



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
UNIDAD **IZTAPALAPA**

**DAÑO EXCITOTÓXICO EN EL PATRÓN DE TOXICIDAD EVOCADO POR TALIO  
EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE RATA: POSIBLE PARTICIPACIÓN DE  
LOS RECEPTORES PARA NMDA**

TESIS

Que para obtener el grado académico de Doctorado en Biología Experimental

**PRESENTA**

**Bióloga Laura Osorio Rico**

**COMITÉ TUTORIAL**

Dra Mina Konigberg Fainstein

Dr. Abel Santamaría Del Angel

Dra. Sonia Galván Arzate

México D.F. 13 de Noviembre del 2015

Agradeciendo:

Al Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad  
Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa avalado como  
Posgrado de Alto Nivel en el programa Nacional de Posgrado  
del CONACYT, con la clave 001482

A la Dirección General y la Dirección de Investigación del  
Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.  
“Manuel Velasco Suárez”.

México D.F. a 13 de Noviembre del 2015

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, aprobaron la tesis titulada:

**DAÑO EXCITOTÓXICO EN EL PATRÓN DE TOXICIDAD EVOCADO POR TALIO  
EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE RATA: POSIBLE PARTICIPACIÓN DE  
LOS RECEPTORES PARA NMDA.**

Que presentó la

**Bióloga Laura Osorio Rico**

**Comité Tutorial:**

**CO-DIRECTOR**

DRA. MINA KÖNIGSBERG FAINSTEIN

**CO-DIRECTOR**

DR. ABEL SANTAMARIA DEL ANGEL

**ASESOR**

DRA SONIA GALVÁN ARZATE

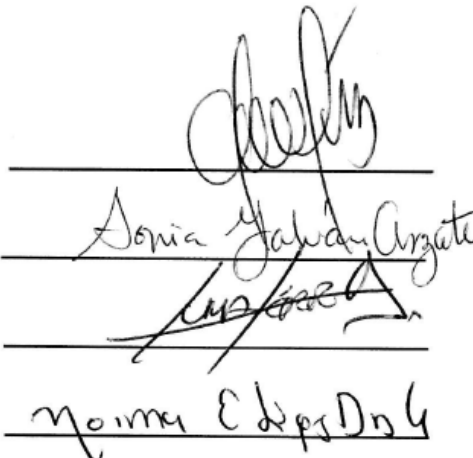
**Jurado:**

Dra. Anabel Jiménez Anguiano

Dra. Sonia Galván Arzate

Dr. Armando Luna López

Dra. Norma Edith López Díaz Guerrero



Handwritten signatures of the jury members over horizontal lines. The signatures are: Anabel Jiménez Anguiano, Sonia Galván Arzate, Armando Luna López, and Norma Edith López Díaz Guerrero.

CO-DIRECTOR INTERNO

DRA. MINA KÖNIGSBERG FAINSTEIN

Laboratorio de Bioenergética y Envejecimiento

Celular, Depto. de Ciencias de la Salud,

UAM-Iztapalapa

CO-DIRECTOR EXTERNO

DR. ABEL SANTAMARÍA DEL ANGEL

Laboratorio de Aminoácidos Excitadores,

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, MVS.

ASESOR EXTERNO

DRA SONIA GALVÁN ARZATE

Depto. de Neuroquímica

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, MVS.

Este trabajo fue realizado en:

- El laboratorio de Bioenergética y Envejecimiento Celular del Departamento de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa
- El laboratorio de Aminoácidos Excitadores del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”.
- El Departamento de Neuroquímica del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”
- El Departamento de Patología Experimental del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. **Mina Königsberg**, por su gran apoyo, paciencia, sus enseñanzas y crítica a mi trabajo de tesis. Por creer en mí como profesionalista. Pero sobre todo, por ser un gran ser humano y amar la vida de una manera tan singular que me hizo ver la vida de una mejor manera. Mil gracias.

Al Dr. **Abel Santamaría**, por el impulso para iniciar y terminar este proyecto. Por sus aportaciones a la estructuración a esta tesis. Gracias por su apoyo.

A la Dra. **Sonia Galván**, por su apoyo y su ayuda incondicional a lo largo de este trabajo. Gracias por todos estos años de enseñanza y confianza.

A la Dra. **Anabel Jiménez**, por sus comentarios tan acertados, por estar presente en cada uno de mis exámenes, por buscar los diferentes caminos para tener un mejor desempeño de mi tesis. Por darme siempre ánimos y desearme lo mejor.

Al Dr. **Armando Luna**, por su apoyo a la escritura de tesis, por sus comentarios en los seminarios.

A la Dra. **Norma López**, por la revisión a esta tesis y los comentarios a lo largo de estos trimestres.

A la Dra. **Viridiana González**, por tomar tiempo y hacer comentarios al escrito de la tesis. Por sus comentarios a lo largo del proyecto de investigación.

Al Dr. **Julio Sotelo**, por sus discursos positivos que siempre nos hicieron sentir parte del Instituto de Neurología. Por enseñarme a perseverar en este camino nada fácil de la investigación. Gracias por su apoyo.

## DEDICATORIAS

### **A Ximena:**

Por los momentos de risa, por ser una niña consiente y tolerante.

Por ser tan amorosa

Por ser amable y responsable.

### **A Andrea:**

Por ver la vida hacia adelante y sin detenerte

Por esos bellos cuentos y hermosos dibujos

Por tus grandes carcajadas y por todos esos seres que imaginas con gracia e inocencia.

Gracias hijas, por los momentos de felicidad que compartimos juntas y por decir todos los días lo mucho que nos queremos.

Gracias por existir

### **A Arturo:**

Gracias por tu amor

Por el gran apoyo para nuestra familia

Gracias por tus consejos para resolver los problemas en tiempos difíciles

Gracias por hacerme ver que la vida se vive solo una vez y que debemos ser optimistas.

**A María Paz Rico:**

Mi gran ángel, acompañándome siempre en todo

Gracias por enseñarme los grandes valores de la vida. Gracias por decirme como construir una familia.

Abuelita siempre vivirás en mi corazón.

**A Elvia Osornio:**

Por ser una guerrera en la vida.

Gracias por tu apoyo incondicional, sobre todo en este gran proyecto, mi doctorado.

Gracias mamá por compartir con nosotros cada día.



A mis queridos sobrinos: **Katya y Diego**

Por tener esa magia al cantar y tocar guitarra, en esas noches bajo las estrellas.

Por los fines de semana tan divertidos.

**A Silvia, mi hermana:**

Por ser una persona siempre alegre

Por apoyarnos cada vez que lo necesitamos

**A Javier:**

Por poder compartir nuestras familias. Gracias por tu apoyo

**A Don Manuel:**

Por apoyarnos en varios momentos de nuestras vidas

Por los días de risa

**A María:**

Por conservar ese gran imperio que mi abuelita formo: una gran familia.

Gracias Tía, por tu gran apoyo

**A cada uno de mis tíos y primos:**

Por los momentos de convivencia

A mis amigas:

**A Abi:**

Mi abejita, siempre volando hacia arriba en la vida y trabajando aún en circunstancias tan adversas. Eres mi máximo!!

**A Juanita:**

Por compartir momentos fáciles y momentos difíciles, tanto en la vida académica como personal. Gracias por todo.

**A Lupis:**

Porque la gran distancia que nos separa, es directamente proporcional a nuestra amistad. Por las grandes platicas (chal) que tenemos por lo menos una vez al año.

Amiga, gracias por tu gran apoyo

**A Sonia:**

Por todo una vida, por nuestra amistad de muchos años. Por la confianza.

Gracias por todo.

**A Lety:**

Por conservar nuestra amistad durante todo este tiempo. Gracias por todo.

**A mis compañeros de Neurología:**

Por compartir momentos agradables. Por nuestras colaboraciones. Por seguir unidos.

## ÍNDICE GENERAL

### ABREVIATURAS

### RESUMEN

### ABSTRACT

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	20
1.1. Antecedentes .....	20
1.1.1 Generalidades de talio.....	20
1.1.2 Usos del talio .....	21
1.1.3 Efecto de talio sobre la salud pública y el medio ambiente .....	21
1.1.4 Similitudes entre el mecanismo de acción del talio y el del potasio (K <sup>+</sup> ) .....	22
1.1.5 Especies reactivas de oxígeno (ERO) .....	24
1.1.6 Peroxidación de lípidos (PL) .....	26
1.1.7 Antioxidantes.....	26
1.1.8 ERO y mecanismos de mantenimiento de la homeostasis redox.....	32
1.1.9 Apoptosis.....	34
1.1.10 Excitotoxicidad.....	38
1.1.11 Receptores N-Metil-D-aspartato (NMDAr) .....	42
1.1.12 El MK-801, un antagonista de los NMDAr.....	44
1.1.13 Excitotoxicidad secundaria.....	46

1.1.14 Metales estrés oxidante y neurogeneración.....	49
<b>2. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>52</b>
<b>3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....</b>	<b>54</b>
<b>4. HIPÓTESIS.....</b>	<b>54</b>
<b>5. OBJETIVOS</b>	
5.1 Objetivo General.....	54
5.2 Objetivos particulares.....	55
<b>6. MÉTODOS.....</b>	<b>56</b>
6.1 Reactivos.....	56
6.2 Tratamientos y disección de regiones cerebrales.....	56
6.3 Estudio de conducta motora.....	59
6.4 Contenido de $TI^+$ en las diferentes regiones cerebrales de la rata.....	59
6.5 Peroxidación de lípidos (PL).....	60
6.6 Niveles de glutatión reducido (GSH).....	60
6.7 Actividad de glutatión peroxidasa (GPx).....	61
6.8 Determinación de proteínas (Lowry).....	62
6.9 Estudio morfológico: Tinción H-E.....	62
6.10 Determinación de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP)..	63
6.11 Inmunohistoquímica: Caspasa 3 y 9.....	63
6.12 Análisis estadístico.....	64
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>65</b>

7.1 La hiperactividad inducida por TI <sup>+</sup> es atenuada por la administración del antagonista de los NMDAr (MK-801).....	67
7.2 Análisis del contenido de talio en las diferentes regiones cerebrales.....	67
7.3 Peroxidación de lípidos (PL).....	69
7.4 Niveles de glutatión reducido en las diferentes regiones cerebrales (GSH).....	72
7.5 Actividad de glutatión peroxidasa (GPx).....	75
7.6 Estudio morfológico (Tinción H-E).....	76
7.7 Determinación de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP).....	76
7.8 Inmunohistoquímica para caspasa 3.....	77
7.9 Inmunohistoquímica para caspasa 9.....	78
<b>8. DISCUSIÓN.....</b>	<b>84</b>
8.1 Distribución diferencial del contenido de TI <sup>+</sup> en el cerebro de rata.....	84
8.2 El MK-801 atenúa el contenido de TI <sup>+</sup> en las diferentes regiones cerebrales.....	85
8.3 Las alteraciones motoras inducidas por TI <sup>+</sup> fueron atenuadas por MK-801.....	86
8.4 El MK-801 reduce el daño oxidante producido por TI <sup>+</sup> .....	87
8.5 La apoptosis producida por TI <sup>+</sup> disminuye por la administración de MK-801.....	88
8.6 El talio, la mitocondria y la excitotoxicidad.....	89

<b>9.</b>	<b>CONCLUSIÓN.....</b>	<b>93</b>
<b>10.</b>	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>94</b>
<b>11.</b>	<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>95</b>
<b>12.</b>	<b>PUBLICACIONES .....</b>	<b>96</b>

## ABREVIATURAS

• AMPA	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionato
• As <sup>2+</sup>	Arsénico
• APAF 1	Factor 1 activador de proteasa apoptótica
• Ca <sup>2+</sup>	Calcio
• CAT	Catalasa
• Ce	Cerebelo
• Cd <sup>2+</sup>	Cadmio
• Cx	Corteza
• Fe <sup>3+</sup>	Hierro
• GFAP	Proteína ácida glial fibrilar
• Glu	Ácido glutámico
• Gly	Glicina
• GSH	Glutación reducido
• GSSG	Glutación oxidado
• Gpx	Glutación peroxidasa
• ERO	Especies reactivas de oxígeno
• ERN	Especies reactivas de nitrógeno
• FADAD	Dominio de muerte asociado al receptor FAS
• HE	Hematoxilina-eosina
• H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
• Hp	Hipocampo
• Ht	Hipotálamo
• i.p.	intraperitonealmente
• K <sup>+</sup>	Potasio
• MeHg	metilmercurio
• Mg <sup>2+</sup>	Magnesio
• MK-801	Dizocilpina
• Mn <sup>2+</sup>	Manganeso
• MPP <sup>+</sup>	1-metil-4-fenil piridino
• Na <sup>+</sup>	Sodio
• NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
• NMDAr	Receptor N-metil-D-aspartato
• no-NMDAr	Receptores no NMDA
• NOS	Óxido nítrico sintasa
• 3-NP	Ácido 3-nitropropiónico

• $O_2^{\cdot-}$	Super óxido
• $OH^{\cdot}$	Radical hidroxilo
• ON	Óxido nítrico
• $Pb^{2+}$	Plomo
• PL	Peroxidación de lípidos
• RL	Radical libre
• S	Estriado
• SDH	Succinato deshidrogenasa
• SNC	Sistema nervioso central
• SOD	Super óxido dismutasa
• S.S.	Solución salina
• TNF	Factor de necrosis tumoral
• $Tl^+$	Talio
• $Zn^{2+}$	Zinc



## RESUMEN

El talio es un metal que a menudo se usa en la industria cementera, óptica, joyería, electrónica y fotografía. Es por lo tanto, un tóxico ambiental. Estudios *in vitro* e *in vivo* han mostrado que el ión talio ( $Tl^+$ ) produce cambios en las especies reactivas (ER) y en la peroxidación de lípidos (LP), y altera los sistemas de defensa antioxidante. Se conoce que el  $Tl^+$  ingresa al cerebro después de su administración sistémica a través de los canales de potasio para incrementar la excitabilidad neuronal, pero hasta ahora, la posible regla de la transmisión glutamatérgica en este evento no ha sido investigada. En este trabajo, se evaluó el efecto del pretratamiento con MK-801 (dizocilpina, conocido antagonista al NMDAr) sobre la toxicidad inducida por el acetato de talio (32 mg/Kg, 24 h) que induce LP, reducción de la actividad de glutatión (GSH), glutatión peroxidasa (GPx) y cambios en la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), así como en la actividad de caspasa 3 y 9 en diferentes regiones cerebrales de la rata: Corteza (Cx), cerebelo (Ce), hipocampo (Hp), hipotálamo (Ht) y estriado (S). La actividad motora fue estimulada por  $Tl^+$ . Los resultados mostraron que el MK-801 atenuó la LP inducida por  $Tl^+$  en el S, Hp y Ce, y se preservó el balance entre GSH/GSSG en algunas regiones. Los cambios de la actividad motora (movimientos horizontales) fueron atenuados por MK-801, el cuál disminuyó el GFAP, la inmunoreactividad de las caspasas 3 y 9 producida por el tóxico. Estos hallazgos sugieren que la transmisión glutamatérgica vía NMDAr podría estar involucrada en la modulación de la actividad redox en las regiones cerebrales las ratas después de la administración de  $Tl^+$ .

