

# Indicadores de estrés oxidativo en cerebros de ratas viejas con déficit cognitivo

✉ María E González, Ivette Fernández, José Y Bauza

Centro Internacional de Restauración Neurológica, CIREN  
Ave. 25 No. 15805, esq. 158, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba  
E-mail: rmunoz@infomed.sld.cu

## RESUMEN

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) inducen la síntesis de mediadores solubles por las células mononucleares inmunocompetentes en el cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer. Se determinaron los niveles de indicadores del metabolismo oxidativo y las citocinas proinflamatorias en el tejido cerebral de ratas viejas con déficit cognitivo, con el objetivo de evaluar la interacción probable de estas variables y su implicación en la neuropatología de la enfermedad. Se hicieron estudios conductuales en los animales para demostrar el deterioro cognitivo. La cuantificación de los indicadores bioquímicos e inmunológicos se realizaron por métodos espectrofotométricos e inmunoenzimáticos. Se observaron cambios en los indicadores del metabolismo oxidativo asociados con la edad. El estrés oxidativo mostró un patrón de cambios en la actividad de las enzimas antioxidantes en el cerebro. La superóxido dismutasa se sobreactivó en todas las regiones estudiadas, y la catalasa solo en aquellas donde el proceso neurodegenerativo es más prominente, como el hipocampo y el estriado. Existen cambios en las concentraciones de malondialdehído, fosfolipasa A2 y en el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  asociados con la edad, que confirman que las ERO son mensajeros celulares y no simples agentes deletéreos. Este estudio evidencia un vínculo estrecho entre el metabolismo oxidativo y los procesos cognitivos asociados con la edad.

**Palabras clave:** Especies reactivas de oxígeno, envejecimiento, tejido cerebral, trastornos cognitivos

*Biotecnología Aplicada 2007;24:145-150*

INVESTIGACIÓN

## ABSTRACT

**Oxidative stress indicators in brains of cognitive-deficient elderly rats.** The role of reactive oxygen species (ROS) in the pathogenesis of Alzheimer's disease derives from a prolonged pro-oxidant state that induces the synthesis by immunocompetent mononuclear cells of soluble mediators in the brain of patients. The present paper focuses on determining the levels of oxidative metabolism indicators and pro-inflammatory cytokines in brain tissues of cognitive-deficient elderly rats, to evaluate the probable interaction among these variables and their implication in the neuropathology of this disease. Behavioral studies were carried out in animals to demonstrate cognitive deterioration, the biochemical and immunological indicators quantified by spectrophotometric and immunoenzymatic methods. Changes were observed in aging-associated oxidative metabolism indicators. The oxidative stress showed a changing pattern of antioxidant enzymes in the brain, where the superoxide dismutase was over-activated in all the regions studied and catalase were only over-activated in those regions where the neurodegenerative process was prominent (hipocampus and striata). The concentrations of malondialdehyde, phospholipase A2 and Tumor necrosis factor  $\alpha$  changed with aging, confirming ROS as cellular messengers and not only as deleterious agents. This study evidences a strong relationship between oxidative metabolism and aging-associated cognitive processes.

**Keywords:** Oxygen reactive species, aging, brain tissue, cognitive impairment

## Introducción

El aumento de la expectativa de vida ha originado un envejecimiento de la población y por consiguiente un incremento relativo de las enfermedades asociadas a este; entre ellas, las enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (EA).

En las demencias, los síntomas son heterogéneos por lo que a diferencia de la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas asociadas con la edad, no constituye un síndrome unitario, sino que resulta heterogéneo e incluye subgrupos homogéneos de etiopatogenia aún bajo hipótesis y, al parecer, multifactorial y poligénica [1-3] y a consecuencia de lo cual no se dispone de terapia eficaz [4].

La EA se caracteriza por la pérdida neuronal en varias áreas corticales, sobre todo del lóbulo temporal y la corteza entorrinal, así como en el complejo colinérgico del cerebro basal anterior. Se sugiere que

este aislamiento anatómico del hipocampo es el causante de los déficits cognitivos (demencia) asociados a esta enfermedad [5, 6]. Desde el punto de vista clínico, se perciben síntomas neuropsiquiátricos, como demencia, confusión, irritabilidad, deterioro del lenguaje y de la memoria espacial.

El cerebro es una estructura altamente oxigenada. Existen múltiples factores que hacen a este tejido particularmente vulnerable al daño oxidativo con relación a otros tejidos del organismo, por una parte, tiene muy baja actividad de las enzimas antioxidantes, y por otro lado contiene elevadas concentraciones de hierro y otros substratos fácilmente oxidables, como ácidos grasos polinsaturados y catecolaminas [7].

La reactividad del oxígeno y de las especies derivadas de este, debido a su naturaleza electrófila, son la base de una fracción importante de los eventos tóxicos

1. Hardy J. The genetics of Alzheimer's disease. In: Iqbal K, Winblad B, editors. Alzheimer's disease and related disorders: Research advances. Bucharest: Ana Aslan International Academy of Aging (2003): 29-47.

2. Mangone CA. Heterogeneidad clínica de la enfermedad de Alzheimer. Diferentes perfiles clínicos pueden predecir el intervalo de progresión. *Revista de Neurología* (2004); 38:675-81.

3. Kukull WA. Perspectives on Shared Genetic Contributions for Parkinson Disease and Alzheimer Disease. *Archives of Neurology* (2004); 61:1007-8. Ref ID: 5427.

