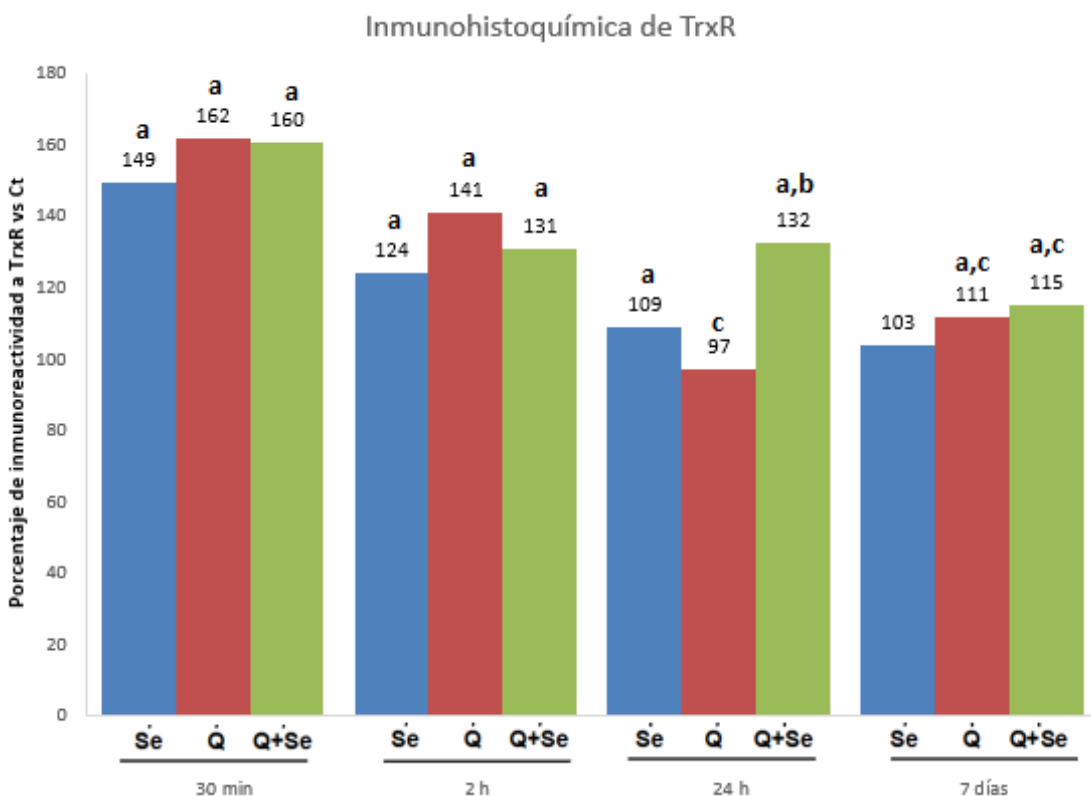


Figura 7. Efecto del selenito de sodio (Se: 0.625 mg/kg/día, *i.p.* durante 5 días) y/o ácido quinolínico (Q: 240 nmol/ μ L, infundido intraestriatalmente 120 min después de la última inyección de Se) sobre los niveles de tioredoxina reductasa (immunohistoquímica de TrxR) en el estriado de rata. Los cortes (5 μ m de grosor) se contratiñeron con hematoxilina. Se muestran imágenes representativas de cada grupo: control (Ct), Se, Q y Q+Se en cada tiempo estudiado (30 min, 2 h, 24 h y 7 días post lesión). Las células inmunorreactivas se muestran con flechas, 40X.