**Palabras clave:** Talio, NMDA, MK-801, Regiones cerebrales, Excitotoxicidad, GSH, Apoptosis, Peroxidación de lípidos, Actividad locomotriz.

## ABSTRACT

Thallium is a heavy metal often used in cement, optical items, jewelry, electronic and photographic industries. It is therefore, an environmental toxicant. *In vitro and vivo* studies have shown that thallium ion (Tl<sup>+</sup>) produces changes in reactive oxygen species (ROS) and lipid peroxidation, and alters antioxidant defense systems. It is known that Tl<sup>+</sup> can enter the brain after its systemic injection through potassium channels to increase neuronal excitation, but until now, the possible role of glutamatergic transmission in this event has been not investigated. In this work, we evaluated the effect of MK-801 (dizocilpine, a well-known N-methyl-D-Aspartate (NMDA) receptor antagonist) on thallium acetate (32 mg/Kg for 24 hours) induced lipid peroxidation, reduced glutathione (GSH), glutathione peroxidase (GPx) activity and changes in glial fibrillary acidic protein (GFAP), as well as caspase 3 and 9 activities in different rat brain regions: Cortex (Cx), cerebellum (Ce), hippocampus (Hp), hypothalamus (Ht) y striatum (S). Locomotor activity and several toxic endpoints were stimulated by Tl<sup>+</sup>. Our results show that MK-801 attenuated Tl<sup>+</sup>-induced lipid peroxidation in the S, Hp and Ce, and preserved the GSH/GSSH balance in some regions. Changes in locomotor activity (horizontal movements) were attenuated by MK-801, which also decreased the GFAP, caspase 3 and caspase 9 immunoreactivities produced by toxicant. Our findings suggest that glutamatergic transmission via NMDA receptors might be involved in the modulation of the regional brain redox activity altered by Tl<sup>+</sup> administration to rats.

**Keywords:** Thallium, NMDA, MK-801, Brain regions, Excitotoxicity, GSH, Apoptosis, Lipid peroxidation, Locomotor Activity,

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Antecedentes

#### 1.1.1 Generalidades de talio

El talio ( $Tl^+$ ) es un metal pesado que fue descubierto en 1861 por William Crookes; su nombre deriva de la línea espectral verde con la cual fue inicialmente identificado como elemento. Sus propiedades físicas y químicas se representan en la tabla 1 (Nriagu, 1998).

TABLA 1

PROPIEDADES	VALOR
Número atómico	81
Masa atómica	204.37
Afinidad electrónica	20
Punto de fusión (K)	577
Punto de ebullición (K)	1746
Densidad (g/cc)	11.85
Conductividad termal a 300K (W/mK)	46.1
Electronegatividad	$Tl^+$ 1.62 $Tl^{3+}$ 2.04
Radio atómico (Å)	1.704
Insaboro	
Inodoro	
Incoloro	

### 1.1.2. Usos de talio

A principios del siglo XX el  $Tl^+$  fue usado para el tratamiento de la sífilis, para reducir la sudoración nocturna de pacientes con tuberculosis y la malaria, así como raticida e insecticida a partir de 1920 y durante 25 años (Nriagu, 1998). Posteriormente como agente de depilación y como fungicida (Galván-Arzate y Santamaría, 1998).

En la actualidad, los iones de  $Tl^+$  muestran excelentes propiedades de resonancia magnética y se usa como una prueba para estimular funciones biológicas de iones alcalinos, específicamente de  $K^+$  y  $Na^+$ . El uso del  $Tl^{201}$  se introdujo a partir de 1970 para la imagen de perfusión de miocardio y en la detección de tumores (Otsuka et al., 2009; Pagnanelli y Basso, 2010).

Otros usos del metal incluyen la fabricación de joyería de fantasía, termómetros de baja temperatura, semiconductores, contadores de centello para cuantificación de radioactividad y en la fabricación de lentes (Melcher, 2000; Galván-Arzate y Santamaría, 1998).

### 1.1.3. Efecto de talio sobre salud pública y medio ambiente

El  $Tl^+$  es considerado como un metal más tóxico que el mercurio, el cadmio, el plomo, el cobre o el zinc, y es responsable de toxicidad accidental, ocupacional o ambiental en los humanos. Los principales síntomas producidos por este metal incluyen vómito, diarrea, pérdida de cabello y efectos en el SNC, corazón, hígado y riñón; estos síntomas se presentan dependiendo de la dosis del metal, pudiendo llegar a causar la muerte (Hammouri et al., 2011; Mulkey y Oehme 1993). Los

síntomas asociados a la intoxicación crónica por  $Tl^+$  incluyen anorexia, cefalea y dolor abdominal. En casos extremos también se observan alopecia y líneas blancas paralelas en las uñas conocidas como líneas de Mees (Lu et al., 2007).

Varios reportes describen los efectos de la contaminación por  $Tl^+$  en los grandes lagos de Canadá y Estados Unidos, y se ha encontrado que el metal está en altas concentraciones en tejidos de peces (Nriagu, 1998), y también en los ríos asociados a minas en China (Peter y Viraraghavan, 2005). El agua de riego que contiene  $Tl^+$  es llevada a la agricultura y las plantas, las cuales toman el metal por las raíces y el follaje. En la región Europea (Alemania, Republica Checa, Polonia y Francia) la concentración de  $Tl^+$  es de 0.5 mg/Kg en las plantas (Heim et al., 2002; Tremel et al., 1997), mientras que en China el rango de concentración del metal se encuentra entre 40 a 124 mg/Kg en los suelos (Xiao et al., 2004). Estas altas concentraciones del metal han provocado en la población humana de China un severo cuadro de talio-toxicosis por su ingesta a través del agua y las verduras contaminadas (Li et al., 2012).

En Japón los rangos de concentración de  $Tl^+$  son bajos en ríos (7.2 ng/L) y lagos (25.3 ng/L) (Miyazaki et al., 2012). En los estuarios de Inglaterra la concentración del metal en el sedimento es de 500  $\mu$ g/Kg, para macro algas es de 30  $\mu$ g/Kg, y el contenido de  $Tl^+$  en algunos invertebrados (poliquetos y moluscos bivalvos) es de 10  $\mu$ g/Kg, lo que evidencia un amplio monitoreo de dichas aguas (Turner et al., 2013).

Actualmente, en China se realizó un estudio (214 casos y 612 controles) para la medición de la concentración de  $Tl^+$  en la orina en mujeres embarazadas, la cual

se correlaciona con el bajo peso en los recién nacidos, considerado al metal como un factor de riesgo (Xia et al., 2015).

En Torreón, México, se determinó el contenido de  $Tl^+$  (2.1 ng / ml) y otros metales ( $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  y  $As^{2+}$ ) en orina (0.2  $\mu$ g/g creatinina) de niños y adolescentes. Los resultados mostraron que el aumento en la concentración de estos metales son un factor de riesgo en la población que habita cerca de la fundidora (García-Vargas et al., 2014; Zamoiski, 2014). A pesar de que México es un país minero, no se han realizado estudios que demuestren la existencia de contaminación ambiental debida al  $Tl^+$  en dichas zonas.

Por todo lo anterior, sería muy relevante monitorear las masas de agua que son dirigidas para consumo humano y para riego, debido a que al paso de los años se ha observado un incremento importante en la concentración de  $Tl^+$  en los ríos, estuarios y lagos cercanos a minas, generando intoxicación por el metal en los seres vivos.

A nivel ambiental, el  $Tl^+$  ha reflejado ser un factor de riesgo en la salud humana, por lo tanto es importante prevenir en nuestro país; el control de emisiones de fundidoras, considerando la gran movilidad y toxicidad del metal.

#### 1.1.4 Similitudes entre el mecanismo de acción del talio y el potasio ( $k^+$ )

El principal mecanismo para explicar la toxicidad de  $Tl^+$  hasta ahora es a través de la capacidad que tiene el metal para mimetizar a los iones de  $K^+$  debido a que éstos poseen la misma carga y un radio iónico similar, por lo que el  $Tl^+$  es capaz de atravesar las membranas celulares y acumularse dentro la célula tal como lo hace

el  $K^+$  (Tao et al., 2008; Mukey y Oehme, 1993; Favari y Mourelle, 1985). El  $TI^+$  puede reemplazar al  $K^+$  en la activación de enzimas como la piruvato cinasa y la ATPasa (Douglas et al., 1990); además, tiene gran afinidad por los grupos sulfhidrilo de las proteínas (Aoyama et al., 1988).

A nivel celular el  $TI^+$  produce daño a mitocondrias e incrementa la excitabilidad neuronal asociada, presentándose edema y alteración general de la integridad estructural de las mitocondrias, provocando así el mal funcionamiento de los procesos biológicos asociados a esta estructura tales como el déficit energético y el mal funcionamiento del metabolismo celular (Woods y Fowler 1986). La habilidad del  $TI^+$  de penetrar en la membrana mitocondrial interna (Korotkov et al., 2007) es la responsable de producir el edema y la alteración en la actividad de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial (Eskandari et al., 2015; Korotkov et al., 2008). Experimentos realizados en hepatocitos de rata en mostraron que el  $TI^+$  disminuye el potencial de membrana mitocondrial, además se observa proteólisis, formación de especies reactivas del oxígeno (ERO) y peroxidación de lípidos. Estos efectos llevan a inducir la apertura de poros de transición de permeabilidad mitocondrial (Eskandari et al., 2015; Pourahmad et al., 2010).

#### 1.1.5 Especies reactivas de oxígeno (ERO)

Los radicales libres (RL) se definen como moléculas u átomos que contienen uno o más electrones desapareados en orbitales atómicos o moleculares (Halliwell y Gutteridge, 1999). El electrón desapareado generalmente confiere un grado considerable de reactividad al radical libre. Los radicales derivados del oxígeno



representan la clase más importante de RL generados en las especies vivas. El oxígeno molecular (dioxígeno) tiene una configuración electrónica única y el mismo es un di-radical. La adición de un electrón al dioxígeno forma un radical anión súper óxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) (Miller et al., 1990). El súper óxido en condiciones de activación del oxígeno, o por procesos metabólicos dañinos, genera ERO “primarios” que al interactuar con otras moléculas producen ERO “secundarios” tanto directamente o por procesos catalizados, o bien por metales o enzimas (Valko et al., 2005).

La producción del radical súper óxido ocurre dentro de las mitocondrias celulares. El transporte de electrones mitocondriales es una parte importante del proceso para la generación de ATP en células de mamíferos. Durante la transducción de energía un número pequeño de electrones se libera y es captado por el oxígeno formando al radical súper óxido, el cual se encuentra implicado en la fisiopatología de una gran variedad de enfermedades (Kovacic et al., 2005). El súper óxido es producido por los complejos I y III de la cadena de transporte de electrones y puede dismutar mediante la enzima súper óxido dismutasa (SOD) produciendo al peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) que no es un RL, pero que se considera ERO porque de no ser neutralizado hacia agua por enzimas como la catalasa (CAT) o la glutatión peroxidasa (Gpx), puede recibir un electrón proveniente de un átomo de cobre o de hierro y generar al radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ) lo que se conoce como la reacción de Fenton.

