

El daño oxidativo afecta la consolidación de la memoria en ratas

✉ Mei-Li Díaz-Hung¹, María E González¹, Ivette Fernández², Irenia Horruitiner², Samuel Piedra¹

¹Departamento de Inmunoquímica

²Departamento de Neurofisiología Experimental

Centro Internacional de Restauración Neurológica, CIREN

Avenida 25 no. 15805, CP 11300, La Habana, Cuba

E- mail: mldiaz@neuro.ciren.cu

RESUMEN

El glutatión es un importante antioxidante celular, cuya disminución promueve el daño oxidativo y altera las interacciones sinápticas, a corto y a largo plazo. Su función en el aprendizaje y la memoria ha sido poco estudiada. Se decidió determinar el efecto de la administración del L-butionin sulfoximina sobre el contenido de glutatión, y los indicadores de daño oxidativo celular (malonildialdehído, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa), a los siete días de la inyección intracerebroventricular, en la corteza frontal, el hipocampo y el cuerpo estriado, así como el efecto de la disminución del glutatión en el aprendizaje y la memoria, mediante la prueba de evitación pasiva. Los resultados sugirieron que el L-butionin sulfoximina induce un desbalance en la actividad enzimática antioxidante, que genera un daño en los componentes lipídicos celulares, y que existe un vínculo entre el daño oxidativo originado por la disminución de glutatión y la consolidación de la memoria.

Palabras clave: estrés oxidativo, glutatión, L-butionin sulfoximina, enzimas antioxidantes, malonildialdehído, aprendizaje y memoria

Biotecnología Aplicada 2011;28:245-249

ABSTRACT

Oxidative damage alters memory consolidation in adult rats. Glutathione is an important cellular antioxidant whose depletion leads to oxidative damage and alters short- and long-term synaptic interactions. Taking into account that the role of this molecule in learning and memory has been poorly studied, the present work evaluates the effect of the administration of L-buthionine sulfoximine (BSO) on glutathione content and markers of cellular oxidative damage (malondialdehyde, superoxide dismutase, glutathione peroxidase). BSO was delivered into the brain by intraventricular injection in the frontal cortex, hippocampus and striatum, evaluating the effect of the resulting glutathione depletion on learning and memory by means of the passive avoidance test, performed 7 days after administration. The results suggest that injecting L-buthionine sulfoximine unbalances the antioxidant enzyme system, resulting in damage to cellular lipid components. In addition, the data suggest the existence of a relationship between oxidative damage originated by glutathione depletion and memory consolidation.

Keywords: Oxidative stress, glutathione, L-buthionine sulfoximine, antioxidant enzymes, malondialdehyde, learning and memory

Introducción

El estrés oxidativo se debe a un exceso de sustancias prooxidantes, al déficit de los mecanismos de defensa contra la oxidación, o a ambos factores [1]. Uno de los compuestos más importantes que interviene en los mecanismos de defensa antioxidante celular, es el endógeno glutatión (GSH): tripéptido (γ -glutamil-cisteína-glicina), presente en la mayoría de las células, en el orden de los milimolares [2].

El GSH protege a las células del daño oxidativo y de la exposición a cantidades excesivas de compuestos electrofílicos exógenos y endógenos; contribuye a la regulación de la homeostasis del óxido nítrico (NO) [3]; y mantiene en estado reducido los grupos tioles de las proteínas citosólicas [4]. Además, puede intervenir en la captación, la síntesis y la liberación de ácido glutámico y ácido γ -aminobutírico, y en la regulación de los receptores glutamatérgicos del tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) y no NMDA [5].

Las alteraciones en la síntesis del GSH o en su contenido se han relacionado con la muerte neuronal, y con enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer [6]. No obstante, se conoce poco acerca de la

función *in vivo* de este antioxidante en los procesos cognitivos.

Considerando que la formación de la memoria requiere cambios en la plasticidad sináptica [7] y que el estrés oxidativo afecta la función sináptica [8], nuestro grupo de investigación se propuso determinar el efecto de la disminución del GSH en la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) (E.C. 1.15.1.6) y la glutatión peroxidasa (GPx) (E.C. 1.11.1.9), en el indicador de peroxidación lipídica malonildialdehído (MDA), y en el aprendizaje y la memoria.

Materiales y métodos

Animales

Se utilizaron 120 ratas machos de la línea Sprague Dawley, procedentes del Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio (Cenpalab, Mayabeque, Cuba), jóvenes (dos meses de edad), con un peso corporal entre 250 y 300 gramos. Se mantuvo el cambio de encamado dos veces por semana a cinco ratas por caja. La temperatura fue de 22 a 24 °C y la hu-

1. Jiménez-Jiménez FJ, Alonso-Navarro H, Ayuso-Peralta L, Jabbour-Wadiah T. Estrés oxidativo y enfermedad de Alzheimer. *Rev Neurol* 2006;42(7):419-27.