4. Anand R. Barriers to Alzheimer disease drug discovery and drug development in the pharmaceutical industry. *Alzheimer Disease and Associated Disorders* (2002); 16(1):33-9.

que ocurren en los sistemas aeróbicos. No obstante, múltiples evidencias experimentales sugieren que las especies reactivas del oxígeno (ERO) no actúan solamente como agentes nocivos, sino que forman parte de los mecanismos fisiológicos de señalización intracelular. Por lo tanto, el mantenimiento del equilibrio entre la generación y el consumo de oxidantes es imprescindible para el mantenimiento de la viabilidad celular [8].

Además, desde hace muchos años se ha argumentado la participación del sistema inmune en la patogénesis de la EA, basado en estudios que evidencian un proceso inflamatorio crónico activo en el cerebro de estos enfermos [9]. El proceso de activación del sistema inmune induce la síntesis de mediadores solubles por células mononucleares inmunocompetentes, fenómeno este que ocurre durante el desarrollo de una respuesta autoinmune [10, 11].

Es importante señalar que las ERO intervienen en mecanismos fisiológicos de señalización intracelular; entre ellos, los factores de transcripción: factor nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) y el activador de proteína-1 (AP-1) [12-15]. Estos factores modifican su expresión y alteran su capacidad de unión a elementos genómicos que ellas controlan en dependencia de la concentración de estas especies reactivas, así como proteínas quinasas y fosfatasa que también están sujetas a la modulación oxidativa y que por esta vía pudieran estar involucradas en la muerte neuronal.

En este estudio se determinaron los niveles de indicadores del metabolismo oxidativo y de citocinas proinflamatorias en el tejido cerebral de animales envejecidos (ratas viejas con déficit cognitivo), con el objetivo de evaluar la interacción probable de estas variables y su implicación en la neuropatología de las enfermedades asociadas al envejecimiento.

## Materiales y métodos

En el estudio se utilizaron 35 ratas Sprague-Dawley machos procedentes del Centro Nacional para la producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, La Habana, Cuba) de dos grupos etáreos: jóvenes ( $n = 15$ ; 2 meses de edad) con un peso corporal de  $272 \pm 36$  g (media  $\pm$  desviación estándar, DE), y viejas con déficit cognitivo ( $n = 20$ ; 22 meses de edad) con un peso corporal de  $520 \pm 46$  g (media  $\pm$  DE).

### Requerimientos generales de hábitat

Se mantuvo el cambio de encamado dos veces por semana a cuatro ratas por caja. La temperatura fue de 22-24 °C, la humedad relativa del  $60 \pm 5\%$ . El ciclo de luz-oscuridad 12 x 12 y el acceso *ad libitum* al agua y a la comida.

### Criterios

De inclusión: ratas viejas con déficit cognitivo (véase sección de estudios conductuales).

De exclusión: Presencia de afecciones tumorales; trastornos en la marcha; mutilaciones corporales; peso corporal inferior a 520 g (animales viejos) o 190 g (animales jóvenes); cambios en la coloración del pelaje. Criterio clínico de "no apto" por inspección veterinaria de acuerdo a los controles periódicos de rutina sanitaria, según Clark y cols. [16] y según las especificidades

para animales envejecidos referidas por Hubel y Brenner [17] y el Consejo Canadiense para el Cuidado Animal (CCAC) [18, 19].

## Estudios conductuales

### I. Prueba de evitación inhibitoria

Se empleó una caja de evitación de dos compartimientos (Electromedicina, CIREN) de plástico y acero. Las paredes y el techo eran oscuras en un compartimiento y transparentes en el otro, frente al que se colocó una fuente de iluminación (100 W). Ambos compartimientos se comunicaban mediante una puerta de paso.

#### Procedimiento

Según lo descrito por Graham y Buccafusco [20], el experimento incluyó un período de familiarización y otro de prueba con dos fases: aprendizaje y retención, consecutivas, y con un intervalo de 24 horas.

- Familiarización: se colocó la rata en el compartimiento iluminado con la cara opuesta al compartimiento oscuro (posición inicial) y se le permitió el libre movimiento por toda la caja. Después de seis minutos, se puso la rata en la caja de procedencia.

- Aprendizaje (fase 1): 24 horas después se repitió el proceder anterior, se registró la latencia 1 (L1, tiempo que demora en pasar al compartimiento oscuro) y el número de cruces entre uno y otro compartimiento (C1). A los 6 minutos, se cerró la puerta de paso y la rata quedó en el lado oscuro, se le aplicó un shock eléctrico de 75 a 80 Hz, 1.5 mA durante dos segundos. Inmediatamente, se puso la rata en la caja de procedencia.

- Retención (fase 2): transcurridas 24 horas, se repitieron los procedimientos de colocación y registro de latencia y cruces, ahora denominados L2 y C2, durante seis minutos sin aplicar shock eléctrico.

### II. Aprendizaje y memoria espacial en el laberinto acuático de Morris (LAM)

#### Aparato

Piscina circular de acero inoxidable, fondo y paredes blancos, con plataforma de escape transparente y circular sumergida a 1 cm por debajo del nivel del agua (invisible para la rata que nada sobre la superficie).

#### Condiciones de experimentación

No hubo ruidos ni otras señales que provocaran inatención o desorientación del sujeto experimental ni señales extralaberínticas. El experimentador se situó lejos y, de aproximarse, lo hizo en continuo movimiento para evitar convertirse en un falso punto de referencia. Se evitó la hipotermia después del ensayo.

#### Procedimiento

Según Morris *et al.* [21], y Terry [22]. Días de prueba: 5, con 37 ensayos, distribuidos 8 por día y 5 el último día. El animal se liberó en el agua desde uno de los 8 puntos cardinales seleccionado al azar, de frente a la pared y permitiéndosele nadar durante 60 segundos. Si en ese tiempo no fue capaz de localizar la plataforma sumergida, se le colocó sobre ella durante 30 segundos, y después se inició el ensayo siguiente. Se registró:

- Recorrido de la rata.