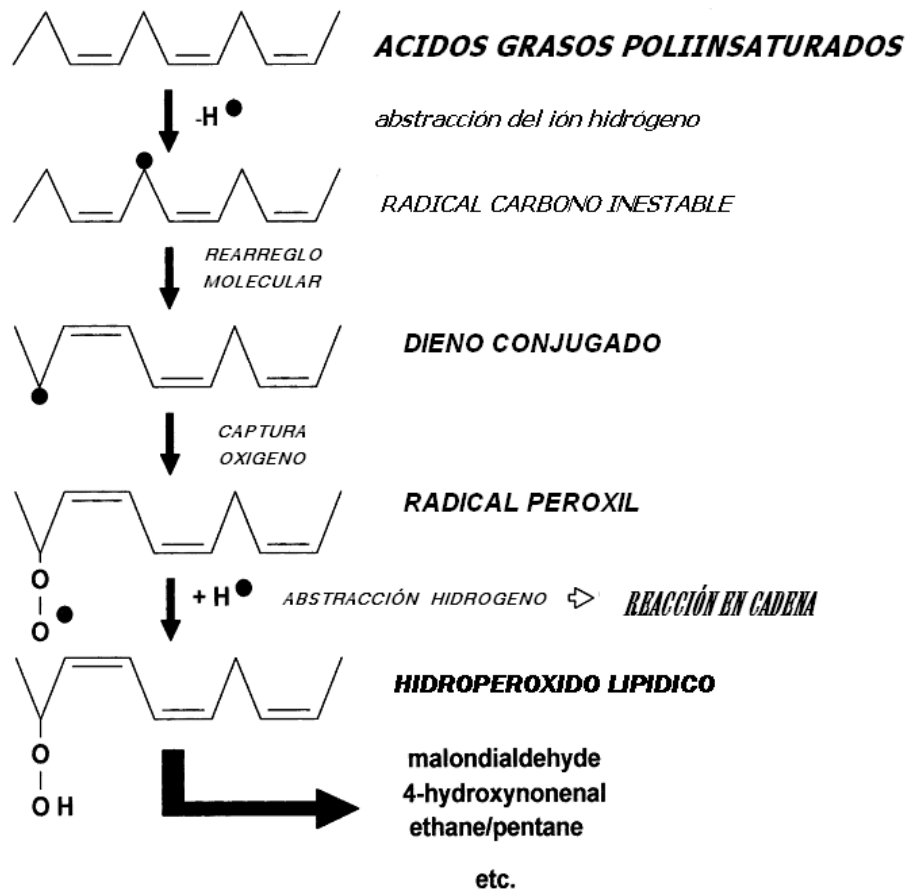
### 1.1.6 Peroxidación de lípidos (PL)

La peroxidación de lípidos (PL) es el daño que generan las ERO sobre las membranas y produce cambios en la organización de las membranas, pérdida funcional y modificación de proteínas que se encuentran inmersas en ella, implicando la patogénesis de varias enfermedades. Los productos de PL actúan sobre mediadores de la señalización redox. Así mismo, formas libres y ésteres de ácidos grasos poliinsaturados y colesterol son sustratos para la PL y son oxidados por mecanismos enzimáticos o no enzimáticos para originar varios productos (Niki et al., 2005).

La PL mediada por RL produce un mecanismo en cadena que inicia con un radical libre que oxida a los lípidos (Esquema 1). Los radicales libres implicados en este proceso son el radical hidroxilo ( $\text{OH}\cdot$ ), el peroxinitrito generado por la reacción de súper óxido más óxido nítrico y proviene de la irradiación de alta energía. También participan los radicales alcóxido formados por la descomposición de hidroperóxidos por iones de metales como proteínas hemo y cobre (reacción Haber-Weiss). El súper óxido y el óxido nítrico son producidos por enzimas como la NADPH oxidasa, la xantina oxidasa y la óxido nítrico sintasa (Niki, 2009).

Los mecanismos de la PL mediada por RL fueron estudiados por Porter y colaboradores (1995); las principales reacciones que participan en la PL son: 1) la abstracción de un hidrógeno de un carbono bisalílico de los ácidos grasos poliinsaturados para originar un radical de carbono centrado el cual se re-arregla para constituir un radical más estable cis, trans-pentadienil; 2) la adición de un oxígeno al radical pentadienil para originar un radical lipídico tipo peróxido; 3) la

liberación del oxígeno del radical peroxilo para dar oxígeno y radicales pentadienil, este último reaccionando rápidamente con el oxígeno para dar una forma trans; y 4) la adición intramolecular del radical peroxilo al doble enlace para formar productos bicíclicos tipo prostaglandinas (Esquema 2).



**ESQUEMA 1. PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS** (Halliwell y Gutteridge, 1999). La PL se divide en tres fases: iniciación, propagación y terminación. Iniciación: los radicales hidroxilos u oxígeno singulete reaccionan con los grupos metileno de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), formando los dienos conjugados, el hidroperóxido o el radical peroxilípido. La formación de dienos conjugados ocurre cuando un radical libre ataca a los hidrógenos del grupo metileno separando el doble enlace y conduciendo al re-arreglo de los enlaces. Los hidroperóxidos lipídicos pueden entrar a la reacción  $Fe^{2+}$  complejo + PUFA- OOH  $Fe^{3+}$  complejo +  $OH^-$  + PUFA- O. El radical peroxilípido es altamente reactivo y es capaz de propagarse en una reacción en cadena La fase de terminación consiste en la unión de dos radicales para finalizar la reacción.

El  $TI^+$  tiene un efecto promotor sobre la PL y la formación de ERO en diferentes tejidos y bajo diferentes esquemas de administración, así como en distintas especies animales, tanto en condiciones crónicas como subcrónicas (Hasan y Ali 1981; Brown et al., 1985; Aoyama et al., 1998; Galván-Arzate et al., 2000; Eskandari et al., 2015), por lo que la formación de ERO y la PL se consideran elementos de daño celular típicamente asociados a la disfunción celular y al envejecimiento, mientras que el  $TI^+$  es menos permeable en animales más viejos comparados con animales recién nacidos (Galván-Arzate y Ríos, 1994).

Se han identificado mecanismos intracelulares que favorecen la síntesis de los RL en concentraciones elevadas, tanto en condiciones fisiológicas como en presencia de alguna alteración patológica (Kehrer, 1993). El estrés oxidante es un desbalance entre las ERO/ERN y los sistemas antioxidantes que contienden con ellas, por lo que cuando hay estrés oxidante, los RL oxidan a las proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos, desestabilizándolos. El estrés oxidante es un evento nocivo que en ocasiones lleva a la célula a la muerte por una serie de estímulos tóxicos (Halliwell y Gutteridge, 1999).

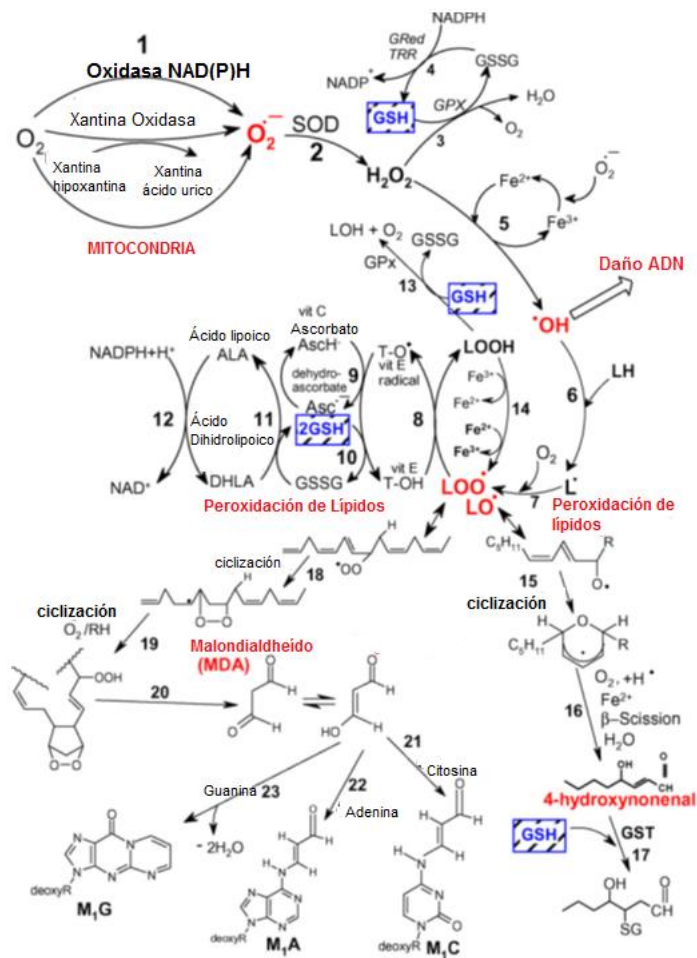
#### 1.1.7 Antioxidantes

Los mecanismos de defensa contra el daño inducido por RL involucran: 1) mecanismos de prevención; 2) mecanismos de reparación; 3) defensa fisiológica; y 4) defensa antioxidante. La defensa antioxidante enzimática incluye a las enzimas super óxido dismutasa (SOD), el GPx y catalasa (CAT). Los antioxidantes no enzimáticos son representados por el ácido ascórbico (Vitamina C), el  $\alpha$ -tocoferol

(Vitamina E), el GSH, los carotenoides, los flavonoides y otros (Winterbourn, 1995). Bajo condiciones normales, hay un balance entre las actividades y los niveles de estos antioxidantes (Masella et al., 2005).

El mayor antioxidante no enzimático y amortiguador celular es el tripéptido GSH. La forma oxidada de GSH es el GSSG o glutatión disulfuro. El GSH es altamente abundante en el citosol (1-11 mM), el núcleo (3-15 mM) y la mitocondria (5-11 mM), y es el mayor antioxidante soluble en estos compartimentos celulares. Para llevar a cabo la protección ante el daño por estrés oxidante es necesario que: 1) GSH actúe como cofactor de varias enzimas detoxificantes (por ejemplo la GPx y la glutatión transferasa; 2) GSH participe en el transporte de aminoácidos a través de la membrana plasmática; 3) GSH atrape al radical  $\cdot\text{OH}$  y promueva la detoxificación de peróxido de oxígeno y de peróxidos lipídicos por la acción catalítica de GPx; 4) GSH regenere importantes antioxidantes como las vitaminas C y E, regresándolos a su forma activa; y 5) GSH reduzca al radical tocoferol de la vitamina E directamente o indirectamente, vía reducción de semidehidroascorbato a ascorbato. La capacidad del GSH para regenerar los más importantes antioxidantes está ligada al estado redox de  $2\text{GSH} / \text{GSSG}$  (Valko et al., 2006; Pastore et al., 2003) (Esquema 2).

Estudios *in vitro* demuestran que el  $\text{Ti}^+$  (I y III) producen incremento tanto en el peróxido de hidrógeno mitocondrial como en las ERO, acompañados de una disminución en el contenido de GSH (Hanzel & Verstraeten 2006).



ESQUEMA 2. VÍAS DE FORMACIÓN DE ERO, PL, Y EL MECANISMO DE DEFENSA DE GSH Y OTROS ANTIOXIDANTES QUE INTERVIENEN EN EL ESTRÉS OXIDANTE (Tomado de Valko et al. 2006 (Ver texto)).

El  $\text{Ti}^+$  (6.4 mg/Kg i.p. por 5 días) en hígado produce un incremento en enzimas como: lactato deshidrogenasa, aspartato aminotransferasa,  $\gamma$ -glutamilttransferasa; en PL y estrés oxidante así como en enzimas antioxidantes, GSH, SOD y CAT. Estos efectos se ven revertidos por el pretratamiento del ajo y curcumina (Abdel-Daim y Abdou, 2015).

Galván-Arzate y colaboradores (2005) mostraron que el  $\text{Ti}^+$  administrado en un modelo in vivo en ratas a una sola dosis por 7 días produce una acumulación del mismo en las regiones cerebrales de una manera diferencial (estriado, hipotálamo y cerebelo), generando además daño peroxidante, y alternado los niveles de glutatión reducido y de la super óxido dismutasa cobre-zinc dependiente.

#### 1.1.8 ERO y mecanismos de mantenimiento de la “homeostasis redox”

La capacidad intracelular para mantener los niveles de agentes oxidantes-reductores, u “homeostasis redox”, es sostenida primariamente por el GSH y la tioredoxina (TRX). El cociente  $2\text{GSH}/\text{GSSG}$  representa el mayor amortiguador redox celular, y por lo tanto es un indicador representativo del ambiente redox de la célula (Dröge, 2002). Bajo condiciones de aumento del estrés oxidante, el contenido de GSSG incrementa, por lo tanto existe un aumento simultáneo de las proteínas disulfuro. Un número significativo de proteínas involucradas en la señalización que contienen tioles, tales como receptores para proteínas cinasas y algunos factores de transcripción, pueden ser alterados en su funcionamiento en condiciones de estrés.

La elevada tasa de cambio de GSH a GSSG y de TRX son mantenidos por la actividad de la GSH reductasa y de la TRX reductasa, respectivamente. GSH y TRX



existen en bajas concentraciones, pero cuando se presentan en altas concentraciones, puede contribuir significativamente a atrapar ERO (McEligot et al., 2005).