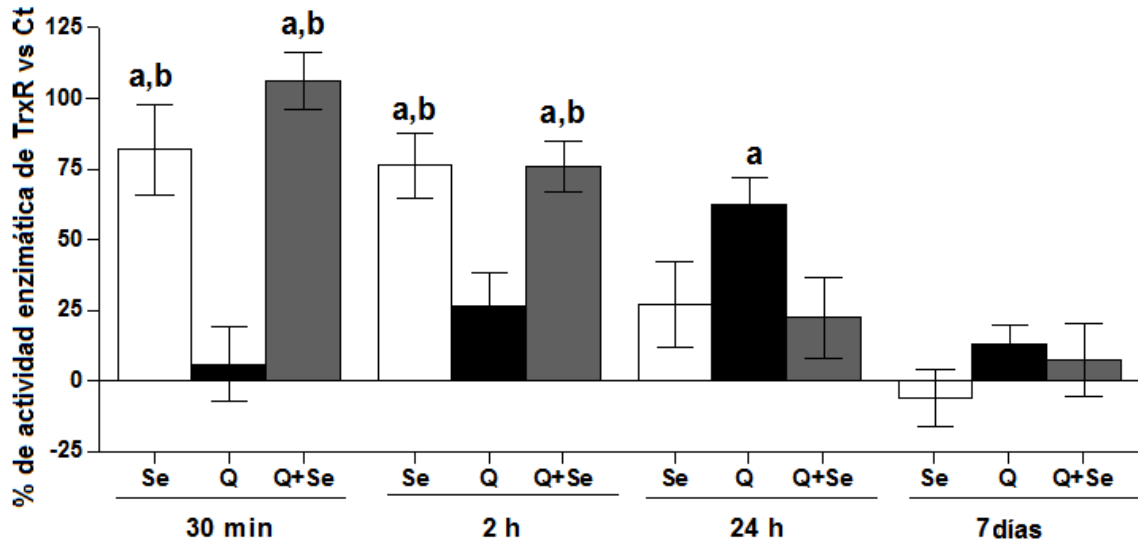


Gráfica 3. Porcentaje de células inmunorreactivas a tiorredoxina reductasa (TrxR) en cada grupo: control (Ct), Se, Q y Q+Se y en cada tiempo estudiado (30 min, 2 h, 24 h y 7 días post lesión) después de la inyección de Q o SSI. Los datos se muestran como el promedio \pm EE (n=4). ^aP < 0.05 vs. grupo Ct; ^bP < 0.05 vs. grupo Q y ^cP < 0.05 vs. grupo Se.

Los niveles basales de actividad enzimática de TrxR estriatal se encontraron alrededor de 4 a 6 mU/mg de proteína, con ligeras variaciones en los diferentes tiempos estudiados. La mayor actividad de TrxR fue inducida por el selenito de sodio sólo a los 30 min y a las 2 h (78% y 73% con respecto al control, respectivamente), regresando a niveles basales a las 24 h y a los 7 días. El



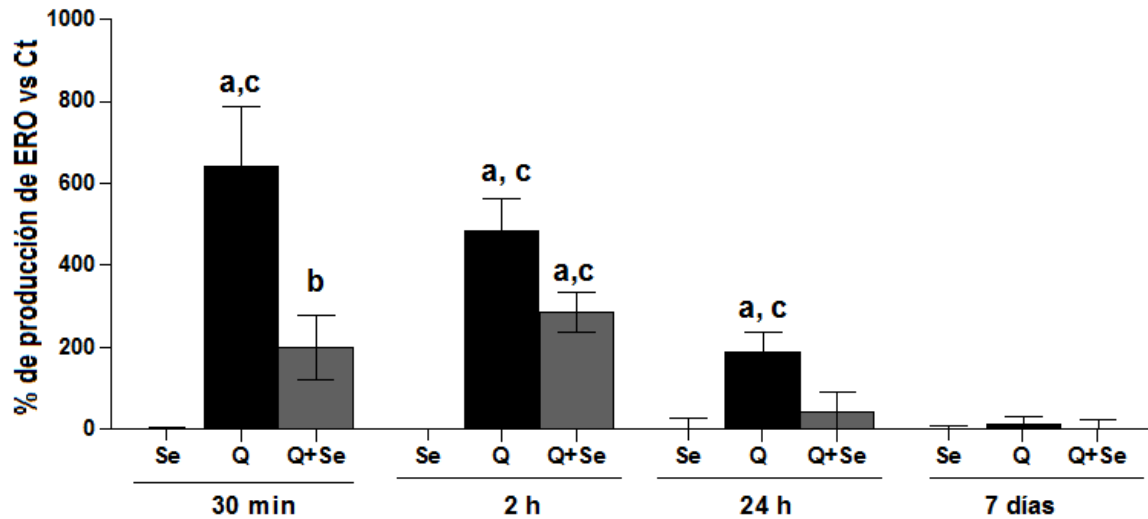
tratamiento con QUIN solamente estimuló la actividad a las 24 h (56% con respecto al control) (Gráfica 4). La administración de selenio evitó el incremento inducido por el QUIN a las 24 h (grupo Q+Se) y mostró un patrón similar al observado en el grupo con selenito de sodio sólo, donde el mayor incremento se observó a los 30 min (104% con respecto al control) (Gráfica 4).



Gráfica 4. Efecto del selenito de sodio (Se: 0.625 mg/kg/día, *i.p.* durante 5 días) y/o ácido quinolínico (Q: 240 nmol/ μ L, intraestriatalmente infundido 120 min después de la última inyección de Se) sobre la actividad de la tiorredoxina reductasa (TrxR) en el estriado de rata. La actividad enzimática se expresó como el porcentaje con respecto al control en cada grupo: Se, Q y Q+Se y en cada tiempo estudiado (30 min, 2 h, 24 h y 7 días post lesión) después de la inyección de Q o SSI. Los datos se muestran como el promedio \pm EE (n=4). ^aP < 0.01 vs. grupo Ct; ^bP < 0.05 vs. grupo Q y ^cP < 0.05 vs. grupo Se.