2. Drake J, Kanski J, Varadarajan S, Tsoras M, Butterfield DA. Elevation of brain glutathione by gamma-glutamylcysteine ethyl ester protects against peroxynitrite-induced oxidative stress. *J Neurosci Res*. 2002;(68):776-84.

3. Dalton TP, Chen Y, Schneider SN, Nebert DW, Shertzer HG. Genetically altered mice to evaluate glutathione homeostasis in health and disease. *Free Radic Biol Med*. 2004;37(10):1511-26.

4. Chen J, Small-Howard A, Yin A, Berry MJ. The responses of Hf22 cells to oxidative stress induced by buthionine sulfoximine (BSO). *BMC Neurosci* [internet]. 2005 Feb 15 [cited 2011 Jun 14];6 [about 10 p.]. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2202/6/10>

5. González ME, Fernández I, Bauza JY. Indicadores de estrés oxidativo en cerebros de ratas viejas con déficit cognitivo. *Biotecnol Apl*. 2007;24:145-50.

medad relativa de $60 \pm 5\%$. El ciclo de luz-oscuridad fue de 12 x 12 h, y el acceso al agua y a la comida fue libre. Durante los procedimientos experimentales se respetaron los principios éticos para la investigación con animales, establecidos por Clark y colaboradores [9] y el Consejo Canadiense para el Cuidado Animal (CCAC) [10, 11].

Inducción del estrés oxidativo

Las ratas correspondientes al grupo lesionado se anestesiaron con hidrato de cloral (420 mg/kg de peso corporal, intraperitoneal) y se colocaron en el aparato de cirugía estereotáctica para roedores. Se realizó una incisión para exponer el punto Bregma del cráneo, a partir del cual se establecieron las coordenadas correspondientes al ventrículo: AP -0.8; ML +1.4 y DV -4.0 [12]. El estrés oxidativo se indujo mediante la inyección de 7 μL de L-butionin-(S, R)-sulfoximina (BSO) (10 mM en solución salina fisiológica) a una velocidad de 1 $\mu\text{L}/\text{min}$, empleando una jeringuilla Hamilton de 10 μL . El grupo falso lesionado se sometió al mismo procedimiento, pero se usó solución salina fisiológica en lugar de BSO. Un grupo de animales permaneció sin tratar.

Obtención de muestras biológicas

A los 7 días de la cirugía, los animales se decapitaron bajo sedación profunda con hidrato de cloral (840 mg/kg de peso corporal, por vía intraperitoneal). Se extrajeron sus cerebros y se lavaron con solución salina fisiológica fría. Posteriormente se realizó la disección de las áreas cerebrales de interés (corteza frontal, hipocampo y cuerpo estriado), de los dos hemisferios, de cada animal. Los tejidos se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron a -70°C hasta su procesamiento.

Cuantificación del glutatión total

El contenido del citosol se obtuvo por la homogenización de los tejidos en 500 μL de ácido 5-sulfosalicílico al 5% en un homogenizador Potter, de Bioblock Scientific, mediante 21 golpes a 1000 rpm en baño de hielo. La muestra resultante se centrifugó a 8160 x g a 4°C durante 10 min, y se extrajo el sobrenadante libre de proteínas. La concentración de GSH se determinó por el método de reciclaje enzimático de Tietze [13]. En el ensayo se incubaron 50 μL de solución estándar de GSH 1.2 mM, blanco o muestra, en baño de agua, durante 25 min a 37°C , en 400 μL de fosfato de sodio 143 mM/ EDTA 6.3 mM/ NADPH 0.24 mM/ ácido 5.5'-ditiobis-2-nitrobenzoico 0.67 mM a pH 7.5. Esta mezcla se añadió en la cubeta junto con 50 μL de glutatión reductasa (GRD), 1 U/mL. El aumento de la densidad óptica (DO) se registró por espectrofotometría a 412 nm cada 3 segundos, durante 1 min (en un espectrofotómetro Shimadzu). La mezcla precipitada se incubó toda la noche a temperatura ambiente con 500 μL de NaOH 1 M. Para la cuantificación de proteínas, se resuspendió mediante vibroagitación durante varios minutos y se emplearon diluciones de 1:50.

Determinación de la actividad de la superóxido dismutasa

Las áreas cerebrales se homogenizaron con solución Tris 1 M/ sacarosa 0.25 M a pH 7.4 en una relación 1:5 (p/v) de en un homogenizador Potter, de Bioblock

Scientific, mediante 21 golpes a 1000 rpm en baño de hielo. La muestra resultante se centrifugó durante 15 min a 16 000 x g y 4°C , y se extrajo el sobrenadante. Para la determinación de la actividad de la SOD se utilizó el método de Marklund [14]. La deslipidación de las muestras se realizó tomando una alícuota de 100 μL del compuesto homogéneo, y añadiéndole 30 μL de cloroformo y 50 μL de metanol. Posteriormente se agitó durante 1 min en un vibroagitador, se centrifugó a 2448 x g durante 20 min y se extrajo el sobrenadante. En el ensayo se utilizó un tampón Tris 0.2 M/ HCl 20mM/ EDTA 2 mM a pH 8.2. La solución de pirogalol se preparó al 5% en agua destilada y protegida de la luz. Los valores de DO se registraron en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 420 nm, cada 3 segundos durante 1 min. Se consideró como una unidad de actividad enzimática, la cantidad de enzima necesaria para lograr una inhibición de la autooxidación en un 50%, a 25°C .