Tanto los metales redox, por su habilidad para generar RL, como los metales no redox, con capacidad de unirse a grupos tioles, se han implicado en carcinogénesis y daño celular (Valko et al., 2005). Por ejemplo, el hierro induce estrés oxidante y es determinante para producir cáncer de colon (Valko et al. 2001); ocupacionalmente, este metal produce un incremento en el riesgo de asbestosis, la segunda causa de cáncer de pulmón (Stayner et al. 1996). Por su parte, el aumento en la exposición ocupacional a cadmio ( $Cd^{2+}$ ) se ha asociado con un aumento en el estrés oxidante, el cual a su vez produce un aumento en cáncer (Santos et al., 2005). Estudios realizados por Valko y colaboradores (2005) demuestran que el  $Cd^{2+}$  por sí mismo es capaz de producir RL, y de forma indirecta puede causar daño a la expresión genética (por una proteína cinasa). Por otra parte, el cromo hexavalente es considerado un carcinógeno implicado en la excitotoxicidad asociada con la toxicidad mitocondrial/lisosomal generada por la formación de los RL (Pourahmad y O'Brien, 2001).

El ciclo celular está caracterizado por las fluctuaciones en el ambiente redox de la célula, mediado en particular por los cambios intracelulares en la concentración de GSH (Schafer y Buettner, 2001). Generalmente un ambiente reducido de la célula estimula la proliferación y un ligero cambio hacia el ambiente oxidante, iniciando la diferenciación celular. El cambio hacia un ambiente más oxidado en la célula lleva a la apoptosis o a la necrosis. La apoptosis está estrechamente relacionada con la

familia de genes Bcl-2. La familia Bcl-2 ejerce efecto tanto pro-apoptótico (Bax) como anti-apoptótico (Bcl-2) (Kluck et al., 1997). La expresión de Bcl-2 inhibe la liberación de citocromo c, y por lo tanto bloquea la activación de caspasas y los procesos apoptóticos. La liberación de citocromo c de la mitocondria se encuentra relacionada con la disminución de GSH, generando un ambiente más oxidado de la célula que contribuye a un desbalance entre la proliferación celular y la muerte celular (Kern y Kehrer, 2005; Schafer y Buettner, 2001). Esto podría ayudar a explicar porque la disminución de GSH intracelular es uno de los factores involucrados en la vía celular que lleva a la apoptosis.

#### 1.1.9 Apoptosis

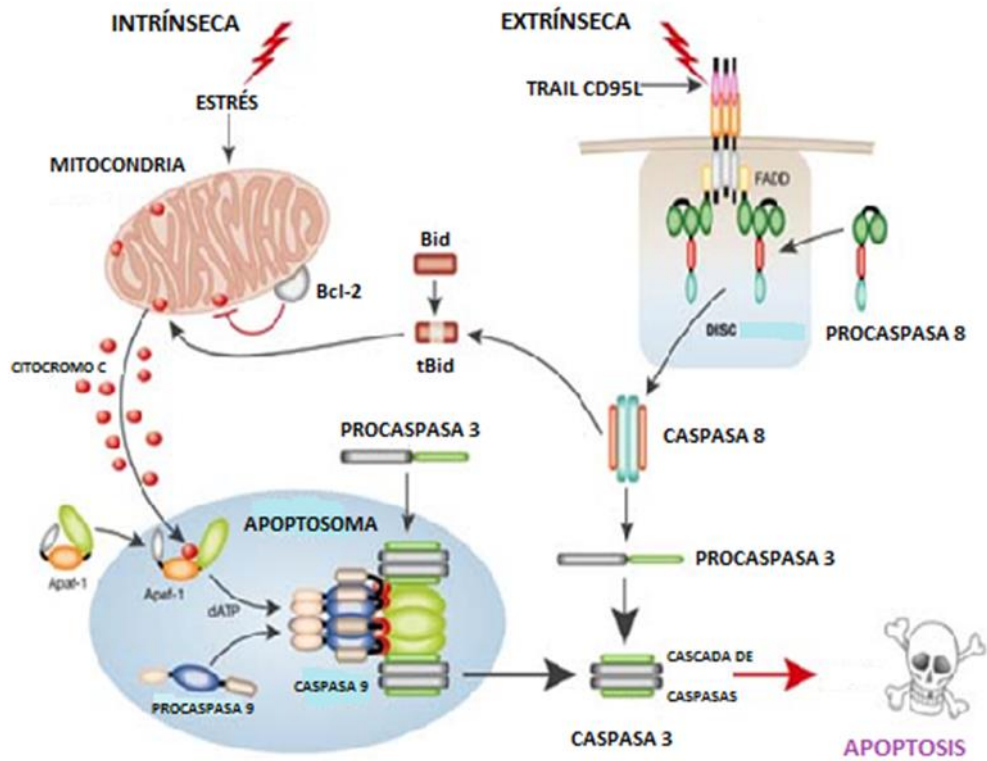
La muerte celular puede ocurrir por dos mecanismos principales: necrosis y apoptosis (Wyllie et al., 1980; Duke et al., 1996). La necrosis ocurre cuando las células son expuestas a condiciones fisiológicas extremas y se daña la membrana plasmática, comenzando con el deterioro de la célula al perder la capacidad para mantener la homeostasis celular, llevando así a un influjo masivo de agua y de iones extracelulares; el organelo más afectado en este proceso es la mitocondria y existe lisis en toda la célula debido a la alteración de la integridad de la membrana plasmática. La muerte celular por necrosis está comúnmente asociada al daño extensivo del tejido, produciendo una intensa respuesta inflamatoria.

La apoptosis, por su parte, es la muerte celular programada. Una célula apoptótica muestra alteraciones en la cromatina, en la condensación nuclear y citoplasmática, generando vesículas o cuerpos apoptóticos los cuales contienen

ribosomas, mitocondrias y material nuclear; estos cuerpos son reconocidos y fagocitados por macrófagos y células epiteliales adyacentes (Choi, 1992). La apoptosis en el cerebro es inducida por varios agentes tales como neurotransmisores, neurotoxinas, moduladores de la fosforilación de proteínas, y por la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  (Sastry y Rao, 2000). La apoptosis se lleva a cabo por dos vías: la vía extrínseca y la vía intrínseca, en ambos casos las proteínas ejecutoras son las caspasas. En la vía extrínseca se activa al receptor de muerte localizado en la superficie celular; en respuesta al factor de necrosis tumoral (TNF), a FAS ligado (FASL) y al ligando de inducción de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL), que al unirse a sus respectivos receptores (TNFR o FAS) resultan en una activación rápida de la caspasa iniciadora 8 posterior a su reclutamiento por un receptor trimerizado (DISC) a través de una molécula adaptadora del dominio de muerte asociado a FAS (FADD) o bien el dominio de muerte asociado al receptor de TNF (TRADD) (Imaizumi et al., 1999). En la vía intrínseca, la apoptosis inducida por estrés o por daño al ADN, resulta en el daño de la mitocondria y la liberación de proteínas asociadas a ella, como el citocromo c, del espacio intermitocondrial. La liberación del citocromo c de la mitocondria es regulada en parte por los miembros de la familia Bcl-2 con miembros anti-apoptóticos (Bcl-2/Bcl-x/Mcl1) y pro-apoptóticos (Bax, Bak y Bid) que inhiben o promueven su liberación, respectivamente. Una vez liberado el citocromo c, se une al factor 1 activador de proteasa apoptótica (APAF 1), lo cual resulta en la formación del apotosoma APAF 1-caspasa 9 y la consecuente activación de la caspasa de iniciación 9. La activación de las caspasas iniciadoras 8 y 9 activan a las caspasas efectoras 3, 6 y 7, las cuales son responsables de anclar los sustratos celulares

importantes, originando cambios bioquímicos y morfológicos asociados con la apoptosis (Danial y Korsmeyer, 2004; Kluck et al., 1997) (Esquema 3).

En estudios recientes en células PC12 de rata, se observó que el TI+ (I) produce apoptosis por la vía intrínseca mitocondrial dependiente de caspasas a través de la liberación de citocromo c, seguida de la activación de las caspasas 9 y 3 a las 12 y 24 h después de la administración del metal. El TI+ (I) produce además un incremento en el contenido total de Bcl-2 y la oligomerización de Bax entre las 3 y 6 h posteriores a su administración. Adicionalmente, el TI+ (III) causa un incremento de FAS a las 6 h, y posteriormente conduce a la activación de caspasa 8 a las 12 h por la activación de la vía extrínseca de apoptosis (Hanzel & Verstraeten 2009).



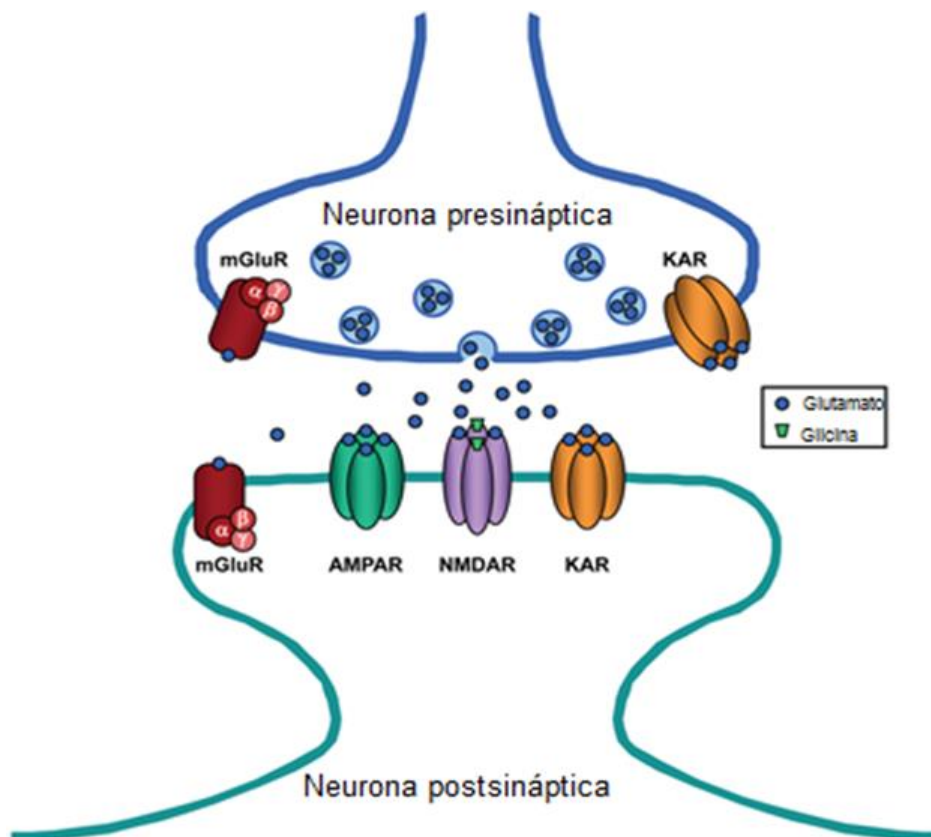
**ESQUEMA 3. PROCESO GENERAL DE APOPTOSIS.** Representación de las vías intrínseca y extrínseca de la apoptosis. Participación de la familia Bcl-2, procaspasas y caspasas (Danial y Korsmeyer, 2004).

Algunos compuestos y condiciones experimentales inducen apoptosis en las células del SNC, e incluyen factores neurotróficos, cambios en la concentración de  $K^+$ , agentes de daño a ADN y nucleósidos, efectos en la homeostasis de  $Ca^{2+}$ , péptidos y proteínas, estrés oxidante, óxido nítrico (ON), lípidos oxidados, irradiación, neurotoxinas y neurotransmisores, además de la excitotoxicidad (Sastry y Rao, 2000). Los neurotransmisores glutamato y NMDA producen apoptosis involucrando la entrada de  $Ca^{2+}$ , la producción de radicales libres y la activación de caspasas, lo cual establece una relación potencial entre el daño excitotóxico y la muerte celular apoptótica.

#### 1.1.10 Excitotoxicidad

Otro mecanismo de daño celular reportado en modelos neurotóxicos es la excitotoxicidad, la cual se define como la excesiva exposición de receptores neuronales a neurotransmisores excitadores, como el glutamato. La sobreestimulación de dichos receptores lleva a la célula al daño por excitación y a la muerte neuronal. El glutamato es el principal neurotransmisor excitador en el cerebro. Con base en la caracterización farmacológica de sus sitios de afinidad, existen tres clases de receptores glutamatérgicos asociados a canales iónicos (ionotrópicos): i) el receptor para AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionato), ii) el receptor para kainato, y iii) el receptor para NMDA. Entre todos éstos, los canales iónicos acoplados a los NMDAr son los únicos permeables a  $Ca^{2+}$  (Esquema 4). El daño neuronal excitotóxico es mediado en parte por una sobreactivación de NMDAr, lo cual resulta en un excesiva entrada de  $Ca^{2+}$  a través del

canal iónico asociado al receptor. Como consecuencia de la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  en el interior celular, la activación excesiva de NMDAR conlleva a la producción de ERO y la activación de otros procesos enzimáticos que contribuyen al daño celular (Hardingham, 2009; Lipton, 2006).