5. Price DL. Aging of the brain and dementia of the Alzheimer type. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (Eds.). *Principles of Neural Science*, McGraw Hill, New York, (2000); 1149-61.

6. Kramer BC. Toxicity of glutathione depletion in mesencephalic culture: A role for arachidonic acid and its lipoxygenase metabolites. *Eur J Neurosci* (2004); 280-6.

7. Onyango IG, Shaharyar MK. Oxidative Stress, mitochondrial dysfunction, and Stress signalling in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer's Research* (2006); 3:2-11.

8. Chen J, Small-Howard A, Yin A, Berry MJ. The responses of Ht 22 cells to oxidative stress induced by buthionine sulfoximine (BSO). *BMC Neurosci* (2005); 6:10-21.

9. Sagara Y, Ishige K, Tsai C, Maher P. Tyrphostin protect neuronal cells from Oxidative Stress. *J Biol Chem* (2002); 39: 36204-15.

10. Allesio MD, Cerella C, Amici C *et al.* Glutathione depletion up-regulates Bcl-2 in BSO resistant cells. *FASEB J* (2004); 1-15.

11. Chan PH. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the Alzheimer's disease. *J Metab* (2001); 21:2-14.

12. Cali C, Proserpi C, Vannucchi MG, Pepeu G, Casamenti F. Brain inflammatory reaction in an animal model of neuronal degeneration and its modulation by an anti-inflammatory drug: implication in Alzheimer's disease. *Eur J Neurosci* (2005); 19:100-12.

13. Caccamo D campisi A, Curro *et al.* Antioxidant treatment inhibited glutamated evoked NFKB activation in primary astroglial cell cultures. *Neurotoxicology* (2005); 26:915-21.

14. Choi DW. Excitotoxic cell death. *J Neurobiol* (2001); 23:1261-76.

15. Mattson MP, Culmsee C, Yu Z, Camandola S. Roles of nuclear factor  $\kappa$ B in neuronal survival and plasticity. *J Neurochem* (2000); 74:443-56.

16. Clark JD, Gebhart GF, Gonder JC, Keeling ME, Kohn DF. The 1998 Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Rodents. *ILAR Journal* (1998); 38(1):1-35.

17. Hubel D, Brenner S. Animal experimentation and neuroscience research. *Neuroscience Research* (1990); 67-73.

18. Canadian Council on Animal Care (CCAC). Guidelines for the use of animals in Neuroscience research. In: Olfert ED, Cross BM, McWilliam DVM, McWilliam AA, editors. Ottawa: Bradda Printing Services Inc., 1997; 163-5.

19. Canadian Council on Animal Care (CCAC). Guidelines for the use of animals in Psychology. In: Olfert ED, Cross BM, McWilliam DVM, McWilliam AA (Eds.) Ottawa: Bradda Printing Services Inc., (1997); 155-162.

20. Graham JH, Buccafusco JJ. Inhibitory avoidance behavior and memory assessment. In: Buccafusco JJ (Ed.). *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. New York: CRC Press (2001):141-51.

21. Morris RGM, Garrud P, Rawlins JNP, O'Keefe J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* (1982); 297:681-3.

- Latencia de escape por ensayo (LE): tiempo que demoró el animal en encontrar la plataforma sumergida. El valor máximo fue 60 segundos.

- Número de cruces análogos en el ensayo 37. En ese ensayo se retiró la plataforma y se registró la cantidad de veces que la rata pasó por el sitio donde estaba la plataforma.

Criterio para el deterioro cognitivo

Según el criterio de Gage y cols. [23] se definió como animal con deterioro cognitivo aquel cuya latencia promedio durante los 36 ensayos en el laberinto acuático de Morris fuera mayor que 2DE de la del grupo joven de referencia.

**Obtención de muestras biológicas**

Después de la sedación profunda y la decapitación, se extrajeron los cerebros de las ratas, se lavaron con NaCl 0.9% frío, luego se disecaron las áreas cerebrales de interés: *septum*, hipocampo, estriado y corteza frontal. Los tejidos se congelaron en nitrógeno líquido, se pesaron y conservaron a -70 °C hasta su análisis.

**Estudios inmunológicos**

Para la determinación cuantitativa de los niveles del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (FNT- $\alpha$ ) se evaluaron las muestras con un método inmunoenzimático de doble sitio "ELISA" (Kit Biosource Int., Bender Medsystem, NIBSC).

**Análisis bioquímicos**

El GSH total se determinó por el ensayo de reciclaje enzimático de Tietze, descrito por Azbill *et al.* (1997) [24]. La actividad de la cloranfenicol acetil transferasa (CAT) se determinó por el método de Aebi (1984) [25]. La actividad enzimática de la Superóxido Dismutasa (SOD) se determinó por el método de Marklund (1992) [26]. La cuantificación de las concentraciones de lipoperóxidos (malondialdehído, MDA) fue por el método de Ohkawa (1996) [27]. La actividad enzimática de la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) se determinó por el método de Hotter y Radvani (1987) [28].

El ensayo del contenido de glutatión (GSH) y MDA, así como las determinaciones de actividad enzimática fueron mediante un método continuo con un espectrofotómetro (Shimadzu, Kyoto, Japón) que informa automáticamente el valor de la pendiente de la recta entre la densidad óptica y el tiempo.

**Consideraciones bioéticas**

Se implementaron las regulaciones internacionales para las especies en investigaciones de enfermedades crónicas [17, 29, 30], así como lo normado para el empleo de modelos animales en neurociencias y estudios psicológicos [18, 19].