Determinación de la actividad enzimática de la glutatión peroxidasa

El contenido del citosol se obtuvo mediante la homogenización de las áreas cerebrales con 1 mL de solución Tris 50 mM/ EDTA 0.1 mM a pH 7.6, en un homogenizador Potter, de Bioblock Scientific, mediante 30 golpes (con intervalos de 1 min cada 10 golpes) a 1000 rpm en baño de hielo. La muestra resultante se centrifugó durante 15 min a 16 000 x g y 4°C , se extrajo el sobrenadante y se congeló a -20°C hasta su procesamiento.

Para el ensayo se utilizó un tampón fosfato de potasio 0.1 M/ EDTA Na₂ 1 mM/ NaN₃ 2 mM a pH 7; una solución X (GSH 1.25 mM/ NADPH 187.5 μM / GRD 0.3 U/mL en tampón fosfato), y como sustrato CuOOH 10 mM en etanol al 50%. En la cubeta se añadieron 400 μL de solución X y 50 μL de muestra (M) o tampón de homogenización (B), se incubaron durante 5 min a 25°C y luego se añadieron 50 μL de CuOOH. A los 10 segundos se registraron los valores de DO a una longitud de onda de 340 nm, cada 10 segundos durante 2 min. Se consideró como una unidad de actividad enzimática, la cantidad de enzima necesaria para catalizar la oxidación de 1 μmol de GSH en presencia de CuOOH, por minuto, a pH 7 y 25°C [15].

Cuantificación de malonildialdehído

La muestra homogénea se obtuvo en condiciones similares al ensayo de SOD. Se mezclaron 200 μL de la muestra con 400 μL de solución reactivo ácido tiobarbitúrico 0.67% en una solución de HCl 0.2 M, en un vibroagitador. La mezcla se incubó durante 15 min en baño de agua a 100°C y se centrifugó a 2448 g durante 10 min a temperatura ambiente. La DO del sobrenadante (200 μL de muestra con 400 μL de reactivo) frente a la muestra blanco (200 μL de H₂O con 400 μL de reactivo) se leyó a 535 nm [16].

Cuantificación de proteínas totales

La cuantificación de las proteínas totales se realizó mediante el método de Bradford [17]. Se mezclaron 100 μL de muestra o de albúmina de suero bovino (blanco) con 2 mL de solución azul brillante de Coomassie 0.1 mg/mL en H₃PO₄ 8.5%/etanol a 0.05% mediante vibroagitación y se midió la DO a 595 nm.

6. Chi L, Ke Y, Luo C, Gozal D, Liu R. Depletion of reduced glutathione enhances motor neuron degeneration in vitro and in vivo. *Neuroscience*. 2007;144(3):991-1003.

7. Izquierdo I, Bevilacqua LR, Rossato JI, Bonini JS, Medina JH, Cammarota M. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends Neurosci*. 2006;29(9):496-505.

8. Ansari MA, Roberts KN, Scheff SW. Oxidative stress and modification of synaptic proteins in hippocampus after traumatic brain injury. *Free Radic Biol Med*. 2008;45(4):443-52.

9. Clark JD, Gebhart GF, Gonder JC, Keeling ME, Kohn DF. Special Report: The 1996 Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *ILAR J*. 1997;38(1):41-48.

10. Guidelines for the use of animals in Neuroscience Research. In: Olfert ED, Cross BM, McWilliam AA, editors. *Guide to the care and use of experimental animals*. Canadian Council on Animal Care. 2nd ed. Ottawa: Bradda Printing Services; 1993. p. 155-62.

11. The use of animals in psychology. In: Olfert ED, Cross BM, McWilliam AA, editors. *Guide to the care and use of experimental animals*. Canadian Council on Animal Care. 2nd ed. Ottawa: Bradda Printing Services; 1993. p. 163-5.

12. Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 2nd ed. San Diego: Academic Press; 1986.

13. Azbill RD, Mu X, Bruce-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(2):283-90.

14. Marklund S, Marlund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem*. 1974;47(3):469-74.

15. Flohe L, Gunzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*. 1984;105:114-21.

16. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 1978;52:302-10.

17. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.

La calibración se realizó con soluciones de la albúmina a concentraciones de 0.044; 0.066; 0.88 y 0.132 mg/mL, determinadas a partir del coeficiente de extinción a 280 nm ($k = 0.68 \text{ mL/mg}$).