#### **ESQUEMA 4. DIFERENTES CLASES DE RECEPTORES A GLUTAMATO.**

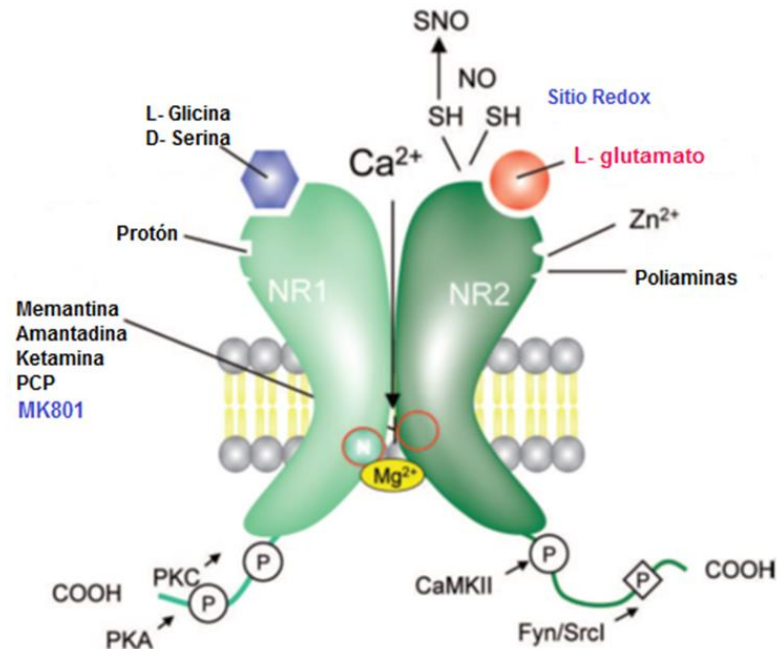
Receptores ionotrópicos: i) receptores a AMPA, ii) receptores a kainato, y iii) receptores a NMDA. También se muestran los receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G (Lipton, 2006).

Los NMDAr son canales iónicos que requieren de la activación simultánea de dos agonistas (glutamato y glicina). El canal requiere de la despolarización, para remover el magnesio que bloquea directamente al canal iónico de una manera dependiente del voltaje. El receptor es modulado por poliaminas de manera bifásica, que en concentraciones micromolares promueven la apertura del canal, incrementando la afinidad de los receptores para la glicina, así como la remoción del protón. Existen otros compuestos endógenos ( $Zn^{2+}$ , moduladores redox y óxido nítrico) que inhiben al NMDAr alostericamente a través de diferentes sitios (Benarroch, 2011) (Esquema 5).

El incremento en la actividad de NMDAr aumenta la permeabilidad a  $Ca^{2+}$  y  $Na^+$  por el desbloqueo del canal iónico por  $Mg^{2+}$ . En adición, existe un incremento dependiente de calcio-calmodulina de la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) que genera muerte celular excitotóxica (Dawson et al. 1991). La isoforma neuronal de la enzima comienza entonces un proceso de generación dependiente de óxido nítrico que actúa produciendo más ERO/ERN y origina daño celular oxidativo. Bajo condiciones normales en términos de transmisión sináptica, el canal iónico de NMDAr se abre por breves períodos de tiempo, permitiendo al  $Ca^{2+}$  moverse dentro de la célula para realizar sus funciones fisiológicas (estimulación excitatoria basal, procesos de memoria y aprendizaje, potenciación a largo plazo, etc.); sin embargo, bajo condiciones patológicas, la sobre-activación del receptor libera persistentemente al  $Mg^{2+}$  como bloqueador natural del canal iónico y causa una excesiva entrada de  $Ca^{2+}$  en la célula nerviosa, lo cual activa una variedad de procesos que pueden llevar a necrosis o apoptosis. Estos procesos incluyen sobrecarga de  $Ca^{2+}$  en la



mitocondria, resultando en la formación de radicales libres, activación de caspasas y liberación de factores de inducción de apoptosis (Lipton et al. 1993; Okamoto et al. 2002; Hara et al. 2005).



**ESQUEMA 5. SITIOS DE LOS NMDAR:** A) sitios extracelulares que incluyen a la glicina, sitios de unión de la subunidad NR1, sitio para el glutamato (Glu), sitio de unión sobre la subunidad NR2 y sitios de unión del poro del canal con  $Mg^{2+}$ . La D-serina es un co-agonista endógeno en el sitio de unión de L-glicina. NR2 contiene también sitios de acción para poliaminas, zinc y protones. B) Los blancos intracelulares incluyen moléculas de señalización como cinasas, fosfatasa y otras enzimas (Tomada de Benarroch 2011).

### 1.1.11 Receptores para N-Metil-D-aspartato (NMDAr)

El NMDAr está compuesto de tres subunidades: NR1, NR2 A-D y NR3 A-B. La composición de las subunidades está determinada por su farmacología y otros parámetros del complejo del canal iónico (Wollmuth & Sobolevsky 2004). Existen antagonistas farmacológicos que producen diferentes efectos colaterales en los animales, sugiriendo la heterogeneidad de los NMDAr en el cerebro. Tal heterogeneidad se ha confirmado durante el desarrollo, y anatómicamente se ha mostrado que los NMDAr cerebelares son menos sensibles a los agentes que producen el bloqueo de la apertura del canal, así como a agentes que bloquean competitivamente los sitios de unión a glutamato. En esta región predominan receptores con subunidades NR2C (Lynch y Guttman, 2001).

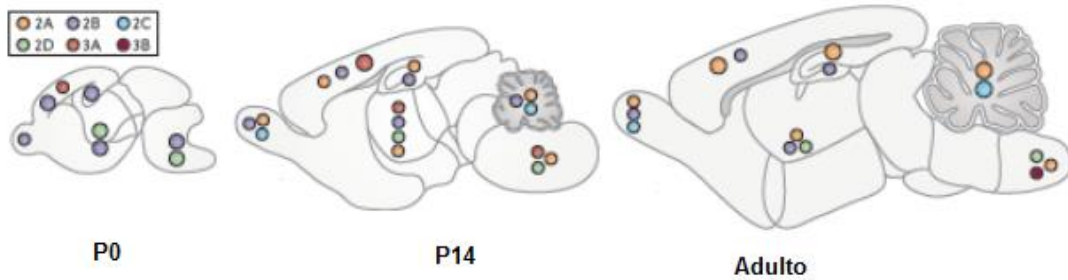
La subunidad NR1 se une a glicina, mientras que la subunidad de unión a glutamato es NR2 (Dingledine et al., 1999). En condiciones de excitotoxicidad, las subunidades de los NMDAr contribuyen diferencialmente, esto basándose en modelos de células transfectadas; los NMDAr que contienen los NR2A y los NR2B transportan grandes cantidades de calcio y son potenciados por la proteína cinasa C, alcanzando los niveles mayores de toxicidad. NR2C y NR2B producen menos entrada de calcio y son inhibidos por PKC, originando una menor toxicidad (Lynch y Guttman, 2002).

La acción de algunos metales sobre los NMDAr depende de la composición de las subunidades que lo conforman, produciendo más vulnerabilidad en algunas regiones cerebrales selectas. La distribución diferencial de las combinaciones de

subunidades de los NMDAr depende del desarrollo y la región cerebral; así las subunidades NMDAR1 y NMDR2 se expresan durante el desarrollo y permanecen hasta la etapa adulta en la corteza de la rata.

Por otro lado, la expresión de NMDAR2B inicia después del nacimiento y se incrementa a partir de 3 semanas de edad. En hipocampo, corteza y cerebelo, la combinación de NMDAR1 con la subunidad NMDAR2 se expresa en la etapa adulta (Sheng et al., 1994; Wafford et al., 1993). En el cerebelo, las subunidades NMDR1 y NMDAR2B se expresan en etapas tempranas del desarrollo, con una subsecuente reducción en la expresión de NMDAR2B y un incremento de NMDAR2C y NMDAR2A. En el cerebelo existen diferencias en el tipo de subunidades de acuerdo al tipo celular, presentándose NR1 en cuerpos celulares y dendritas de las células de Purkinje, y moderadamente en células granulares e interneuronas de Golgi. La subunidad NMDAR2A se encuentra moderadamente en células de Purkinje, pero para la subunidad NMDAR2B es mayor en los cuerpos de las células de Purkinje y está ausente en la capa granular (Paoletti et al., 2013; Thompson et al., 2000; Zukin y Bennett, 1995) (Esquema 6).

El daño funcional de los NMDAr ha llevado a desórdenes del SNC como isquemia, enfermedades neurodegenerativas, dolor, depresión y esquizofrenia. La hiperactividad y la hipofunción de NMDAr (definida por su composición y/o su localización sináptica) se encuentran diferencialmente involucradas en las enfermedades de SNC (Zhou y Sheng, 2013).



**ESQUEMA 6. DIVERSIDAD DE LAS SUBUNIDADES DEL NMDAR, ESTRUCTURA Y EXPRESIÓN.** Se han identificado 7 subunidades del NMDAR: NMDAR1, NMDAR 2A- NMDAR 2D, y NMDAR 3A y NMDAR 3B. Se esquematiza la expresión de subunidades NMDAR en el cerebro de ratón presentes en el día de nacimiento (P0), dos semanas después del nacimiento (P14) y en la etapa adulta (Tomada de Paoletti et al., 2013).

#### 1.1.12 El MK-801, un antagonista de los NMDAR

Un potente antagonista de los NMDAR es el MK-801 (dizocilpina), un bloqueador no competitivo que actúa de manera directa sobre el poro del canal asociado al receptor. La capacidad neuroprotectora del MK-801 en modelos experimentales permite inferir una acción mecánica de bloqueo más directa sobre estas entidades por su alta afinidad sobre los mismos (Volbrach et al., 2006). Por ejemplo, el tratamiento neonatal con MK-801 muestra un severo daño en el aprendizaje en campo abierto; sin embargo, en etapa adulta, el antagonista no produce tal daño y la posible explicación a estas diferencias es la sensibilidad a los

NMDAr, la cual es mayor entre 2 y 4 semanas después del nacimiento en comparación con la etapa adulta (Kawabe et al., 2007).

La administración de MK-801 como modelo de esquizofrenia durante el periodo temprano postnatal muestra cambios tanto de conducta como neuroquímicos (Lim et al., 2012). Una actividad elevada se correlaciona con los síntomas positivos en esquizofrenia y podría ser representativo de una hiperactividad del sistema dopaminérgico mesolímbico. Sin embargo, otro reporte muestra que no existen diferencias entre MK-801 y el control (Gorter et al., 1992).

Existe controversia con respecto al efecto protector del MK-801, encontrando que las diferencias radican en las dosis y el régimen de tratamiento; el rango de dosis de 0.3-10 mg/kg provee una protección del daño y una reducción de los cambios histológicos en la isquemia cerebral. El volumen de infarto se redujo hasta un 30% por el antagonista a dosis de 2.5 y 5 mg/kg (Moyanova et al., 2007; O'Neill et al., 2000).

El MK-801 (2 mg/Kg) ha mostrado ser un agente neuroprotector, disminuyendo el efecto inflamatorio producido por trauma de la columna vertebral en el ratón, la destrucción axonal y la desmielinización en el sitio del trauma, confirmando los efectos neuroprotectores del antagonista (Esposito et al., 2011). En el modelo de infarto por oclusión de la vena cerebral, el MK-801 (3 mg/Kg, i.p. 20 min posterior a la oclusión) protege del daño cerebral en el estriado y la corteza (Selakovic et al., 2010).

El MK-801 también tiene efecto protector en el cuerpo estriado de la rata después de la administración de metales como el  $Mn^{2+}$ . Este metal induce

excitotoxicidad, incrementado las concentraciones de Glu y la disminución de la actividad de la glutaminasa (Xu et al. 2010). El MK-801 también ha mostrado reducir el daño producido por el  $Pb^{2+}$  sobre la potenciación a largo plazo en hipocampo (Gilbert y Lasley, 2007).

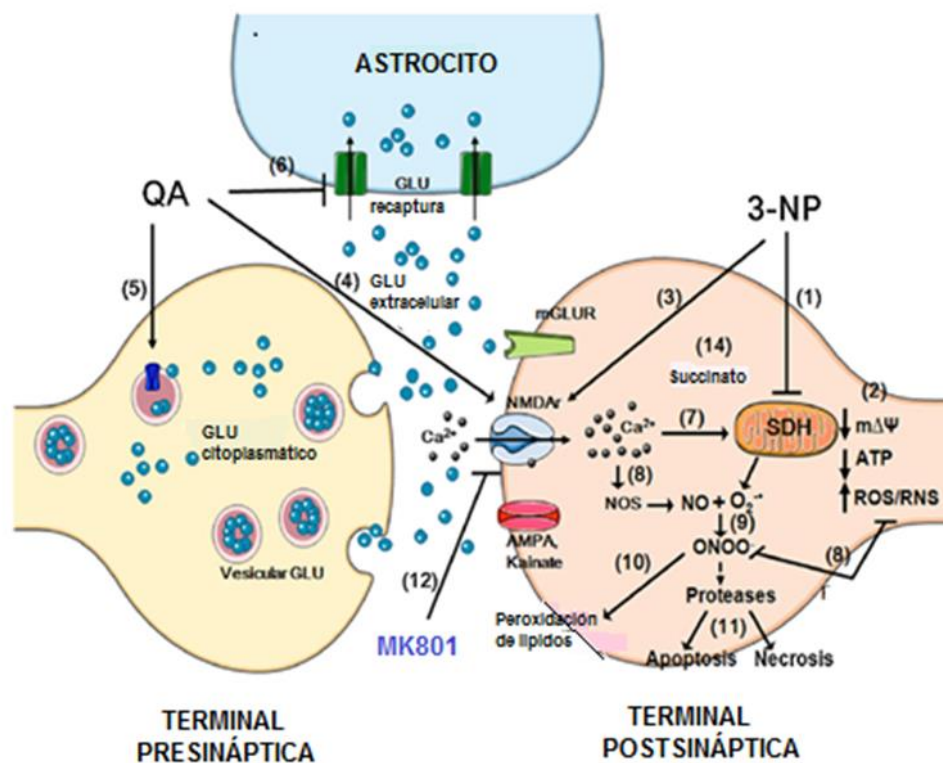
En un modelo de la enfermedad de Huntington, el ácido 3-nitropropionico (3-NP) produce disminución de los niveles de ATP, el potencial de membrana mitocondrial y la activación de calpaina, los cuales se restablecen por la administración de MK-801 en cultivo primario de hipocampo (Nasr et al., 2003).