**Procesamiento estadístico**

Para el análisis estadístico se utilizó el programa Statistica (versión 4.5), Windows 98. Primero se verificó la distribución normal y la homogeneidad de varianza de los datos, mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la de Levene, respectivamente. Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de cla-

sificación simple, para determinar las diferencias significativas entre los grupos.

Para la evaluación de estas diferencias con respecto a los indicadores de estrés oxidativo e inmunológicos, se aplicó la prueba de rangos múltiples de Duncan. Se compararon los estudios conductuales en roedores mediante la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney, tanto para el LAM como para la prueba de evitación inhibitoria.

El nivel de significación para las variables evaluadas fue  $p \leq 0.05$ .

**Resultados**

En las tablas 1 y 2 se muestran los resultados de los estudios conductuales en el LAM ( $p = 0.036$ ) y la prueba de evitación pasiva en los roedores ( $p = 0.028$ ). El comportamiento de las ratas viejas mostró diferencias estadísticamente significativas con respecto a los animales jóvenes, que permitió la selección del universo de trabajo.

La tabla 3 muestra los valores de la concentración de GSH en las cuatro áreas cerebrales estudiadas. Las ratas viejas sufrieron un marcado decremento en el contenido del tripeptido en todas las regiones ( $p < 0.001$ ); y fue más notable en el hipocampo donde disminuyó en un 96% con respecto al resto de las zonas estudiadas.

El comportamiento de la concentración de GSH en el hipocampo y en el septum fue muy similar, más evidente aún en los animales viejos.

La mayor actividad SOD en las ratas jóvenes se observó en el septum, sin embargo, con respecto a la actividad de esta enzima en los animales viejos fue muy similar en todas las regiones estudiadas; la corteza fue la zona de menor actividad SOD tanto en los animales viejos como en los jóvenes (Tabla 4).

La actividad CAT fue diferente en las áreas estudiadas y no mostró un patrón de comportamiento homogéneo según la edad. En los animales viejos la

Tabla 1. Valores promedios de la media y el error estándar de la media y el error estándar de latencia total y números de cruces análogos durante el ensayo 37 en el LAM de los grupos de ratas

Ratas	Latencia total(segundos)	Número de cruces
Jóvenes	10.15 ± 4.38	7.50 ± 2.3
Viejas	35.55 ± 1.12*	0.9 ± 1.60*

\*p < 0.05. Significativo U de Mann-Whitney.

Tabla 2. Valores promedios de la media y el error estándar en la ejecución en la prueba de evitación pasiva de las ratas

Ratas	Lat 1 (segundos)	# Cruces 1	Lat 2 (segundos)	# Cruces 2
Jóvenes	23.26 ± 8.16	11.4 ± 0.16	347.50 ± 2.13*	1.04 ± 0.06*
Viejas	34.84 ± 3.41	8.14 ± 0.36	187.35 ± 12.39*	6.62 ± 1.75*

\*p < 0.05 frente a Condición 1(Lat 1 y Cruces 1, respectivamente). Prueba U de Mann-Whitney.

Tabla 3. Valores promedios de la media y el error estándar de la concentración de GSH ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteína)

Ratas	Corteza frontal	Hipocampo	Estriado	Septum
Jóvenes, n = 15	7.67 ± 0.028 <sup>a</sup>	5.80 ± 0.032 <sup>a</sup>	5.67 ± 0.045 <sup>a</sup>	6.75 ± 0.049 <sup>a</sup>
Viejas, n = 20	1.20 ± 0.070 <sup>b</sup>	0.211 ± 0.028 <sup>b</sup>	1.41 ± 0.028 <sup>b</sup>	0.56 ± 0.014 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p < 0.001$ ).

22. Terry AV. Spatial navigational (water maze) tasks. In: Buccafusco JJ, ed. *Methods of Behavior Analysis in Neuro-science*. New York: CRC Press, (2001): 153-66

23. Gage FH, Bjorklund A, Stevani U, Dunnett SB, Kelly PAT. Intrahippocampal septal grafts ameliorate learning impairments in aged rats. *Science* (1984); 225: 533-5.

24. Azbill RD, Mu X, Brice-Keller AJ, Mattson MP, Springer JE. Impaired mitochondrial function, oxidative stress and altered antioxidant enzyme activities following traumatic spinal cord injury. *Brain Res* (1997); 765:283-90.

25. Aebi H. Catalase *in vitro*. *Methods Enzimol* (1984); 105:121-6.

26. Marklund J. Involvement of superoxide anion radical in autoxidation of pyrogallol as a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* (1992); 47:469-74.

27. Nakata M, Ohkawa H. Enzyme immunoassay with monoclonal antibody for environmental contaminants. *Tapa Kushitsu Kakusan Koso, Japan* (1996); 41(14):2132-8.

28. Hotter A, Radvani F. Determination of Phospholipase A<sub>2</sub> activity by a color assay using a pH indicator. *Toxicol* (1987); 25 (11):1181-7.

29. CCAC. *Guide to care and use of experimental animal*. Ottawa, Ontario: Bradda Printing services Inc.; 1997.

30. Gonder JC. *Guide for the care and use of laboratory animals*. *ILAR Journal* (2000); 35(8):23.

actividad CAT disminuyó en la corteza y en el área septal, mientras que en el estriado y en el hipocampo aumentó. El comportamiento de la enzima en estas regiones fue similar. El área de menor actividad CAT en las ratas viejas con déficit cognitivo fue el septum (Tabla 5).

Las concentraciones de MDA en todas las regiones mostraron incrementos significativos ( $p = 0.0044$ ), y un comportamiento diferente según el área. Las mayores concentraciones de MDA se apreciaron en el hipocampo y estriado; en el hipocampo 5 veces superiores en los animales viejos con respecto a los jóvenes, lo que refleja la vulnerabilidad de estas dos regiones a las ERO (Tabla 6).