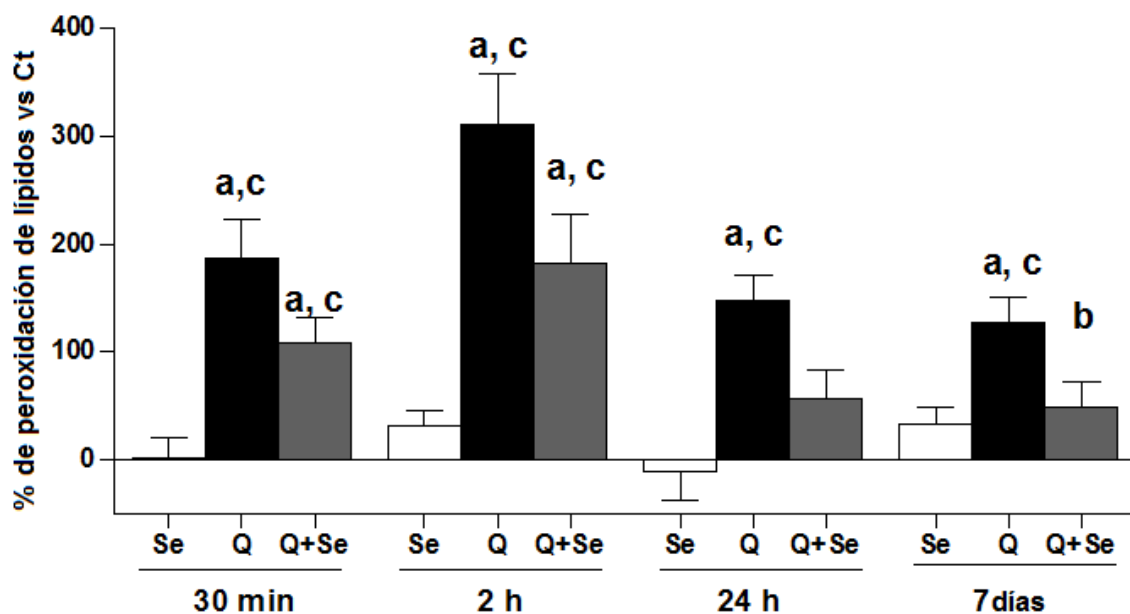


Como la actividad enzimática de TrxR es alta en el grupo Q a las 24 h, el efecto antioxidante se manifiesta de manera inversamente proporcional a la generación de ERO donde podemos ver que el grupo Q mantiene una elevada cantidad de radicales y en el grupo Se hay disminución de las especies (Gráfica 5).



Gráfica 5. Efecto del selenito de sodio (Se: 0.625 mg/kg/día, *i.p.* durante 5 días) y/o ácido quinolínico (Q: 240 nmol/ μ L, intraestriatalmente infundido 120 min después de la última inyección de Se) sobre la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) en el estriado de rata. La producción de ERO se expresó como el porcentaje con respecto al control en cada grupo: Se, Q y Q+Se y en cada tiempo estudiado (30 min, 2 h, 24 h y 7 días post lesión) después de la inyección de Q o SSI. Los datos se muestran como el promedio \pm EE (n=4). ^aP < 0.05 vs. grupo Ct; ^bP < 0.05 vs. grupo Q y ^cP < 0.05 vs. grupo Se.

Y de manera proporcional a la generación de ERO, el daño sobre los lípidos de las membranas es inminente observándose mayor nivel de lípidos oxidados en el grupo Q, mientras que el tratamiento con selenito de sodio disminuyó el efecto oxidante y contribuyó a la conservación de las membranas (Gráfica 6).



Gráfica 6. Efecto del selenito de sodio (Se: 0.625 mg/kg/día, *i.p.* durante 5 días) y/o ácido quinolínico (Q: 240 nmol/ μ L, intraestriatalmente infundido 120 min después de la última inyección de Se) sobre los niveles de lípidos oxidados (LPx) en el estriado de rata. Los niveles de LPx se expresaron como el porcentaje con respecto al control en cada grupo: Se, Q y Q+Se y en cada tiempo estudiado (30 min, 2 h, 24 h y 7 días post lesión) después de la inyección de Q o SSI. Los datos se muestran como el promedio \pm EE (n=4). ^aP < 0.01 vs. grupo Ct; ^bP < 0.05 vs. grupo Q y ^cP < 0.05 vs. grupo Se.



7. Discusión

Los resultados presentados en este trabajo indican que el QUIN ejerce daño celular a través de la inducción de un estado oxidante. Se observó un aumento en la formación de ERO por el QUIN, lo cual indujo daño sobre el material genético, ya que se observó un aumento en la inmunorreactividad de la 8-OHdG (Figura 5). Se sabe que los radicales libres reaccionan con la 2'-deoxiguanosina hasta formar productos de degradación como son la 8-oxo-7-hidroxi-2'-deoxiguanosina y la 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina, ambos aceptados desde 1997 por el comité Europeo de Estándares como marcadores de daño oxidante al ADN (Valavanidis et al., 2009). A diferencia del grupo Q, el grupo Se mostró una menor cantidad de células inmunorreactivas y al comparar el grupo Q contra el grupo Q+ Se se observó que desde los 30 min y hasta las 24 h, el selenio disminuyó el daño oxidante (Gráfica 1). No existían estudios previos del efecto del selenio *in vivo*, pero se sabía que en cultivos celulares de líneas de células Jurkat E6-1 la disminución de ERO estaba relacionada con la cantidad de selenito de sodio en el medio (Saito et al., 2003), ya que dosis superiores a 50 µg/100 g de peso, son tóxicas. También se ha reportado que el tratamiento con selenito de sodio previo a la administración de QUIN aumenta la actividad de enzimas como la superóxido dismutasa, la catalasa, la glutatión peroxidasa, la glutatión reductasa y la acetilcolinesterasa (Sreekala e Indira, 2009).