Aprendizaje y memoria inhibitoria. Evitación pasiva

En la prueba de evitación pasiva, los animales deben suprimir su preferencia espontánea por la oscuridad en una caja dividida en dos compartimentos de dimensiones idénticas: 35 x 30 x 25 cm; uno oscuro y uno iluminado, comunicados por una puerta (de 7 x 9 cm), con el fin de evitar un estímulo punitivo [18]. A las 24 h de la lesión, las ratas se colocaron en el compartimiento iluminado, y se les permitió la libre exploración de ambas cámaras durante 3 min. Dos horas más tarde comenzó la fase de entrenamiento, en la que se registró el tiempo de la primera entrada al compartimiento oscuro. Luego de 6 min de libre exploración, se les aplicó un pulso de corriente de 1 mA (entre 75 y 80 Hz) durante 3 s. A continuación se abrió la puerta, y quedó libre el acceso al compartimiento iluminado, donde debían permanecer 1 min evitando el compartimiento oscuro. Cada vez que el animal no cumplía esta condición se repetía el estímulo. A los 7 días de la lesión, se repitió el procedimiento sin el estímulo, con el fin de evaluar la retención. En cada fase se registró el tiempo de latencia del primer cruce.

Procesamiento de los datos y análisis estadístico

En el análisis estadístico se utilizó el programa informático Statistic (versión 6.0). La distribución normal y la homogeneidad de varianza de los datos se verificaron mediante las pruebas de Kolmogorov-Smirnov y de Levene, respectivamente. Las variables de estrés oxidativo se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de clasificación simple y la prueba de Tukey. Las variables que no cumplieron las premisas del ANOVA, se analizaron mediante la prueba no paramétrica de comparación de grupos independientes de Kruskal-Wallis. El nivel de significación para las variables evaluadas fue de $p \leq 0.05$.

Resultados

Análisis bioquímicos

En ninguna de las áreas cerebrales estudiadas de los animales falsos lesionados y los tratados con BSO se observaron diferencias en el contenido de GSH. Sin embargo, en ambos grupos se apreció una disminución significativa del contenido de GSH en la corteza y el estriado, con respecto a los animales sanos ($p < 0.05$) (Figura 1).

Aunque la actividad de la SOD en el grupo con la lesión con BSO fue significativamente mayor que en el grupo sano, solo fue altamente significativa con respecto a los animales falsos lesionados en el estriado. Entre el grupo falso lesionado y el sano no hubo diferencias ($p < 0.001$) (Figura 2A).

La mayor actividad de la GPx se encontró en el grupo con la falsa lesión. Esta fue significativa con respecto al grupo lesionado con BSO en el hipocampo, y con respecto a los animales sanos, en la corteza y el hipocampo ($p < 0.01$). En el estriado no se observaron diferencias (Figura 2B).

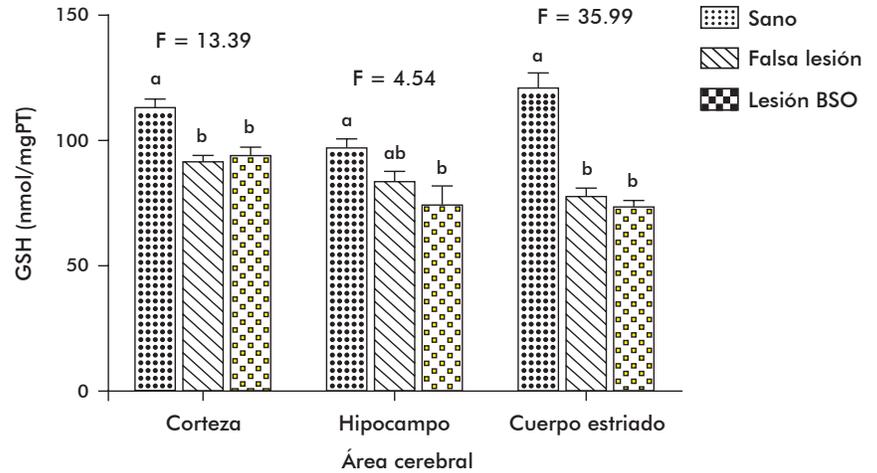


Figura 1. Contenido de glutatión total por miligramo de proteínas totales (nmol/mg PT), 7 días después de la lesión con L-butionin-(S, R)-sulfoximina (BSO). Se muestra la media \pm error estándar, así como los resultados del ANOVA y la prueba de Tukey de la concentración de GSH ($n = 9$; $p < 0.001$).