Hubo un aumento significativo de la PLA<sub>2</sub> según la edad, y para este marcador también se observaron diferencias entre las áreas. Los niveles más elevados de actividad enzimática se detectaron en el estriado tanto para los animales jóvenes como los viejos (Tabla 7).

La actividad específica del FNT- $\alpha$  mostró variaciones significativas ( $p = 0.026$ ) según la edad. Esta citocina se incrementó en todas las regiones cerebrales de los animales viejos y jóvenes. El estriado fue la zona de mayor actividad (Tabla 8).

### Discusión

El GSH actúa como donador de protones en la neutralización del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y de peróxidos orgánicos, puede además reaccionar con especies radicálicas directamente e interviene en la regeneración de otros antioxidantes como el tocoferol y el ácido ascórbico; sin embargo, la función de este compuesto no se limita al mantenimiento del potencial reductor de la célula. Se conoce, además, que el GSH puede participar en funciones relacionadas con la señalización intra y extracelular en el cerebro, tales como la captación, síntesis y liberación de ácido glutámico y ácidos gamma-butírico [31], como sustrato y modulador alostérico en la síntesis de eicosanoides [32, 33], en la regulación de los receptores glutamatérgicos de tipo NMDA y no NMDA [34, 35], como neurotransmisor excitatorio con receptores propios y como activador de factores de transcripción [35].

El significativo decremento en la concentración de GSH, en todas las regiones cerebrales de las ratas viejas con déficit cognitivo, causa un estado de estrés oxidativo en la célula y provoca una incompleta oxidación de los sustratos en la mitocondria. El escape de electrones de la secuencia normal en la cadena de transporte electrónico mitocondrial incrementa una gran variedad de ERO, que pueden difundir a través de la membrana y provocar daño fuera del lugar donde se originó, lo que hace razonable esperar respuestas compensatorias en las vías antioxidantes de las enzimas relacionadas con el metabolismo de este compuesto y de otras enzimas antioxidantes como la SOD y la CAT.

Se conoce que el daño celular no ocurre hasta que no ha disminuido el 50% del GSH tisular [37]. Aún cuando sus concentraciones fueron diferentes en las áreas estudiadas se observa una disminución según la edad, con mayor intensidad en las áreas septales e hipocámpales donde descendieron en un 96%. Estos resultados coinciden con los de otros investigadores [36-39].

Tabla 4. Valores promedios de la media y el error estándar de la actividad enzimática de la SOD (U/mg de proteína)

Corteza	Corteza frontal	Hipocampo	Estriado	Septum
Jóvenes, n = 15	1.19 ± 0.021 <sup>a</sup>	1.29 ± 0.052 <sup>a</sup>	1.85 ± 0.023 <sup>a</sup>	2.66 ± 0.014 <sup>a</sup>
Viejas, n = 20	2.87 ± 0.007 <sup>b</sup>	3.68 ± 0.077 <sup>b</sup>	4.03 ± 0.016 <sup>b</sup>	3.84 ± 0.034 <sup>b</sup>

<sup>a, b</sup> Prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p < 0.01$ ).

Tabla 5. Valores promedios de la media y el error estándar de la actividad enzimática de la CAT (KU/mg de proteína)

Ratas	Corteza frontal	Hipocampo	Estriado	Septum
Jóvenes, n = 15	57.2 ± 0.004 <sup>a</sup>	35.0 ± 0.000 <sup>a</sup>	37.4 ± 0.002 <sup>a</sup>	80.2 ± 0.007 <sup>a</sup>
Viejas, n = 20	45.5 ± 0.007 <sup>b</sup>	66.7 ± 0.009 <sup>b</sup>	71.2 ± 0.014 <sup>b</sup>	26.6 ± 0.002 <sup>b</sup>

<sup>a, b</sup> Prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p < 0.01$ ).

Tabla 6. Valores promedios de la media y el error estándar en la concentración de MDA (nmol/mg de tejido húmedo)

Ratas	Corteza frontal	Hipocampo	Estriado	Septum
Jóvenes, n = 15	36.60 ± 0.679 <sup>a</sup>	15.16 ± 0.293 <sup>a</sup>	18.07 ± 0.587 <sup>a</sup>	12.4 ± 0.312 <sup>a</sup>
Viejas, n = 20	46.03 ± 0.007 <sup>b</sup>	75.90 ± 0.382 <sup>b</sup>	4.55 ± 0.191 <sup>b</sup>	51.38 ± 0.014 <sup>b</sup>

<sup>a, b</sup> Prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p < 0.01$ ).

La especificidad topográfica de este efecto, pudiera estar vinculada con la especial sensibilidad del hipocampo a la baja concentración de GSH y su afectación temprana en el envejecimiento. Estos resultados son congruentes con los estudios conductuales, en los que se evaluó una modalidad inhibitoria de aprendizaje y memoria (evitación pasiva) y en el LAM, con el que se exploró una modalidad espacial. El comportamiento de los animales viejos, con bajo contenido de GSH, mostró un desempeño menor en el aprendizaje espacial en la etapa de adquisición y en la consolidación de esta tarea. Al evaluar la capacidad de los animales para conservar una conducta inhibitoria, se registraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos experimentales, por lo tanto, al igual que otros autores [40], estos resultados demuestran que la disminución en el contenido de GSH no afecta la adquisición en la respuesta de evitación pasiva y sí genera un efecto específico sobre el aprendizaje espacial.

En los últimos años se han comenzado a dilucidar los eventos moleculares responsables del aprendizaje y la memoria, mediante la identificación de las áreas y

31. Lidell JF, Dringen R, Crac P. Apoptosis vs necrosis: glutathione mediated cell death during rewarming of rat brain tissue. *BB Acta* (2005); 1740:367-74.