El análisis histológico de los tejidos estriados del cerebro se realizó mediante la tinción con hematoxilina y eosina, los resultados confirman que el QUIN no sólo ocasiona daño sobre el DNA, sino también altera la morfología del estriado (Figura 6). Desde las 2 h se observa la formación de núcleos picnóticos que progresan hasta la edematización a los 7 días, mientras que el tratamiento con selenio previene este daño. Correlacionando la histología (Gráfica 2) con la peroxidación de lípidos (Gráfica 6) se observa cómo el QUIN al inducir un estado oxidante daña las membranas celulares aumentando la generación de lípidos oxidados y en todo



momento el selenio disminuyó este daño. Estudios previos han demostrado que una deficiencia en selenio aumenta la peroxidación de lípidos, aunque el mecanismo se desconoce (Saito et al., 2003). Algunas de las selenoproteínas tienen acción antioxidante y también aminoácidos modificados como la selenometionina y la selenocisteína, no obstante se desconoce si se encuentran libres en el citosol (Battin et al., 2006), esto deja abierto un espacio dónde es posible pensar en la acción como antioxidante directo por parte de los selenoaminoácidos.

La administración previa de selenito de sodio no generó un aumento en la peroxidación de lípidos (Gráfica 6), tampoco indujo daño significativo en la histología (Gráfica 2) y además previene el daño ejercido por el QUIN, estas tres premisas hacen posible que este elemento traza tenga uso terapéutico.

Para mantener la homeostasis, el organismo cuenta con una serie de sistemas antioxidantes que garantizan la sobrevivencia celular ante diversas agresiones. Uno de los sistemas antioxidantes más importantes y menos estudiados es el sistema Trx-TrxR, que consta de una selenoproteína llamada TrxR y su principal blanco molecular, la Trx; ambas poseen en su centro activo una selenocisteína.

El tratamiento con selenio indujo un aumento en la cantidad y la actividad de la TrxR (Figura 7 y Gráfica 4, respectivamente). Sin embargo el QUIN solo incrementó la cantidad de proteína. Dicho aumento podría estar relacionado con una respuesta celular compensatoria al daño inducido por esta neurotoxina. El incremento observado en la cantidad de proteína de la TrxR desde los 30 min retornó a niveles basales a los 7 días.

Estos resultados sugieren que el selenio incrementa la cantidad y la actividad de TrxR (Gráfica 3), disminuye el daño oxidante al material genético (gráfica 1) y preserva la viabilidad celular (Gráfica 2). Sin embargo, los resultados de actividad enzimática indican que en el grupo con QUIN, la TrxR no es el único sistema



antioxidante involucrado, además sugieren que el estrés oxidante podría estar inactivando a la TrxR a los 30 min.

Integrando todos los resultados, la gráfica 1 muestra el daño oxidante al material genético ya que desde las 2 h hay un incremento en el grupo con QUIN. Por otro lado, a partir de los 30 min inicia un aumento en los cambios morfológicos (Gráfica 2) en la zona estriatal siendo a los 7 días donde se observa la mayor presencia de núcleos picnóticos y edematización en el grupo con QUIN. Además, se observa un aumento en la cantidad de proteína de la TrxR desde los 30 min, que disminuye paulatinamente a las 24 h y a los 7 días en los grupos Se y QUIN (Gráfica 3); sin embargo la actividad enzimática en cada grupo es diferente (Gráfica 4), ya que solamente los grupos tratados con selenio (Se y Q+Se), mostraron un aumento en la actividad enzimática mientras que el grupo con QUIN carece de ella. Como consecuencia de esto, es posible que el daño desde los 30 min, tanto en el DNA como en la morfología esté asociado a la acción directa de las ERO. Se sabe que TrxR mantiene reducidas - mediante la transferencia de electrones desde el NADPH al grupo FAD - a diversas moléculas y proteínas (Pérez-Jiménez et al., 2009) para garantizar múltiples funciones celulares. Dentro de las moléculas blanco destaca la Trx, un pequeño péptido de 12 KDa que actúa como donador de electrones, reduciendo una gran cantidad de proteínas y otras biomoléculas que por el evento oxidante han sufrido daño (Takagi et al., 2000). Cuando las células son expuestas a estrés oxidante la Trx se transloca al núcleo (Hirota et al., 1999), donde ejerce funciones reguladoras contribuyendo a la unión de los factores NF- κ B y AP-1 al DNA (Nordberg y Arnér, 2001), hecho que ayuda a generar los elementos de respuesta rápida al estrés y de esta manera neutralizar a las ERO. Es probable que la neuroprotección que está ejerciendo el Selenio no solamente se limite a la TrxR sino a todas las moléculas sobre las que está actuando dicha enzima y el Selenio *per se*. Esto se observa en la gráfica 4 donde se aprecia claramente como el QUIN incrementa la cantidad de proteína sin actividad. La maquinaria enzimática para la incorporación de selenio en las selenoproteínas es muy compleja y requiere la ayuda de muchos factores (debido a que Sec es