#### 1.1.13 Excitotoxicidad secundaria

Situaciones de déficit de energía, la disponibilidad reducida de ATP y la ATPasa  $Na^+/K^+$  de la membrana plasmática no pueden mantener el potencial de membrana en reposo. Una despolarización parcial genera entonces hipersensibilidad a los agonistas de NMDAr. En concentraciones bajas de glutamato, esto podría llevar a un incremento del influjo de  $Ca^{2+}$  y muerte celular. Defectos en la mitocondria incrementan la entrada de  $Ca^{2+}$  a través de NMDAr como resultado de la pérdida del potencial de membrana, llevando a una mayor desregulación de  $Ca^{2+}$  (Jacquard et al., 2006) (Esquema 7).

Las toxinas mitocondriales como el 1-metil-4-fenilpiridinio ( $MPP^+$ ), inhibidor del complejo I y el 3-NP, inhibidor de la succinato deshidrogenasa o complejo II, son agentes que inhiben la cadena de transporte de electrones de la mitocondria y producen degeneración neuronal excitotóxica secundaria *in vivo* (Beal et al., 1993; Pérez-De la Cruz y Santamaría, 2007). El MK-801 atenúa las lesiones estriatales

producidas por MPP<sup>+</sup> y 3-NP (Schulz et al., 1996; Pérez-De la Cruz y Santamaría, 2007).



**ESQUEMA 7. PROCESO DE EXCITOTOXICIDAD SECUNDARIA** (Colle et al. 2012). (1) Bajas concentraciones de 3-NP inducen inhibición del complejo II (SDH) de la cadena respiratoria mitocondrial que conlleva a la disminución de ATP, disminución del potencial de membrana mitocondrial ( $m\Delta\Psi$ ) y un incremento de ERO/ERN (2). El déficit de energía hace a las neuronas más vulnerables a los niveles basales de glutamato endógeno (glu, "excitotoxicidad secundaria"). Esto lleva a la despolarización de la membrana plasmática, liberando el  $Mg^{2+}$  del canal de los NMDAr dependientes de voltaje (3). La apertura de los canales de los NMDAr causa la entrada de  $Ca^{2+}$  (8). Además la generación de ERO/ERN podría inducir LP (10). Estos procesos llevan a la activación de proteasas induciendo la apoptosis o necrosis (11). El bloqueo de los NMDAr por MK-801 (12) puede atenuar la disfunción mitocondrial y la muerte neuronal. El succinato, como precursor, podría atenuar la disfunción mitocondrial inducida por 3-NP (14).



#### 1.1.14 Metales, estrés oxidante y neurodegeneración

Existen metales que son cruciales para mantener la homeostasis celular. Entre los 23 elementos que se conocen para las funciones fisiológicas en humanos, se encuentran 12 metales entre los que destacan el  $Mn^{2+}$  y  $Fe^{3+}$ . Sin embargo, una cantidad excesiva de estos metales lleva a condiciones patológicas, incluyendo la neurodegeneración. De igual manera, la exposición a metales que no realizan funciones biológicas, como  $Pb^{2+}$ , Hg,  $Mg^{2+}$  y  $Tl^+$ , produce estrés oxidante, particularmente en la mitocondria. Sin embargo, los blancos para producir este estrés son distintos al del  $Fe^{3+}$ , un potente pro-oxidante que puede iniciar un conjunto de reacciones que forman productos extremadamente reactivos tales como  $OH\cdot$ . El  $Mn^{2+}$  puede oxidar a la dopamina generando ERO y afectando la función mitocondrial, llevando a la acumulación de sus metabolitos y culminando en la producción de estrés oxidante (Farina et al., 2013).

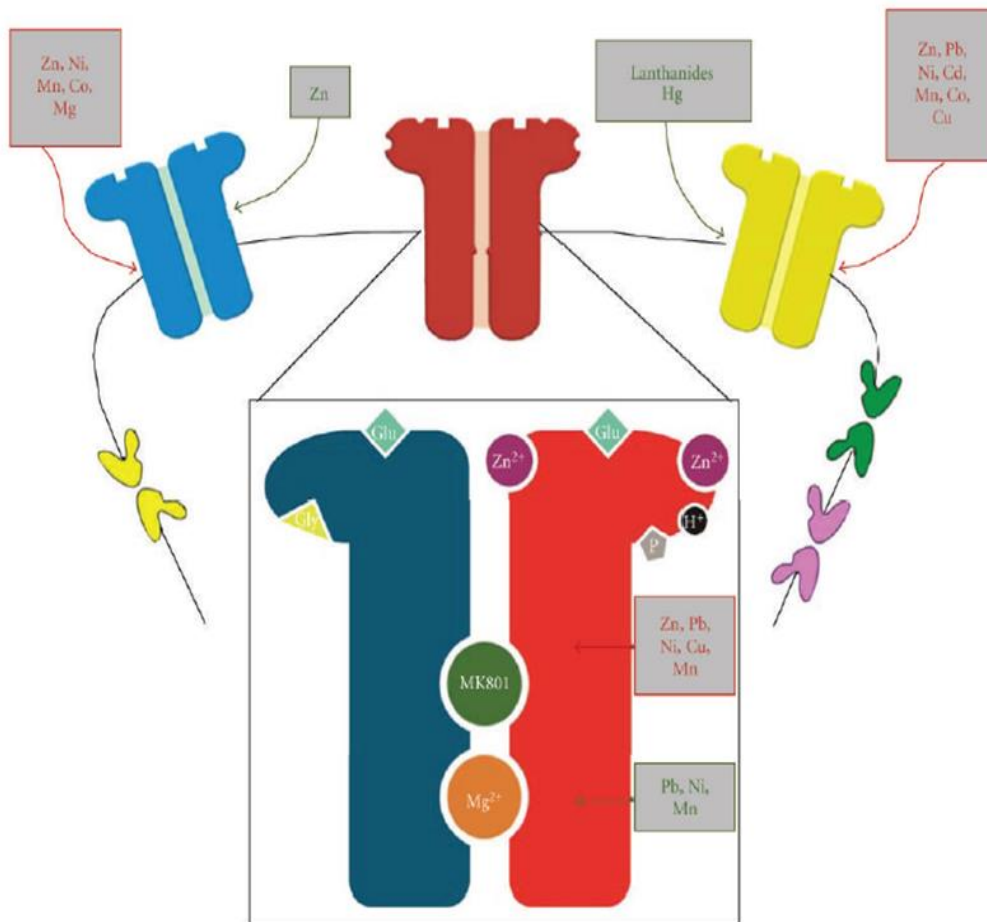
Omelchenko y colaboradores (1997) demostraron que la vulnerabilidad de los NMDAr al  $Pb^{2+}$  depende específicamente de la composición de sus subunidades. El  $Pb^{2+}$  puede producir tanto potenciación como inhibición, dependiendo de la composición de la subunidad del receptor y de la concentración del metal. El  $Pb^{2+}$  afecta a los receptores NMDAR1 y NMDAR2A en hipocampo, y la alteración de los componentes de PSD durante el desarrollo cerebral (Nihei y Guilarte, 2001; Marchetti, 2003). El  $Pb^{2+}$  inhibe también las corrientes de los NMDAr; la inhibición es específica en el canal del receptor y el bloqueo es independiente del voltaje. Los estudios bioquímicos sugieren que los efectos inhibitorios del metal sobre los NMDAr fueron específicos de la edad y la región cerebral, siendo el hipocampo el más

sensible. Los NMDAr inhibidos por  $Pb^{2+}$  son NR1-NR2A y NR1-NR2B (Sadiq et al., 2012).

El Hg catiónico tiene fuerte afinidad por los grupos sulfhídrico, afectando a las moléculas que contienen tioles protéicos (receptores de neurotransmisores, transportadores y enzimas antioxidantes), así como tioles no protéicos (GSH y cisteína). Las ERO/ERN se incrementan por la toxicidad del Hg, involucrando diferentes mecanismos como el estrés oxidante, la disfunción mitocondrial, la excitotoxicidad, el incremento de  $Ca^{2+}$  intracelular y la disminución de antioxidantes (Farina et al., 2011, 2013).

El  $Mg^{2+}$  extracelular inhibe la respuesta de NMDAr sobre los potenciales de membrana, incrementado la afinidad de la glicina en las neuronas, el bloqueo dependiente del voltaje y la potenciación independiente de la glicina de la subunidad específica (Sadiq et al., 2012).

Xu et al. (2010) mostraron que el pre-tratamiento con MK-801 protege a las neuronas de la excitotoxicidad inducida por  $Mn^{2+}$ . La interacción del metal con GSH muestra estrategias para incrementar los niveles de GSH para proteger de la toxicidad del metal (Kaur et al., 2006).



**ESQUEMA 8. METALES NEUROTÓXICOS.** Los NMDAr presentan sitios moduladores para glicina (gly, amarillo),  $Zn^{2+}$ , glutamato (glu) principalmente. Estos receptores se encuentran constituidos por heterómeros NMDAR1 y NMDAR2 cada uno con distintas subunidades. En el esquema el brazo azul representa la subunidad NMDAR1 y en rojo la subunidad NMDR2. La mayoría de los metales tienen su efecto en la subunidad NMDR2. (Tomado de Sadiq et al., 2012)

## 2. JUSTIFICACIÓN

Siendo el  $Tl^+$  un metal altamente neurotóxico que se encuentra disponible a través de diferentes fuentes de exposición, y dado que poco se ha investigado sobre sus posibles mecanismos de toxicidad, las aproximaciones experimentales para caracterizar su modo de acción son relevantes desde diversos puntos de vista. Aunque algunos mecanismos potenciales, tales como el estrés oxidante, han sido caracterizados por diversos grupos incluyendo el nuestro, aún no existe la certeza de que éstos sean los mecanismos primarios de acción. En los últimos años, sin embargo, los estudios sobre el  $Tl^+$  se han enfocado de manera específica al daño apoptótico, estudiando las diferentes vías que lo generan, dependiendo del estado redox del metal. En este sentido, la señalización pro-apoptótica, si bien puede ser otro mecanismo que favorezca la toxicidad, aún no se sabe su grado de contribución al patrón primario de daño. Es importante señalar en este punto que el  $Tl^+$  produce síntomas como vómito, diarrea, pérdida de cabello y efectos en el SNC, corazón, hígado y riñón; en la población humana con una sola dosis y que dichos síntomas son variables y dependen de la dosis ingerida y el tiempo de exposición. Aún conociendo algunos posibles mecanismos de acción del  $Tl^+$ , no existe un tratamiento adecuado para los síntomas que se producen, debido en gran medida a la falta de conocimiento sobre sus mecanismos tóxicos. Por esto es importante realizar estudios en relación con dichos mecanismos tóxicos primarios y su potencial prevención, y correlacionarlos con diferentes marcadores de daño, ya sean conductuales, bioquímicos, morfológicos, etc. Por lo anterior, en este trabajo propusimos caracterizar el posible componente excitotóxico que este metal puede generar, pues

se sabe que al inhibir la función mitocondrial, las células nerviosas pueden evocar daño excitotóxico secundario por despolarización asociada a activación de receptores glutamatérgicos para NMDA sensibles a voltaje. La característica de excesiva excitabilidad ya es inherente al daño generado por el metal, pero sin haberse estudiado procesos excitotóxicos vinculados a transmisión glutamatérgica exacerbada, por lo que en nuestra propuesta empleamos herramientas farmacológicas para evidenciar este proceso aún no reportado en la literatura. Nuestros estudios se realizaron en diferentes regiones cerebrales de ratas expuestas al  $Tl^+$  por 24 h, empleando MK-801 como un fármaco típica y selectivamente ligados a la inhibición de NMDAr, para diseccionar este componente tóxico en dicho paradigma. Para llevar a cabo este propósito, en este trabajo se emplearon diferentes técnicas espectrofotométricas (UV-visible y de fluorescencia) para los análisis bioquímicos, pruebas conductuales, histológicas e inmunohistoquímicas para determinar con diferentes criterios la viabilidad de nuestra hipótesis. Los resultados, por lo tanto ayudarán a la comprensión del mecanismo de acción del metal y podrán servir para desarrollar agentes terapéuticos que ayuden en evitar la toxicidad por  $Tl^+$ .

### **3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Será el talio capaz de generar un daño excitotóxico secundario producido por la despolarización asociada a los NMDAr sensibles a voltaje, en las diferentes regiones cerebrales de la rata?