32. Pereira CMF, Oliveira CR. Glutamate toxicity on a PC12 cell line involves glutathione (GSH) depletion and oxidative stress. *Free Radic Biol Med* (1997); 23:637-47.

33. Forsberg L, Leeb L, Thoren S. Human glutathione-dependent prostaglandin E synthase: gene structure and regulation. Implication in neurodegenerative diseases. *FEBS Lett* (2002); 471:78-82.

34. Vázquez OL, Almeida A, Bolaños JP. Depletion of glutathione up-regulates mitochondrial complex I expression in glial cells. *J Neurochem* (2001); 79:1183-95.

35. D'Álessio M, Cerella C, Amici C et al. Glutathione depletion up regulates Bcl-2 in BSO resistant cells. *FASEB Journal* (2004); 10:1813-21.

36. Xiong X, Peterson PL, Lee CP. Effect of N-acetylcysteine on mitochondrial function following traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma* (1999); 16:1067-82.

Tabla 7. Valores promedios de la media y el error estándar de la actividad enzimática de la PLA<sub>2</sub> (U/mg de proteína)

Ratas	Corteza frontal	Hipocampo	Estriado	Septum
Jóvenes, n = 15	0.14 ± 0.001 <sup>a</sup>	0.12 ± 0.032 <sup>a</sup>	0.18 ± 0.002 <sup>a</sup>	0.19 ± 0.005 <sup>a</sup>
Viejas, n = 20	0.26 ± 0.063 <sup>b</sup>	0.30 ± 0.004 <sup>b</sup>	0.41 ± 0.012 <sup>b</sup>	0.31 ± 0.003 <sup>b</sup>

<sup>a, b</sup> Prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p < 0.01$ ).

Tabla 8. Valores promedios de la media y el error estándar de la actividad específica del FNT- $\alpha$  (pg/mg de proteína)

Ratas	Corteza frontal	Hipocampo	Estriado	Septum
Jóvenes, n = 15	1.23 ± 0.039 <sup>a</sup>	0.98 ± 0.062 <sup>a</sup>	1.43 ± 0.054 <sup>a</sup>	0.76 ± 0.002 <sup>a</sup>
Viejas, n = 20	2.40 ± 0.022 <sup>b</sup>	2.06 ± 0.079 <sup>b</sup>	2.62 ± 0.007 <sup>b</sup>	1.98 ± 0.053 <sup>b</sup>

<sup>a, b</sup> Prueba de rangos múltiples de Duncan ( $p < 0.05$ ).

circuitos cerebrales relacionados con la adquisición y almacenamiento de información y el reconocimiento de los cambios plásticos en las conexiones sinápticas, como el asiento de los procesos cognitivos. Los mecanismos involucrados en la formación y conservación de la memoria, incluyen la actividad de los receptores glutamatérgicos de tipo NMDA, la estimulación de enzimas como la proteína quinasa II dependiente de calcio y calmodulina, la activación de factores de transcripción y la inducción de la síntesis de factores neurotróficos [41].

Muchas de las biomoléculas participantes en estos procesos son sensibles a los cambios en el estado *redox* del medio intracelular [42]. Sin embargo, poco se conoce aún sobre la influencia que el desequilibrio oxidativo puede tener sobre los procesos cognitivos. Lo cierto es que algunos estudios proponen el uso combinado de un amplio espectro de antioxidantes para lograr un metabolismo oxidativo equilibrado, y por esta vía esperan obtener una mejoría en el funcionamiento cerebral, que conduzca a una disminución significativa en las alteraciones de la comprensión y la memoria asociada con el envejecimiento [42].

El descenso en el contenido celular de GSH también podría ser parte del mecanismo excitotóxico, como consecuencia de la falla energética existente, ya que al producirse una insuficiencia temporal de GSH, aumenta el potencial oxidante del medio y disminuye la conductividad del receptor NMDA. A partir de ese momento, se desarrollan de eventos desencadenantes propios de la neurodegeneración, que afectan la eficiencia sináptica y la función cognitiva. Esto conduce a la atrofia y muerte neuronal, debido a la generación de ERO, más allá de la capacidad de los mecanismos homeostáticos.

En el estudio de la actividad de las enzimas antioxidantes se apreció un aumento significativo de la actividad de la SOD en los animales envejecidos con déficit cognitivo. Las ratas jóvenes y viejas mostraron un comportamiento similar en las áreas estudiadas. Por su parte, la actividad de la CAT fue diferente entre las áreas y no mostró un patrón de comportamiento homogéneo con la edad. En las ratas viejas disminuyó en la corteza y el septum y aumentó en el hipocampo y el estriado, de forma notable en esta última.

Como se señalara anteriormente, los estudios acerca de los efectos del envejecimiento cerebral sobre las enzimas antioxidantes no han aportado resultados homogéneos. Ello se debe a diferencias entre los experimentos en cuanto a la especie, la variedad, el sexo, las edades comparadas, el área cerebral y otros factores. Los resultados del estudio coinciden con los de Ciriolo y col. [43] con respecto al incremento asociado con la edad en la actividad de la SOD hipocámpal. En el hígado de roedores también se ha apreciado un aumento en la actividad de esta enzima según la edad, así como de otras enzimas antioxidantes como la glutatión transferasa. El daño oxidativo a las proteínas y a los lípidos aumenta con la edad. De este modo, el aumento en las actividades de la SOD y de la CAT, pueden representar un mecanismo compensatorio intracelular para combatir las ERO, y permitiría una reducción en el contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, lipoperóxidos y otros compuestos electrofílicos como aldehídos y quinonas, lo cual está en correspondencia con la inducibilidad de estas enzimas por las ERO [44].