codificada por un codón de paro (UGA)) y se requiere de varios elementos de incorporación de selenocisteína, uno de ellos es el elemento SecIS (secuencia de inserción de selenocisteína), presente exclusivamente en el ARNm de las selenoproteínas y la proteína de unión llamada SBP2, y a diferencia de los aminoacil-ARNt, la selenocisteína requiere de un factor de elongación específico denominado EF-Sec, que no solamente reconoce el ARNt^{Sec} y el GTP, sino que además reconoce al elemento SecIS que se encarga de incorporar al ARNt^{Sec} al ribosoma (Schmidt y Simonovic, 2012). Si esta maquinaria tan compleja tiene que generar selenoproteínas en un ambiente altamente oxidante, o si está en presencia de compuestos altamente electrofílicos (como los generados tras el insulto excitotóxico por la inyección de QUIN) el resultado podría ser una enzima trunca o con deficiencia de dos aminoácidos en el extremo C-terminal –Gly-Cys-COOH, que rápidamente induce muerte celular tanto por la cinasa 1 señal reguladora de apoptosis como por vías desconocidas (Anestâl y Arnér, 2003). De igual manera se sabe que una deficiencia en la actividad de la TrxR aumenta el estrés oxidante, la disfunción mitocondrial por aumento de H₂O₂ y la muerte en células dopaminérgicas (Lopert et al., 2012).

En el grupo Q + Se a las 24 h, la cantidad de células reactivas a 8-OHdG disminuye (Gráfica 1) probablemente debido a que en este punto los sistemas reparadores del DNA han logrado llegar a un estado restaurador y a que en este grupo cuando hay poca reactividad a 8-OHdG, el daño morfológico es mínimo. En contraste, el grupo Q presenta grave daño en el neurópilo acompañado de edematización, núcleos picnóticos y alta reactividad frente a la 8-OHdG, sugiriendo que en el grupo Q el mecanismo de muerte está dado por necrosis ya que la TrxR permanece sin actividad hasta las 24 h probablemente como consecuencia del aumento en la producción de ERO que inactivan a la enzima. La actividad de la TrxR aumentó hasta las 24 h, lo cual no fue suficiente para prevenir el daño inducido por el QUIN, sugiriendo que es posible la participación de otros sistemas antioxidantes.



Finalmente la administración del QUIN indujo muerte neuronal desde las 2 h y se prolongó hasta los 7 días mostrando necrosis inicial. Mientras que la muerte celular que precedió en el grupo Q + Se se fue dando de manera paulatina, probablemente por un mecanismo de apoptosis.



8. Conclusiones

El tratamiento con selenito de sodio aumentó la cantidad de proteína de TrxR durante todo el curso temporal de daño por QUIN y sólo elevó su actividad enzimática a corto plazo (antes de las 2 horas), disminuyendo la producción de ERO y el daño oxidante que estas ocasionan sobre el ADN y los lípidos de membrana, evitando así las alteraciones morfológicas en el estriado.

Estos resultados son el posible antecedente del uso como una herramienta terapéutica del selenito de sodio en el tratamiento de algunas enfermedades neurodegenerativas cuya fisiopatología esté relacionada con el estrés oxidante.