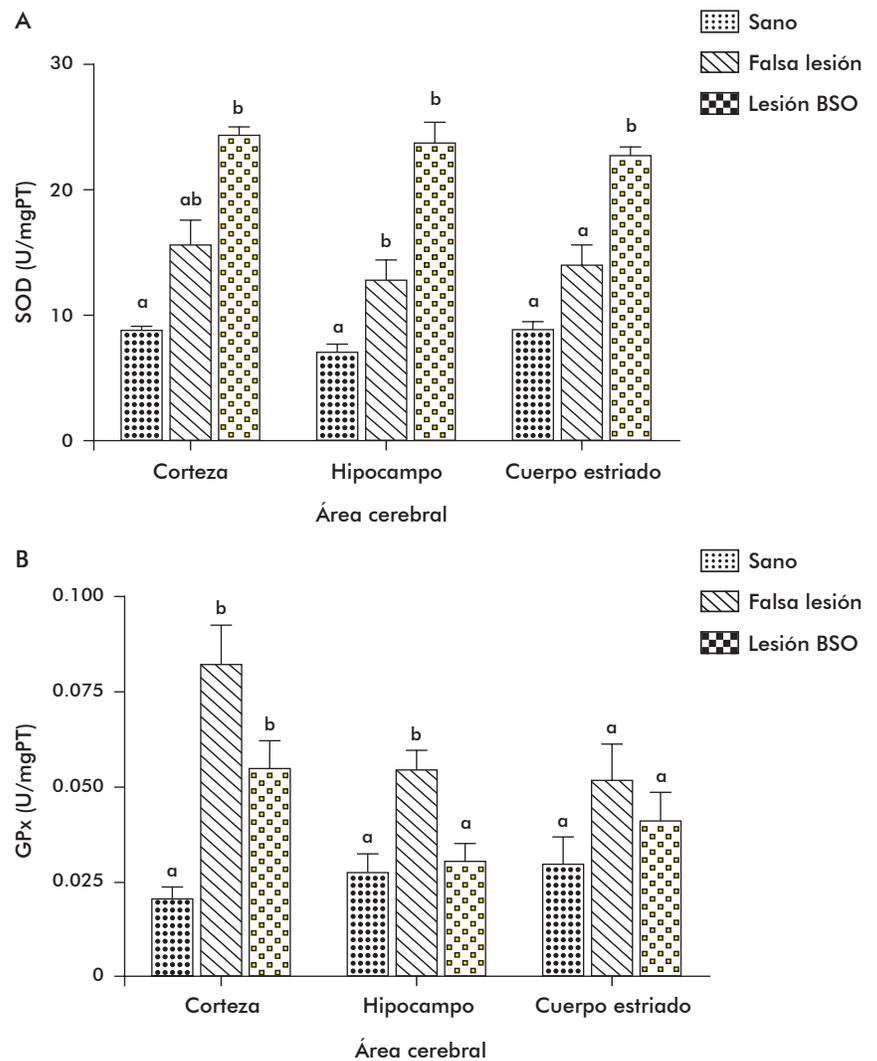


Figura 2. Actividad de las enzimas antioxidantes 7 días después de la lesión. A: superóxido dismutasa ($n = 10$ por grupo) y B: glutatión peroxidasa ($n = 9$ por grupo). Se muestra la media \pm error estándar de la actividad enzimática específica, analizada mediante la prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0.001$).

El contenido de MDA tuvo un aumento altamente significativo en todas las áreas estudiadas del grupo lesionado con BSO ($p < 0.001$) (Figura 3).

Estudios conductuales

Durante la fase de entrenamiento en la caja de evitación pasiva, todos los grupos manifestaron un desempeño similar. A los siete días, mientras se evaluaba la retención, fue significativo el aumento de la latencia de entrada al compartimiento oscuro de los animales de los grupos control y con vehículo, con respecto al grupo BSO ($p < 0.01$) (Figura 4).

Discusión

Numerosos estudios indican un incremento del daño oxidativo y del deterioro cognitivo temprano en pacientes con enfermedad de Alzheimer [19]. El envejecimiento normal generalmente también acarrea un deterioro cognitivo progresivo, particularmente en las funciones de la memoria. La identificación de las reacciones de los radicales libres como promotoras del envejecimiento implica que la intervención en este sentido esté encaminada a limitarlas o inhibirlas, para entretener el proceso de envejecimiento y la patogénesis relacionada. La terapia antioxidante ha recibido atención creciente sobre todo en los países de Occidente. Sin embargo, aún se precisa avanzar en estudios que mejoren la evaluación del potencial benéfico de la terapia antioxidante: la comprensión de los mecanismos de daño oxidativo al inicio del proceso, la identificación de marcadores fiables de daño oxidativo y el estado oxidativo de los pacientes, así como la identificación de una ventana terapéutica que ofrezca beneficios [20]. Es necesario, además, profundizar en la función del sistema del GSH, por su importancia en el mantenimiento de la homeostasis oxidante en el cerebro y su relación con la función cognitiva [18].