Es importante notar que la actividad SOD es elevada en las áreas cerebrales estudiadas; pero su actividad es más intensa en el hipocampo y el estriado. A su vez, la actividad antioxidante CAT aumenta solamente en esas regiones. La CAT está involucrada en la eliminación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generado durante el metabolismo celular. La enzima se caracteriza por tener una elevada capacidad de reacción y baja afinidad por el sustrato, por lo que para su máxima actividad se requieren altas concentraciones de esta molécula. El efecto concertado de ambas enzimas es muy necesario para mantener el equilibrio oxidativo celular. El incremento de la actividad SOD sin el paralelo incremento de la CAT podría acumular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que si no se elimina eficientemente por la acción de esta enzima, genera otras especies reactivas y provoca degeneración celular por estrés oxidativo.

Durante el envejecimiento se ha observado que aumenta la actividad de la monoamino oxidasa B (MAO-B) en el hipocampo [45] y de esta reacción se genera como subproducto H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Además, el propio metabolismo de la dopamina hace que las neuronas dopaminérgicas del estriado sean más susceptibles al estrés oxidativo, ya que la dopamina es metabolizada enzimáticamente por la MAO y se genera H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por esta vía, a esto se suma la autoxidación de este neurotransmisor generando semiquinonas muy tóxicas para las neuronas dopaminérgicas. Floyd [46] y Pellmar y cols [47] reportaron elevada formación de radical hidroxilo relacionadas con las altas concentraciones de hierro existentes en estas dos áreas.

El incremento de actividad de la CAT en el hipocampo y el estriado sugiere que la acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alcanzó el umbral necesario para su activación, lo que no ocurrió en el septum y la corteza, donde probablemente la acción de la glutatión oxidasa fue suficiente para eliminar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generado por la SOD. Otra posible explicación es que la acumulación progresiva de las ERO y otros compuestos electrofílicos en estas regiones, constituye un evento necesario para la inducción de la CAT por las ERO, y se conoce que la CAT estriatal es inducida en condiciones de hiperestimulación glutamatérgica asociada a la excitotoxicidad.

Es importante destacar que la disminución en la actividad enzimática de la CAT en zonas como la corteza y el septum pudiera deberse a una inhibición regulatoria de la expresión y a la actividad de la enzima. Numerosas evidencias experimentales apoyan la concepción de que el daño oxidativo descansa en mecanismos autopropagantes que duran mucho más que el evento desencadenante. Es probable que la sobreexpresión compensatoria de esta enzima no se acompañe de aumentos de su actividad enzimática, debido al daño oxidativo postraduccional que sufre la proteína. Debido a la función de la CAT en el metabolismo oxidativo, su inhibición es un elemento exacerbante de la *noxa* oxidativa intracelular.

Estos hallazgos apuntan hacia un esquema de aumentos de las actividades enzimáticas con especificidad para cada área cerebral, en el cual la SOD es sobreactivada en todas las áreas examinadas, la CAT solo en aquellas donde el proceso neurodegenerativo es más prominente. Este patrón sugiere diferentes sensibilidades para la activación inducida por el daño oxidativo para cada enzima, y el más bajo es el umbral de la SOD.

37. Shanker G, Syversen T, Aschner J *et al.* Modulatory effect of glutathione status and antioxidant on methylmercury induced free radical formation in primary cultures of cerebral astrocytes. *Mol Brain Res* (2005); 11-22.

38. Mecocci P, Fano G, Fulle S *et al.* Age-dependent increases in oxidative damage to DNA, lipids and proteins in human skeletal muscle. *Free Radic Biol Med* (1999); 26(3-4):303-8

39. Watanabe T, Sagisaka H, Arakawa S. A novel model of continuous depletion of glutathione in mice treated with L-BSO. *J Toxicological Sci* (2003); 5:455-69.

40. Cruz R, Francis-Turner L, Díaz-Suárez CM, González ME. Efectos a corto plazo de la transección de la vía septohipocámpal y del Cerebrolysin sobre las enzimas del sistema del glutatión en el cerebro de ratas. *Rev Neurol* (1998); 26: 551-4.

41. Schulz JB, Lindenau J, Seyfried J, Dichgans J. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur J Biochem* (2002); 4904-11.

42. Steullet P, Neijt HC. Synaptic plasticity impairment and hypofunction of NMDA receptor induced by glutathione deficit. *Neuroscience* (2006); 137:807-19.

43. Ciriolo MR, Fiskin K, Martino A. Age-related changes in Cu/Zn SOD, Se dependent and independent glutathione peroxidase and catalase retards age-related oxidative damage and increases metabolic potential. *J Biol Chem* (1995); 337:15662-4.

44. Ho L, Osaka H, Aisen PS, Pasinetti GM. Induction of cyclooxygenase (COX)-2 but not COX-1 and NGF gene expression in apoptotic cell death. *J Neuroimmunol* (2004); 142-9.

45. Delanty N, Dichter MA. Oxidative injury in the nervous system. *Acta Neurol Scand* (2003); 98:145-53.

46. Floyd RA. Free radicals in molecular biology. Aging and disease. In Armstrong D. ed. New York: Raven press; 1984.

47. Pellmar TC, Neel KL, Lee HK. Free radical mediate peroxidative damage in guinea pig hippocampus *in vitro*. *J Neurosci Res* (1989); 36:437-41.