9. Referencias

- Albin R, Greenamyre J. (1992). Alternative excitotoxic hypotheses. *Neurology*, 42, 733 - 738.
- Anestål K, Arnér E. (2003). Rapid induction of cell death by selenium-compromised thioredoxin reductase 1 but not by the fully active enzyme containing selenocysteine. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 15966 - 15972.
- Association A P. (1994). Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV-TR) (4a ed.). American Psychiatric Association, 2000.
- Attems J, Thal D R, Jellinger K A. (2012). The relationship between subcortical tau pathology and Alzheimer's disease. *Biochemical Society transactions*, 40, 711 – 715.
- Battin E, Perron N, Brumaghim J. (2006). The central role of metal coordination in Selenium antioxidant activity. *Inorganic Chemistry*, 45, 499 - 501.
- Bordelon Y, Chesselet M, Nelson D, Welsh F, Erecińska M. (1997). Energetic dysfunction in quinolinic acid-lesioned rat striatum. *Journal of Neurochemistry*, 69, 1629 – 1639.
- Bösl M R, Takaku K, Oshima M, Nishimura S, Taketo M M. (1997). Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse selenocysteine tRNA gene (Trsp). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 5531 – 5534.
- Braidy N, Grant R, Adams S, Guillemin G. (2010). Neuroprotective effects of naturally occurring polyphenols on quinolinic acid-induced excitotoxicity in human neurons. *The FEBS Journal*, 277, 368 - 386.
- Brenneisen P, Wenk J, Klotz L, Wlaschek M, Briviba K, Krieg T, Sies H, Scharffetter-kochanek H. (1998). Central role of ferrous/ferric iron in the ultraviolet B irradiation - mediates signaling pathway leading to increased interstitial collagenase matrix-degrading metalloprotease (MMP)-1 and stromelysin-1 (MMP-3) mRNA levels in cultured human dermal fibrob. *The Journal of Biochemical Chemistry*, 273, 5279 - 5287.
- Buchholz J, Behringer E, Pottorf W, Pearce W, Vanterpool C. (2007). Age-dependent changes in Ca²⁺ homeostasis in peripheral neurones: implications for changes in function. *Aging Cell*, 6, 285 - 296.



- Coyle J, Puttfarcken P. (1993). Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science*, 262, 689 - 695.
- Darvesh A S, Bishayee A. (2010). Selenium in the prevention and treatment of hepatocellular carcinoma. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 10, 338 - 345.
- de Bartolomeis A, Sarappa C, Buonaguro E, Marmo F, Eramo A, Tomasetti C, Lasevoli F. (2013). Different effects of the NMDA receptor antagonists ketamine, MK-801, and memantine on postsynaptic density transcripts and their topography: Role of Homer signaling, and implications for novel antipsychotic and pro-cognitive targets in psychosis. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 46, 1 - 12.
- Demeter I, Nagy K, Farkas T, Kis Z, Kocsis K, Knapp L, Gellert L, Fülöp F, Toldi, J. (2013). Paradox effects of kynurenines on LTP induction in the Wistar rat. An in vivo study. *Neuroscience Letters*, 553, 138 – 141.
- Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis S. (1999). The glutamate receptors ion channels. *Pharmacological Reviews*, 51, 7 - 61.
- Dong X, Wang Y, Qin Z. (2009). Molecular mechanism of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacologica Sinica*, 30, 379 - 387.
- Estrada-Sánchez A, Mejía-Toiver J, Massieu L. (2008). Excitotoxic neuronal death and the pathogenesis of Huntington's disease. *Archives of Medical Research*, 39, 265 - 276.
- Fairweather-Tait S J, Collings R, Hurst R. (2010). Selenium bioavailability: current knowledge and future research requirements. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 91, 1484 -1491
- Flores-Soto M, Chaparro-Huerta V, Escoto-Delgadillo M, Vazquez-Valls E, González-Castañeda R, Beas-Zarate C. (2012). Estructura y función de las subunidades del receptor a glutamato. *Neurología*, 27, 301 - 310.
- Galli F, Piroddi M, Anneti C, Aisa C, Floridi E, Floridi A. (2005). Oxidative stress and reactive oxygen species. *Contributions to Nephrology*, 149, 240 - 260.
- Glenner G, Wong C. (1984). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 120, 885 - 890.



- Grivennikova V, Vinogradov A. (2006). Generation of superoxide by the mitochondrial Complex I. *Biochimica et Biophysica Acta*, 5, 553 - 561.
- Henkler F, Stolpmann K, Luch A. (2012). Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: bulky DNA adducts and cellular responses. *EXS*, 101, 107 - 131.
- Hirota K, Murata M, Sachi Y, Nakamura H, Takeuchi J, Mori K, Yodoi J. (1999). Distinct roles of thioredoxin in the cytoplasm and in the nucleus. A two-step mechanism of redox regulation of transcription factor NF-kappaB. *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 27891 - 27897.
- Hill K E, McCollum G W, Burk R F. (1997). Determination of Thioredoxin Reductase activity in rat liver supernatant. *Analytical Biochemistry*. 253, 123 – 125.
- Hwang I, Yoo K, Kim D, Lee C, Choi J, Kwon Y, Kim Y, Won, M. (2010). Changes in the expression of mitochondrial peroxiredoxin and thioredoxin in neurons and glia and their protective effects in experimental cerebral eschismic damage. *Free Radical Biology & Medicine*, 48, 1242 - 1251.
- Johri A, Beal M F. (2012). Antioxidants in Huntington's disease. *Biochimica and Biophysica Acta*, 1822, 664 – 674.
- Kawasaki H, Morooka T, Shimohama S, Kimura J, Hirano T, Gotoh Y, Nishida E. (1997). Activation and involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in glutamate-induced apoptosis in rat cerebellar granule cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 18518 - 18521.
- Kossinova O, Malygin A, Krol A, Kaepova G. (2013). A novel insight into the mechanism of mammalian selenoprotein synthesis. *RNA*, 19, 1147 - 1158.
- Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M. (1998). The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annual Review of Physiology*, 60, 619 - 642.
- Kryukov G, Castellano S, Novoselov S, Lobanov A, Zehtab O, Guigó R, Gladyshev V. (2003). Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science*, 300, 1439 - 1443.
- Kumar A, Krishnaswamy K. (1997). Selenium Content of Common Indian Cereals, Pulses, and Spices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2565 - 2568.
- Lopert P, Day B, Patel M. (2012). Thioredoxin reductase deficiency potentiates oxidative stress, mitochondrial dysfunction and cell death in dopaminergic cells. *Plos One*, 7, 1 - 12.