Diversos estudios en seres humanos, ratas y monos han propuesto que la codificación de las características de los estímulos ocurre en estructuras cerebrales que funcionan hasta cierto punto como sistemas de memoria independientes. Estos se han enfocado en el hipocampo, el núcleo estriado, la amígdala y la corteza cerebral frontal [21].

El BSO se ha utilizado ampliamente como inhibidor de la γ -glutamilcisteína sintetasa en investigaciones neurológicas *in vivo* e *in vitro*. Sin embargo, su efecto es transitorio, y a los siete días de administrado, se restablecen los niveles de GSH con respecto a los valores controles [22]. Ello explica el contenido similar de GSH entre los grupos lesionados con BSO y con el vehículo; aunque ambos grupos muestran un bajo contenido de GSH con respecto a los animales sanos.

Resultó interesante que aunque el contenido de GSH se restableció en el grupo lesionado con BSO, hubo altos niveles de MDA. Ello sugiere que este grupo presenta un desbalance oxidativo, y apoya la teoría de que el daño oxidativo procede de mecanismos autopropagantes, que duran más que el evento desencadenante [23]. La disminución del contenido de GSH induce la inhibición de la actividad de los complejos I y II mitocondriales, así como de la producción de ATP, lo que deviene un aumento en la generación de especies reactivas del oxígeno [24]. Estas pueden difundir hacia otros compartimientos celulares y provocar daño fuera del lugar donde se originaron, por lo que se

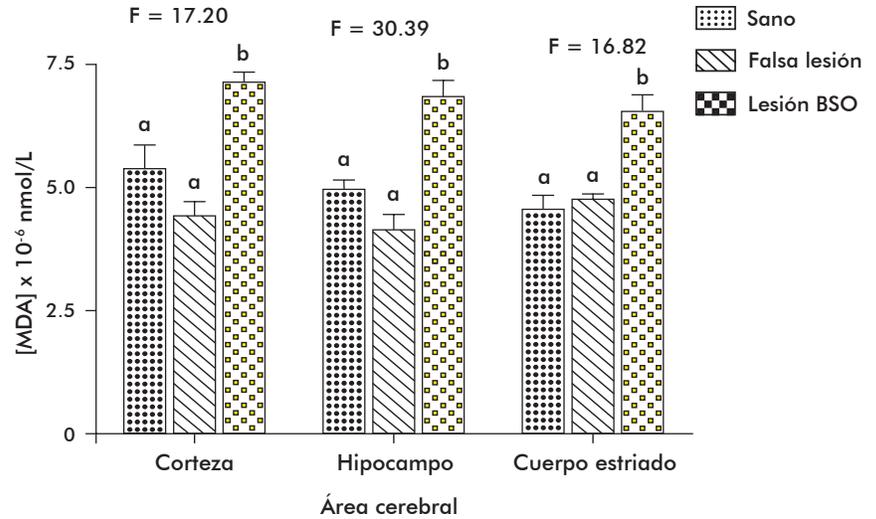


Figura 3. Concentración de malondialdehído (nmol/L). Se muestra la media \pm error estándar de la concentración de malondialdehído (MDA) de los animales sanos ($n = 9$), los falsos lesionados ($n = 9$) y los lesionados con L-butionin-(S, R)-sulfoximina (BSO; $n = 10$), y el resultado del ANOVA y la prueba de Tukey ($p < 0.001$).

esperaba una respuesta compensatoria de las enzimas antioxidantes [5].

Aunque la actividad enzimática de la SOD se mantuvo elevada en todas las áreas cerebrales estudiadas del grupo lesionado con BSO, con respecto al grupo de la falsa lesión, este aumento solo alcanzó significación en el estriado. Ello sugiere una mayor susceptibilidad de esta región al déficit de GSH e indica que se acumuló H_2O_2 . La GPx utiliza el GSH como donador de electrones para catalizar la reducción del H_2O_2 , e hidroperóxidos provenientes de la peroxidación lipídica y del metabolismo eicosanoide [25]. Por eso, el sistema del GSH es esencial para contrarrestar el exceso de H_2O_2 y proteger las membranas biológicas y otros componentes celulares contra el daño oxidativo [26].

Tal incremento de la actividad de la SOD no se benefició con un mecanismo compensatorio de la actividad de la GPx, lo que sugiere que esta enzima es sensible a la baja disponibilidad de GSH, específicamente en el hipocampo y en el cuerpo estriado.

18. Cruz-Aguado R, Almaguer-Melian W, Díaz C, Lorigados L, Bergado J. Behavioral and biochemical effects of glutathione depletion in the rat brain. *Brain Res Bull.* 2001;55:327-33.

19. Markesbery WR, Lovell MA. Damage to lipids, proteins, DNA, and RNA in mild cognitive impairment. *Arch Neurol.* 2007;64:954-6.

20. Fusco D, Colloca G, Lo Monaco MR, Cesari M. Effects of antioxidant supplementation on the aging process. *Clin Interv Aging.* 2007;2(3):377-87.