### **4. HIPÓTESIS**

Si el TI es un metal que produce efectos excitotóxicos y el antagonista MK-801 promueve mecanismos protectores entonces en el modelo de daño inducido por la administración de TI<sup>+</sup> el antagonista disminuirá la toxicidad a través de diferentes marcadores

### **5. OBJETIVOS**

#### 5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto protector del antagonista del receptor NMDA (MK-801) en los marcadores de daño en el modelo de toxicidad inducido por TI<sup>+</sup> en diferentes regiones cerebrales en ratas.

## 5.2 Objetivos particulares

- a) Determinar los cambios conductuales (patrones de motricidad) bajo el esquema de administración de los diferentes tratamientos incluido el  $TI^+$
- b) Observar los cambios morfológicos en las diferentes regiones cerebrales de rata (hipocampo, hipotálamo, cerebelo, corteza frontal y cuerpo estriado) bajo los mismos esquemas de tratamiento
- c) Evaluar la acumulación del metal en las diferentes regiones cerebrales
- d) Estimar los niveles de daño oxidante asociados a daño neuronal y producidos por  $TI^+$  en presencia de los tratamientos y en las diferentes regiones cerebrales
- e) Cuantificar la actividad de algunos componentes del sistema de protección antioxidante en respuesta al estrés oxidante producido por  $TI^+$  en presencia de MK-801.
- f) Caracterizar los efectos de los tratamientos sugeridos sobre los procesos de muerte celular apoptótica inducidos por  $TI^+$  en el cerebro de la rata

## 6. MÉTODOS

### 6.1 Reactivos

Los reactivos utilizados en este trabajo fueron mayoritariamente obtenidos de Sigma-Aldrich (México) y de otras casas comerciales. Para inmunohistoquímica, los anticuerpos fueron de DAKO (Agilent Technologies; Dinamarca).

### 6.2 Tratamientos y disección de regiones cerebrales

Se utilizaron ratas Wistar macho de 250-280 g de peso (provistas por el bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía MVS). Los animales se mantuvieron en cajas de acrílico (5 por caja) y con alimento (purina, St. Louis, MO, USA) y agua *ad libitum*. Las ratas fueron mantenidas en condiciones de temperatura constante ( $25 \pm 3^\circ\text{C}$ ), humedad ( $50 \pm 10\%$ ) y ciclo luz: oscuridad (12:12). Los experimentos se realizaron de acuerdo a los estándares mexicanos éticos 065-ZOO-1999.

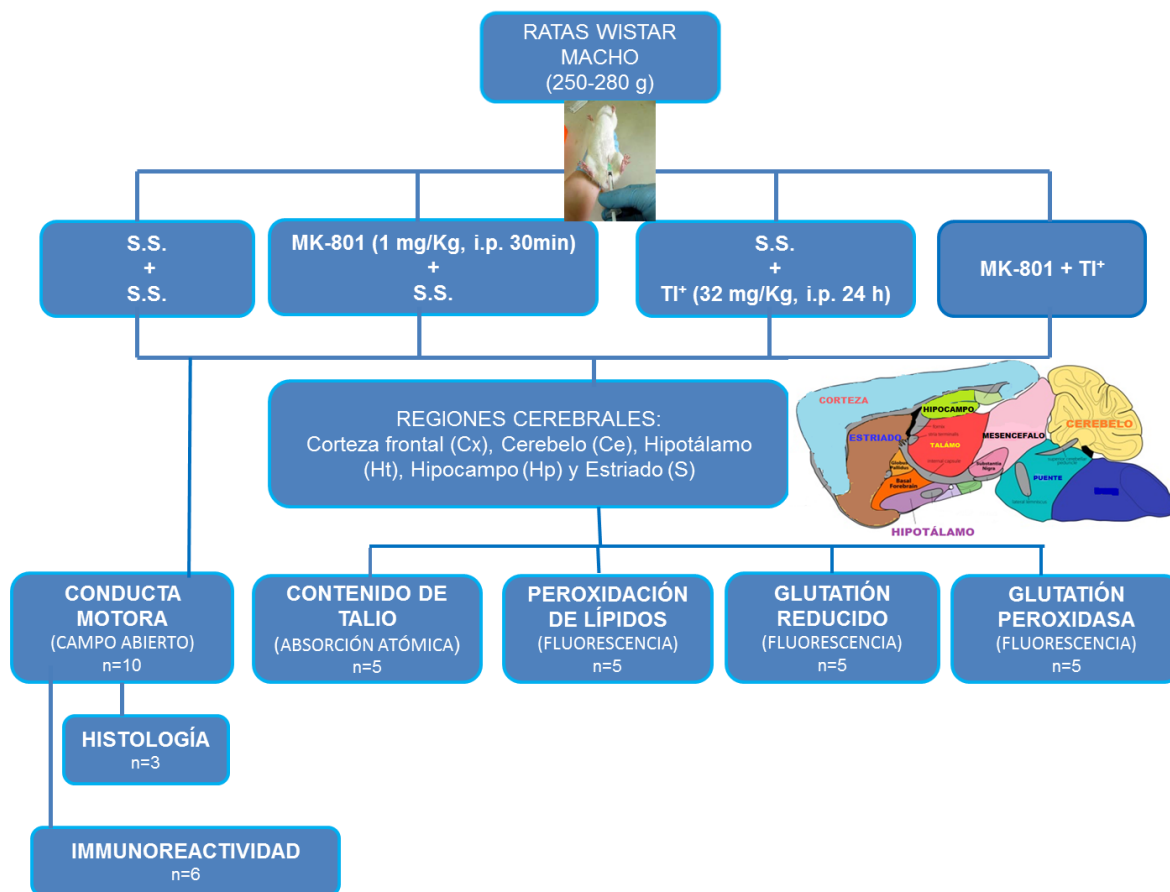
Las ratas se dividieron en cuatro grupos:

- a) Grupo control (S.S. + S.S.): las ratas se administraron dos veces con salina estéril intraperitonealmente (i.p.) con un intervalo de 30 min.
- b) Grupo de  $\text{TI}^+$  (S.S. +  $\text{TI}^+$ ): Los animales recibieron una primera administración con S.S. seguida 30 min después de  $\text{TI}^+$  (acetato de talio a una dosis de 32 mg/Kg;  $\text{LD}_{50}$ ; i.p.; (Ríos y Monroy-Noyola, 1992).
- c) Grupo MK-801 (MK-801 + S.S.): Las ratas fueron administradas i.p. con una dosis del antagonista a NMDAr, el MK-801, a una dosis de 1 mg/Kg y 30 min después se administró S.S. (Sencer et al., 2008).
- d) Grupo MK-801 +  $\text{TI}^+$ : Los animales recibieron MK-801 30 min antes de la administración de  $\text{TI}^+$ ; i.p.



Las dosis de los fármacos empleados corresponden a dosis efectivas probadas en otros modelos (Sencer, 2008). El tiempo de sacrificio después de la última administración fue de 24 h. Se extrajeron los cerebros y se disecaron cinco regiones cerebrales (Galván-Arzate y Ríos, 1994): Corteza (Cx), Cerebelo (Ce), Hipotálamo (Ht), Hipocampo (Hp) y estriado (S).

## DISEÑO EXPERIMENTAL



### 6.3 Estudio de conducta motora

Los animales de cuatro grupos diferentes fueron sometidos a un estudio de motricidad en un equipo de actividad motriz automatizado de campo abierto Versamax (Accus Scan Instruments Inc. Columbus, OH, USA) que detecta actividad horizontal y vertical. Los experimentos se llevaron a cabo entre las 6:00 a.m. y la 1:00 pm. La actividad motora fue monitoreada en una caja transparente (45 cm x 45 cm x 25 cm). La interrupción de los haces de luz debido a los movimientos de las ratas fueron automáticamente registrados. Las ratas fueron previamente habituadas por un período de tiempo corto (15 min) a las condiciones del cuarto. Los animales fueron colocados en el centro de la caja y la evaluación se realizó por 60 min, registrando cada 5 min. Las dos variables analizadas fueron movimientos horizontales y verticales. El estudio se realizó justo antes de sacrificar a los animales para los estudios bioquímicos (Galván-Arzate et al., 2005).

### 6.4 Contenido de $Tl^+$ en las diferentes regiones cerebrales de la rata

Posterior a los cuatro tratamientos y la observación de conducta, cinco animales de cada grupo experimental se utilizaron para el análisis del contenido de metal. Las regiones cerebrales de la rata fueron obtenidas y digeridas en 0.5-1.0 ml de  $HNO_3$  concentrado supra puro y posteriormente se analizaron en un equipo de absorción atómica con horno de grafito AA 600 Perkin-Elmer (Waltham, Massachusetts, USA) con un automuestreador (AS 800) y una lámpara de cátodo hueco (longitud de onda 276 nm y apertura 0.7 nm) con flujo continuo de argón (10

ml/min). Los resultados fueron expresados como  $\mu\text{g}$  de  $\text{Ti}^+$  por gramo de tejido húmedo (Ríos et al., 1989).

#### 6.5 Peroxidación de lípidos (PL)

Bajo el mismo esquema de tratamiento, las regiones cerebrales fueron pesadas y se les agregó 3 ml de solución salina para homogenizarlas (6 golpes). Se agitó el homogenado y se agregó 1 ml por duplicado a 4 ml de una solución de cloroformo-metanol (2:1). Se agitó en el vortex por 5 seg y se dejó en hielo por 30 min. Posteriormente para su lectura, se eliminó la fase blanca por aspiración, se tomó 1 ml de la solución y se agregó 100  $\mu\text{l}$  de metanol. Quince minutos antes de leer, se preparó quinina a 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  como estándar. La lectura se realizó en un espectrofotómetro Perkin-Elmer a longitudes de onda de excitación 370 nm de emisión 430 nm y con apertura de 15 nm. Los resultados se expresan como unidades de fluorescencia/g de tejido/ml de extracción (Triggs & Willmore 1984).

#### 6.6 Niveles de glutatión reducido (GSH)

El GSH es el principal antioxidante endógeno no enzimático en el SNC. Medir sus niveles constituye un buen marcador de estrés oxidante cuando éstos disminuyen por algún insulto tóxico. Esto se evaluó de acuerdo con lo descrito por Hissin y Hilf (1976).

Las diferentes regiones cerebrales obtenidas se homogenizaron en 3.75 ml de buffer de fosfatos-EDTA (pH 8.0) + 1 ml de  $\text{HPO}_3$  (25%). Se centrifugaron a 3,000 x

g por 15 min y el sobrenadante se separó. Quinientos  $\mu$ l de sobrenadante se agregaron a 4.5 ml de buffer de fosfatos + 100  $\mu$ l OPA. Las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente por 15 min y la señal fluorescente se analizó por espectrofotometría de fluorescencia a 420 nm de emisión y 250 nm de excitación en un equipo Perkin-Elmer LS 50B. Los resultados se expresaron como  $\mu$ g de GSH por mg de proteína (la proteína se cuantificó por el método de Lowry).

#### 6.7 Actividad de glutatión peroxidasa (GPx)

La actividad de GPx fue determinada usando un método basado en la oxidación no enzimática de GSH (Hafeman et al., 1974; Galván-Arzate et al., 2005). Las regiones cerebrales de rata fueron homogenizadas en buffer de fosfatos (pH 7.4). Las alícuotas (30  $\mu$ l) fueron incubadas a 37° en un buffer de fosfatos (pH 7.0) que contenía una mezcla de 0.5 ml GSH (2.0 mM) + 0.5 ml EDTA (0.4 mM) + 0.25ml azida de sodio ( $\text{NaN}_3$ , 0.01 M) + 0.75 ml de agua; se agregó 15  $\mu$ l de muestra (región cerebral homogenizada en buffer en relación de 1 g de tejido en 9 ml de buffer). Se incubaron con agitación por 5 min a 37° C. Posteriormente se agregó 1 ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1.25 mM; precalentado a la misma temperatura) y se incubó con agitación por 3 min a 37° C. De esta mezcla se tomó 1 ml y se agregó 4 ml de ácido metafosfórico. Las muestras se centrifugaron a 3,500 rpm por 15 min. Un mililitro de sobrenadante se mezcló con 1 ml de buffer de fosfatos (pH 7.0) y 0.5 ml de ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB). La absorbancia se midió después de 2 min a 512 nm en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 20. Una curva estándar fue construida usando concentraciones conocidas de GSH + buffer de fosfatos/EDTA+DTNB. Una

unidad de actividad se definió como el 50% de disminución de GSH por 60 min después de que la disminución de la reacción no enzimática de GSH ha sido sustraída. Los resultados se expresaron como unidades de actividad por mg de proteína.

#### 6.8 Determinación de proteínas (Lowry)

Cada muestra (por duplicado) se diluyó 1:20, se tomó 50  $\mu$ l muestra + 950  $\mu$ l de agua. Se tomaron 400  $\mu$ l y se agregaron 2 ml de la siguiente mezcla: 49 ml de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2 % en NaOH (0.1N), 0.5 ml de tartrato de sodio y potasio al 2 %, 0.5 ml de  $\text{CuSO}_4$  al 1 %. A los 10 min se agregaron 0.2 ml de Folin (1:1 agua). Las muestras se leyeron en un espectrofotómetro UV/Visible a 550 nm después de 30 min a temperatura ambiente (Lowry et al., 1951).