- Lu J, Holmgren A. (2014). The thioredoxin antioxidant system. *Free Radical Biology and Medicine*, 66, 75 - 87.
- Luthman M, Holmgren A. (1982). Rat liver thioredoxin and thioredoxin reductase: purification and characterization. *Biochemistry*, 21, 6628 - 6633.
- Mailloux R, Harper M. (2012). Mitochondrial proticity and ROS signaling: lessons from the uncoupling proteins. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 23, 451 - 458.
- Maldonado P, 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 G, Fortoul T, Santamaría A. (2012). Selenium-induced antioxidant protection recruits modulation of thioredoxin reductase during excitotoxic/pro-oxidant events in the rat striatum. *Neurochemistry International*, 61, 195 - 206.
- Marnett L. (2000). Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, 21, 361 370.
- Martínez-Rojas D, Feria-Velasco A. (2009). *Procesos moleculares comunes, alterados en los padecimientos neurodegenerativos. Neurobiología de los trastornos neuropsiquiátricos mas prevalentes en México. Revista Mexicana de Neurociencia*, 10, 371.
- Mattson M. (2000). Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 1, 120 - 129.
- Mattson M, Culmsee C, Fang Y Z. (2000). Apoptotic and antiapoptotic mechanisms in stroke. *Cell and Tissue Research*, 301, 173 - 187.
- Mehdi Y, Hornick J L, Istasse L, Dufrasne I. (2013). Selenium in the environment, metabolism and involvement in body functions. *Molecules*, 18, 3292 - 3311.
- Mishra O, Fritz K. (2001). NMDA receptor and neonatal hypoxic brain injury. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews*, 7, 249 - 253.
- Moore E C, Reichard P, Thelander L. (1964). Enzymatic synthesis of deoxy ribonucleotides, purification and properties of thioredoxin reductase from *Escherichia Coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, 239, 3445 – 3452.
- Nicholls D G, Ward M W. (2000). Mitochondrial membrane potential and neuronal glutamate excitotoxicity: mortality and millivolts. *Trends in neurosciences*, 23, 166 – 174.



- Nordberg J, Arnér E. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology & Medicine*, 31, 1287 - 1312.
- Nuñez J, Alt J, McCarthy M. (2003). A new model for prenatal brain damage. GABAA receptor activation induces cell death in developing rat hippocampus. *Experimental Neurology*, 181, 258 - 269.
- Palmer R, Ferrige A, Moncada S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327, 524 - 526.
- Pasantes H, Sánchez J, Tapia, R. (1991). *Neurobiología celular*. México: Fondo de Cultura Económica. México.
- Paxinos G, Halliday G M, Watson C, Koutcherov Y, Hongguin W. (2006). Atlas of the Developing Mouse Brain At E 17.5, P0 and P6. Academix Press.
- Perez-Jimenez R, Li J, Kosuri P, Sanchez-Romero I, Wiita A, Rodriguez-Larrea D, Chueca A, Holmgren A, Miranda-Vizueté A, Becker K, Cho SH, Beckwith J, Gelhaye E, Jacquot J P, Gaucher E A, Sánchez-Ruiz J M, Berne B J Fernandez J. (2009). Diversity of chemical mechanisms in thioredoxin catalysis revealed by single-molecule force spectroscopy. *Nature Structural & Molecular Biology*, 16, 890 - 896.
- Perkins M, Stone T. (1982). An iontophoretic investigation of the actions of convulsant kynurenes and their interaction with the endogenous excitant quinolinic acid. *Brain Research*, 247, 184 - 187.
- Raiteri L, Raiteri M, Bonanno G. (2002). Coexistence and function of different neurotransmitter transporters in the plasma membrane of CNS neurons. *Progress in Neurobiology*, 68, 287 - 309.
- Rosa A, Rapoport S. (2009). Intracellular- and extracellular-derived Ca(2+) influence phospholipase A(2)-mediated fatty acid release from brain phospholipids. *Biochimica et Biophysica Acta*, 8, 697 - 705.
- Rosas H D, Koroshetz W K, Chen Y I, Skeuse C, Vangel, M, Cudkowicz M E, Caplan K, Marek K, L J Seidman, Makris N, Jenkins B G, Goldstein J M. (2003). Evidence for more widespread cerebral pathology in early HD. *American Academy of Neurology*, 60, 1615 - 1620.
- Rosen H, Orman J, Rakita R M, Michel B R, VanDevanter D R. (1990). Loss of DNA-membrane interactions and cessation of DNA synthesis in



myeloperoxidase-treated Escherichia coli. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 24, 10048 – 10052.