21. Rueda-Orozco P, Montes-Rodríguez C, Soria-Gómez E, Herrera-Solis A, Hopkins R, Guzmán K, Próspero-García A, Ruiz-Contreras A, Próspero-García O. Dependencia de los sistemas de memoria al ciclo luz/oscuridad en la expresión de estrategias adaptativas. Primera parte. *Salud Mental* 2006; 29:19-24.

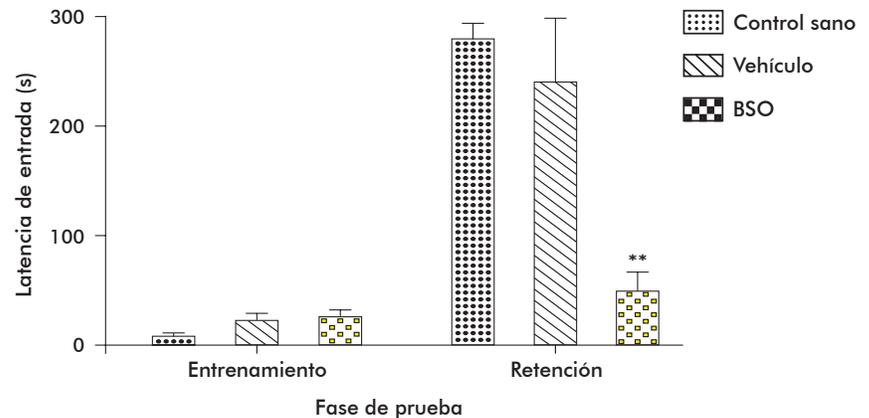


Figura 4. Latencias de entrada en la prueba de evitación pasiva (s). Se muestra la media \pm error estándar de las ratas controles ($n = 9$), falsos lesionados ($n = 7$) y las tratadas con L-butionin-(S, R)-sulfoximina (BSO; $n = 9$) en cada fase de la prueba, así como el resultado de la prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0.01$). ** - Diferencia estadísticamente muy significativas.

El H_2O_2 puede oxidar residuos claves de cisteína y alterar la estructura y función de las proteínas [27]. Las neuronas y las células gliales producen NO. Esta especie puede reaccionar con el anión O_2^- y formar peroxinitrito (ONOO $^-$), y ante el déficit de GSH, formar el ión nitrosonio (NO $^+$). Tales especies constituyen fuertes agentes oxidantes que inactivan proteínas como la succinato deshidrogenasa, la glutamina sintetasa, el citocromo P_{450} , Ca^{2+} -ATPasa del retículo endoplasmático, Mn^{2+} -SOD y la GRD [28].

La baja actividad de la enzima GPx en los animales tratados con BSO puede deberse a un daño oxidativo en la proteína, lo que propició la acumulación de H_2O_2 . El H_2O_2 es relativamente estable en solución y puede atravesar fácilmente las membranas [29], e iniciar cadenas de peroxidación lipídica y formar aldehídos como el MDA [30]. Hubo un incremento de la concentración de MDA en las áreas cerebrales estudiadas del grupo lesionado con BSO, resultado que se corresponde con la ausencia de una respuesta compensatoria de la GPx en este grupo y coincide con los de Rougemont y colaboradores, al aplicar BSO en áreas cerebrales específicas [31].

Algunas investigaciones sugieren que la aplicación *in vitro* de H_2O_2 inhibe la actividad de los receptores NMDA [32]. Además se ha demostrado que un déficit del 40% del contenido de GSH cerebral es suficiente para disminuir la función de los receptores NMDA, ya que estos presentan residuos de cisteína susceptibles al estado redox del medio [33], y este efecto pudiera ser potenciado por un déficit de la actividad de la GPx, como en el grupo tratado con BSO.

La elevación del Ca^{2+} intracelular a través de los canales iónicos conformados por los receptores NMDA, es el elemento clave en la activación de las proteínas quinasas, encargadas de modular, a largo plazo, la efectividad en la transmisión sináptica y la síntesis proteica requerida para el mantenimiento de la potenciación a largo plazo y la consolidación de la memoria [34].

El resultado de la evitación pasiva mostró una pobre retención, por la baja latencia de entrada mostrada por el grupo lesionado con BSO durante esta fase de la prueba. La asociación entre el movimiento hacia el lado oscuro y el estímulo adverso ocurrió en segundos, así como la inducción de potenciación a largo plazo [7]. Ello sugiere que probablemente estos animales no lograron mantener los mecanismos que garantizan la consolidación de la memoria.

Los estudios conductuales relacionados con el estrés oxidativo no muestran resultados homogéneos. Algunas investigaciones sobre el efecto antioxidante en las funciones cognitivas apuntan a una participación directa de las ERO en el aprendizaje y la memoria [35, 36]. Sin embargo, el manejo mediante ingeniería genética del péptido β -amiloides, sugirió la posibilidad de que el estrés oxidativo no es necesario ni suficiente para provocar alteraciones de la memoria [37]. Relacionado con el déficit de GSH, se ha observado una afectación de la memoria a corto plazo y un déficit motivacional [18]; además, puede favorecer los procesos oxidativos, que contribuyen de manera indirecta al deterioro cognitivo [38].