La concentración de MDA es un exponente directo del daño de las ERO a la célula, específicamente del radical hidróxilo. En este estudio se apreciaron incrementos significativamente elevados en la concentración de MDA con la edad en todas las regiones estudiadas, y un comportamiento diferente según el área. Se observaron altas concentraciones de MDA en el hipocampo y el estriado, con respecto al resto de las regiones estudiadas. Estos resultados concuerdan con el incremento de la actividad de las enzimas antioxidantes, así como con el descenso en la concentración de GSH.

La PLA<sub>2</sub> desempeña una función clave en el recambio de las membranas, exocitosis y reparación del daño oxidativo [48]. Los productos de su reacción (ácidos grasos libres y lisofosfolípidos) pueden actuar como moléculas de señalización intracelular o ser modificados en compuestos biológicamente activos como el factor activador de las plaquetas, las prostaglandinas y los leucotrienos [49]. El sistema nervioso central (SNC) expresa una significativa actividad de la PLA<sub>2</sub> y es rico en fosfolípidos que contienen ácido araquidónico. Se han reportado altas concentraciones de ácido araquidónico y sus metabolitos en eventos como isquemia cerebral, hipoglicemia y procesos inflamatorios [50]. En cambio, en áreas cerebrales de pacientes con EA se ha observado una disminución marcada de la actividad PLA<sub>2</sub> [51].

En este estudio, el aumento de la actividad de esta enzima durante el envejecimiento podría relacionarse con su función en el recambio de membranas y en la reparación del daño oxidativo, al eliminar ácidos grasos peroxidados de los fosfolípidos; aunque su papel en la transducción de señales donde se sintetizan moléculas como el ácido araquidónico y el diacilglicerol no debería descartarse, las cuales son propias de eventos de curso agudo como la isquemia-reperusión, la hipoxia y la inflamación.

Estos productos de la peroxidación de los lípidos están implicados en la inflamación, producen cambios en la permeabilidad vascular, formación de edema, cambios en canales iónicos y alteración en la función de los receptores de membrana, y por ende, en el potencial de membrana, con un aumento de la permeabilidad para algunos iones como el calcio. A su vez, este elemento activa la PLA<sub>2</sub>, con la consecuente liberación de ácido araquidónico de los fosfolípidos de membrana.

La capacidad de estas especies para oxidar al GSH, el aumento en la actividad SOD sin cambios en la

actividad de la CAT, las altas concentraciones de MDA y la elevación de la actividad de la PLA<sub>2</sub> en todas las zonas estudiadas, pudieran estar involucradas, a su vez, en la disminución del contenido de GSH en las áreas cerebrales de los animales envejecidos.

Las citocinas provocan una respuesta de estrés oxidativo y, por tanto, las señales inducidas por ellas, en su papel de primeros mensajeros, involucran la generación de ERO. Las citocinas activan factores de transcripción que responden al estrés oxidativo, como el NFκB, la AP-1 y también inducen apoptosis [52].

Se considera que el FNT-α cumple una función esencial en el desarrollo de varios procesos patológicos en el SNC, tales como la degeneración neuronal, la desmielinización y la gliosis. Esta citocina también actúa como un efector que destruye la mielina o los oligodendrocitos, lo cual conduce a lesiones desmielinizantes. La actividad del FNT-α y de la interleucina 1β también generan gran cantidad de anión superóxido. En este estudio se observaron elevados niveles del FNT-α con la edad en todos las áreas cerebrales. La activación de este factor incrementa las concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y del radical hidróxilo, lo que concuerda con la inducibilidad de la actividad CAT en zonas como el hipocampo y el estriado, así como la elevada concentración de MDA y PLA<sub>2</sub> en todas las regiones estudiadas en las ratas viejas con déficit cognitivo.

## Conclusiones

1. Existen cambios en los indicadores del metabolismo oxidativo asociados a la edad como respuesta al reto oxidativo que ocurre en los roedores con déficit cognitivo. El estrés oxidativo induce un patrón de cambios en la actividad de las enzimas antioxidantes en el cerebro, en el que la SOD es sobreactivada en todas las regiones estudiadas y la CAT lo es solo en aquellas donde el proceso neurodegenerativo es más prominente, como el hipocampo y el estriado.

2. Existen cambios en las concentraciones de MDA, PLA<sub>2</sub> y en el FNT-α asociados a la edad, que confirman que las ERO son mensajeros celulares y no simples agentes deletéreos.

3. El estudio realizado evidencia un vínculo estrecho entre el metabolismo oxidativo y los procesos cognitivos asociados a la edad, en esta relación los mecanismos preservadores de la homeostasis oxidante cerebral pueden participar a la vez, como moduladores de la función cognitiva y como diana de los eventos neurodegenerativos.

48. Hsu M, Srinivas B, Kumar J. Glutathione depletion resulting in selective mitochondrial complex I inhibition in dopaminergic cells is via an NO mediated pathway not involving peroxynitrite: implication in Parkinson's disease. *J Neurochem* (2005); 92:1091-03.

49. Kramer BC, Yabut JA, Cheong J, et al. Toxicity of glutathione depletion in mesencephalic cultures: a role for arachidonic acid and lipoxygenase metabolites. *Eur J Neurosci* (2004); 19:280-6.

50. Martin LJ. Neuronal cell death in nervous system development, disease, and injury (Review) *International Journal of Molecular Medicine* (2001); 7:455-78.

51. González-Fraguela ME, Castellanos-Benítez O, González-Hoyuela M. Estrés oxidativo en las neurodegeneraciones. *Rev Neurol* (1999); 28:504-11.

52. Birgel M, Gottschling-Zeller H, Rohrig K, Hauner H. "Role of cytokines in the regulation of plasminogen activator inhibitor-1 expression and secretion in newly differentiated subcutaneous human adipocytes". *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2000); 20(6):1682-7.

Recibido en octubre de 2006. Aprobado en noviembre de 2007.