Rowley N, Madsen K, Schousboe A, Steve H. (2012). Glutamate and GABA synthesis, release, transport and metabolism as targets for seizure control. *Neurochemistry International*, 61, 546 - 558.

Saito Y, Yoshida Y, Akazawa T, Takahashi K, Niki E. (2003). Cell death caused by selenium deficiency and protective effect of antioxidants. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 39428 - 39434.

Saito K, Markey S, Heyes M. (1992). Effects of immune activation on quinolinic acid and neuroactive kynurenines in the mouse. *Neuroscience*, 51, 25 - 39.

Santamaría A, Vázquez-Román B, La Cruz V P, González-Cortés C, Trejo-Solís M C, Galván-Arzate S, Jara-Prado A, Guevara-Fonseca K, Ali S F. (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, 258 – 266.

Santamaría A, Salvatierra-Sánchez R, Vázquez-Román B, Santiago-López D, Villeda-Hernández J, Galván-Arzate S, Jiménez-Capdeville M E, Ali S F. (2003). Protective effects of the antioxidant selenium on quinolinic acid-induced neurotoxicity in rats: in vitro and in vivo studies. *Journal of Neurochemistry*. 86, 479 – 488.

Schmidt R, Simonovic M. (2012). Synthesis and decoding of selenocysteine and human health. *Croatian Medicine Journal*, 53, 535 - 550.

Sharpe M A, Robb S J, Clarck J B. (2003). Nitric oxide and Fenton/Haber-Weiss chemistry: nitric oxide is a potent antioxidant at physiological concentrations. *Journal of neurochemistry*, 87, 386 - 394.

Sheldon A L, Robinson M B. (2007). The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention. *Neurochemistry International*, 51, 333 – 355.

Sies H, Cadenas E. (1985). Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series b Biological Sciences*, 311, 617 - 631.

Simic M, Bergtold D, Karam L. (1989). Generation of oxy radicals in biosystems. *Mutation Research*, 214, 3 - 12.



- Sreekala S, Indira, M. (2009). Impact of co administration of selenium and quinolinic acid in the rat's brain. *Brain Research*, 1281, 101 - 107.
- Stone T, Darlington L. (2002). Endogenous kynurenines as targets for drug discovery and development. *Nature Reviews Drug Discovery*, 1, 609 - 620.
- Stone T, Forrest C, Mackay G M, Stoy N, Darlington L. (2007). Tryptophan, adenosine, neurodegeneration and neuroprotection. *Metabolic Brain Disease*, 22, 337 - 352.
- Sugaya K, Chou S, Xu S, McKinney M. (1998). Indicators of glial activation and brain oxidative stress after intraventricular infusion of endotoxin. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 58, 1 - 9.
- Sun Q, Zappacosta F, Factor V, Wirth P, Hatfield D. (2001). Heterogeneity within Animal Thioredoxin Reductases. Evidence for alternative first exon splicing. *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 3106 - 3114.
- Surapaneni K M, Jainu M. (2014). Comparative effect of pioglitazone, quercetin and hydroxy citric acid on the antioxidants in experimental non-alcoholic steatohepatitis. *Journal of Physiology and Pharmacology: an Official Journal of the Polish Physiological Society*, 65, 67 – 74.
- Takagi Y, Hattori I, Nozaki K, Mitsui A, Ishikawa M, Hashimoto N, Yodoi J. (2000). Excitotoxic hippocampal injury is attenuated in thioredoxin transgenic mice. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 20, 829 - 833.
- Thannickal V, Fanburg B. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *American journal of physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 279, 1005 - 1028.
- The Huntington's Disease Collaborative Research Group. (1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell*, 72, 971 - 983.
- Turner D, Stadtman T. (1973). Purification of protein components of the clostridial glycine reductase system and characterization of protein A as a selenoprotein. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 154, 366 - 381.
- Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. (2009). 8-hydroxy-2' -deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *Journal of Environmental Science and Health Part C*, 27, 120 - 139.



Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M T, Mazur M, Telser J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 44 – 84.

Vandenbergh W, Bredt D S. (2004). Early events in glutamate receptor trafficking. *Current opinion in cell biology*, 16, 134 – 139.

Williams C, Arscott L, Muller S. (2000). Thioredoxin reductase two modes of catalysis have evolved. *European Journal of Biochemistry*, 267, 6110 - 6117.

Zhong L, Arnér E, Ljung J, Aslund F, Holmgren A. (1998). Rat and Calf Thioredoxin Reductase are homologous to Glutathione Reductase with a Carboxil-terminal elongation containing a conserved catalytically active penultimate Selenocysteine residue. *The Journal of Biological Chemistry*, 273, 8581 - 8591