Estos resultados sugieren que independientemente del evento inicial, el daño oxidativo puede persistir debido a un desbalance en las enzimas antioxidantes, que causa el incremento de la peroxidación lipídica. Esta condición, que afecta directamente las membranas biológicas, puede estar relacionada con el deterioro de la memoria a largo plazo en los animales tratados con BSO.

Agradecimientos

A Ariadna Costa Mujica, del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Biología de la Universidad de La Habana (Cuba); a Daymara Merceron Martínez, del Centro de Neurociencias (Cuba), por la contribución con los experimentos; y a Lourdes Lorigados, Teresa Serrano y Lisette Blanco, del Centro Internacional de Restauración Neurológica (CIREN, Cuba).

22. Meister A. Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and its reversal; applications in research and therapy. *Pharmacol Ther.* 1991;51(2):155-94.

23. García R, González M, Fernández I, Castaño Y, Díaz M, Alberti E. Behavioral and oxidative metabolism disorders in a model of transient induced cerebral hypoperfusion in rats. *Biotechnol Appl.* 2008;25:332-8.

24. Hsu M, Srinivas B, Kumar J, Subramaniam R, Andersen J. Glutathione depletion resulting in selective mitochondrial complex I inhibition in dopaminergic cells is via an NO-mediated pathway not involving peroxynitrite: implications for Parkinson's disease. *J Neurochem.* 2005;92(5):1091-1103.

25. Liddell JR, Dringen R, Crack PJ, Robinson SR. Glutathione peroxidase 1 and a high cellular glutathione concentration are essential for effective organic hydroperoxide detoxification in astrocytes. *Glia.* 2006;54(8):873-9.

26. Lv SW, Wang XG, Mu Y, Zang TZ, Ji YT, Liu JQ, et al. A novel dicyclodextrinyl diselenide compound with glutathione peroxidase activity. *FEBS J.* 2007;274(15):3846-54.

27. Oliveira-Marques V, Marinho HS, Cyrne L, Antunes F. Role of hydrogen peroxide in NF-

kappaB activation: from inducer to modulator. *Antioxid Redox Signal.* 2009;11(9):2223-43.

28. Kuo WN, Kocis JM. Nitration/S-nitrosation of proteins by peroxynitrite-treatment and subsequent modification by glutathione S-transferase and glutathione peroxidase. *Mol Cell Biochem.* 2002;233(1-2):57-63.

29. Fisher AB. Redox signaling across cell membranes. *Antioxid Redox Signal.* 2009;11(6):1349-56.

30. Brunk UT, Terman A. The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging: accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis. *Eur J Biochem.* 2002;269(8):1996-2002.

31. Rougemont M, Do KQ, Castagne V. New model of glutathione deficit during development: Effect on lipid peroxidation in the rat brain. *J Neurosci Res.* 2002;70(6):774-83.

32. Jiang D, Akopian G, Ho YS, Walsh JP, Andersen JK. Chronic brain oxidation in a glutathione peroxidase knockout mouse model results in increased resistance to induced epileptic seizures. *Exp Neurol.* 2000;164(2):257-68.

33. Steullet P, Neijt HC, Cuenod M, Do KQ. Synaptic plasticity impairment and hypofunction

of NMDA receptors induced by glutathione deficit: relevance to schizophrenia. *Neuroscience.* 2006;137(3):807-19.

34. Almaguer-Melian W, Cruz-Aguado R, Bergado JA. Synaptic plasticity is impaired in rats with a low glutathione content. *Synapse.* 2000;38(4):369-74.

35. Li J, Wang C, Zhang JH, Cai JM, Cao YP, Sun XJ. Hydrogen-rich saline improves memory function in a rat model of amyloid-beta-induced Alzheimer's disease by reduction of oxidative stress. *Brain Res.* 2010;1328:152-61.

36. Veerendra Kumar MH, Gupta YK. Effect of different extracts of *Centella asiatica* on cognition and markers of oxidative stress in rats. *J Ethnopharmacol.* 2002;79(2):253-60.

37. Butterfield DA, Galvan V, Lange MB, Tang H, Sowell RA, Spilman P, et al. *In vivo* oxidative stress in brain of Alzheimer disease transgenic mice: Requirement for methionine 35 in amyloid beta-peptide of APP. *Free Radic Biol Med.* 2010;48(1):136-44.

38. Shukitt-Hale B, Erat SA, Joseph JA. Spatial learning and memory deficits induced by dopamine administration with decreased glutathione. *Free Radic Biol Med.* 1998;24(7-8):1149-58.