#### 6.9 Estudio morfológico: Tinción H-E

Inmediatamente después de terminado el estudio conductual, 3 animales de cada grupo experimental se perfundieron vía intracardiaca y su tejido cerebral fue fijado en paraformaldehído para su posterior procesamiento histológico. En cortes de las diferentes regiones cerebrales propuestas, se realizó histología básica con Hematoxilina/Eosina para reconocer cuerpos celulares, así como inmunohistoquímica contra la Proteína Glial Fibrilar Acídica (GFAP) para evidenciar la gliosis reactiva (Heffes et al. 1995).

#### 6.10 Determinación de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP)

Los cerebros fueron fijados en 4% de paraformaldehído (1 semana), embebidos en parafina y cortados (5  $\mu$ m). Las secciones fueron inmunohistoquímicamente marcadas y la parafina fue removida en una serie de xilenos y alcoholes graduales, las secciones fueron embebidos tres veces en PBS, posteriormente, se incubaron en una solución al 1% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 min) para remover la peroxidasa endógena. Después fueron lavadas tres veces con PBS e incubadas con una solución de citrato de sodio (pH 6) por 30 min. Las secciones fueron incubadas con albúmina de bovino, para bloquear la inmunoreactividad no específica. Después de dos lavados con Tris e incubados con el anticuerpo primario monoclonal proteína acídica fibrilar glial (GFAP, DAKO, dilución 1:00). Anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano (DAKO-Kit).

#### 6.12 Inmunohistoquímica: caspasa 3 y 9.

Para la inmunohistoquímica, los tejidos se fijaron en paraformaldehído al 4%. Los bloques se embebieron en parafina y cortados a 5  $\mu$ m de grosor. Las secciones fueron marcadas inmunohistoquímicamente y desparafinadas en series de xileno y grados diferentes de alcohol; posteriormente se lavaron tres veces en PBS y se incubaron en una solución de peróxido de hidrógeno al 1 % por 10 min. Se incubaron en 10  $\mu$ M de citrato de sodio (pH 6.0) por 30 min y de nuevo se lavaron con PBS. Las secciones se incubaron con albúmina de suero bovino al 1 % por 20 min, lavada con TRIS e incubada a 4°C. El TRIS contenía al anticuerpo monoclonal de la GFAP (DAKO, 1:00). Las secciones se examinaron por microscopía de luz en un

microscopio Leica Galen III con videocámara digital acoplada a una PC Windows 2000 para procesamiento de imágenes.

### 6.13 Análisis estadístico

Los datos se expresaron como media  $\pm$  SEM. La evaluación estadística fue a través de una t-student pareada y análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de la prueba de Tukey, asumiendo una distribución normal. El nivel mínimo de significancia aceptado fue de  $P < 0.05$ . Cada dato representa la medición de 10 (estudio de actividad motora) ó 5 ratas (estudios bioquímicos) por tratamiento.

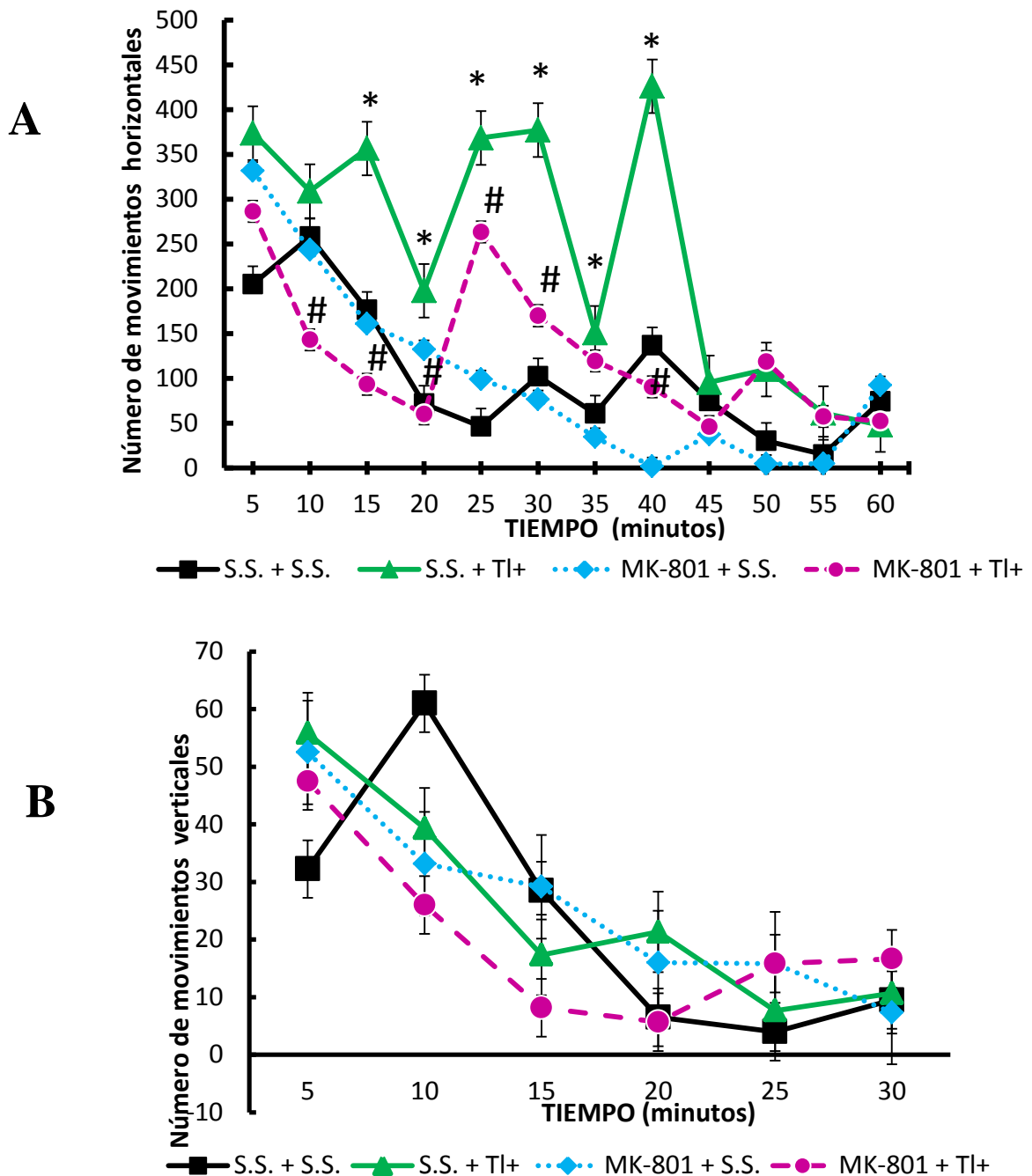


## 7. RESULTADOS

7.1 La hiperactividad inducida por  $TI^+$  es atenuada por la administración del antagonista de los NMDAr (MK-801)

La actividad horizontal evaluada 24 h después de la administración de  $TI^+$  (1 h de observación, 32 mg/Kg, i.p.) mostró un incremento a partir de los 5 min y hasta los 45 min en comparación con el grupo control; posterior a este tiempo no se observaron diferencias significativas. En el grupo que se administró con MK-801 (i.p., 1 mg/Kg) + S.S., comparando con el grupo control, no se generaron cambios estadísticamente significativos. Pero si se compara el grupo de S.S. +  $TI^+$  con el grupo de MK-801 +  $TI^+$ , los movimientos horizontales disminuyeron significativamente, llegando a los niveles basales en el número de movimientos (Figura 1A).

En relación a los movimientos verticales, no se observaron cambios estadísticamente significativos entre los grupos evaluados (Figura 1B).



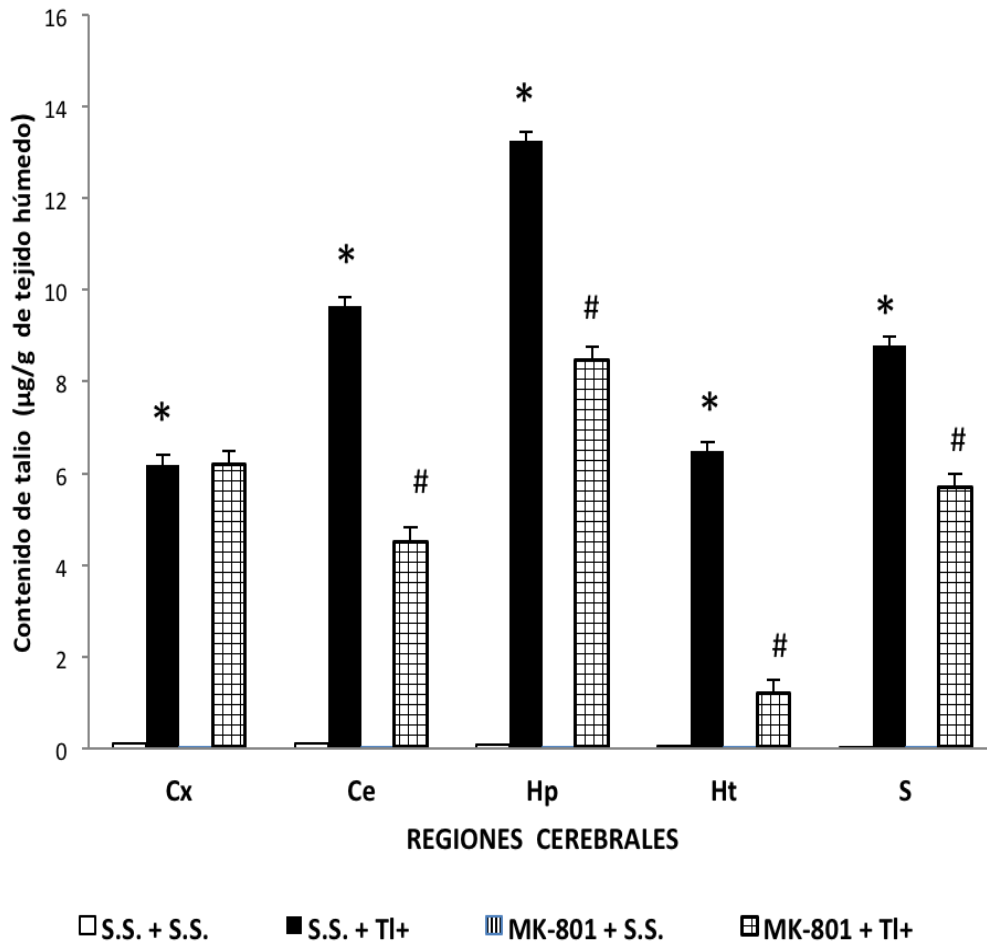
**Figura 1.** Protección motora por el pretratamiento con MK-801 (1 mg/Kg, i.p., 30 min) sobre la intoxicación por talio (TI<sup>+</sup>, 32 mg/Kg, i.p., 24h). Los animales se colocaron en campo abierto para el registro de los movimientos horizontales (A) y verticales (B) cada 5 min durante un total de 60 min. Los datos son expresados como la media  $\pm$  E.E. (n=10 por grupo). ANOVA seguido de la prueba de Tukey con una diferencia significativa de \* $p < 0.05$ . El grupo S.S. +S.S. (línea con cuadros) y #  $p < 0.05$  representan las diferencias significativas con el grupo de S.S. + TI<sup>+</sup> (línea con triángulos).

## 7.2 Análisis del contenido de talio en las diferentes regiones cerebrales

Como era de esperarse, los grupos S.S. + S.S. y MK-801 + S.S, que no fueron tratados con  $Tl^+$ , no registraron presencia del metal. La distribución de  $Tl^+$  en el cerebro de la rata ocurrió de manera diferencial en las regiones cerebrales, obteniéndose el siguiente orden para el contenido del metal: hipocampo > cerebelo > estriado, seguido de hipotálamo y corteza, comparado con el grupo control. En las ratas administradas con MK-801 +  $Tl^+$ , en comparación con el grupo S.S. +  $Tl^+$ , la concentración del metal se atenúa en todas las regiones estudiadas, excepto en Cx. El orden de disminución fue Ht (82%), Ce (53%), Hp (36%) y S (35%) (Figura 2).

De acuerdo con los resultados obtenidos el  $Tl^+$  no solo podría tener alta afinidad por la ATPasa  $Na^+/K^+$  por tener un radio y valencia similar a  $K^+$ , sino que al parecer, como otros metales, posiblemente contribuya a la activación indirecta del canal de los NMDAr y favorezca el daño producido por el incremento de  $Ca^{2+}$ , pero al verse bloqueados los receptores NMDA por su antagonista el MK-801, probablemente se prevenga la misma entrada de  $Tl^+$ .

Se ha demostrado que el  $Tl^+$  se distribuye de manera diferencial en regiones cerebrales (Galván-Arzate 2005), dependiendo de las dosis usadas, así como de la edad en la cual se administra el metal. Por su parte, Wanger (2012) mostró que la distribución de  $Tl^+$  también depende del tiempo en el cual se administra el metal: mientras que a tiempos cortos (5 min) se distribuye más en regiones como el bulbo olfatorio y las áreas corticales en la capa II/III y V, a las 24 h la distribución del metal es mayor en caudoputamen e hipocampo, comparado con la corteza, siendo confirmado en nuestros resultados.



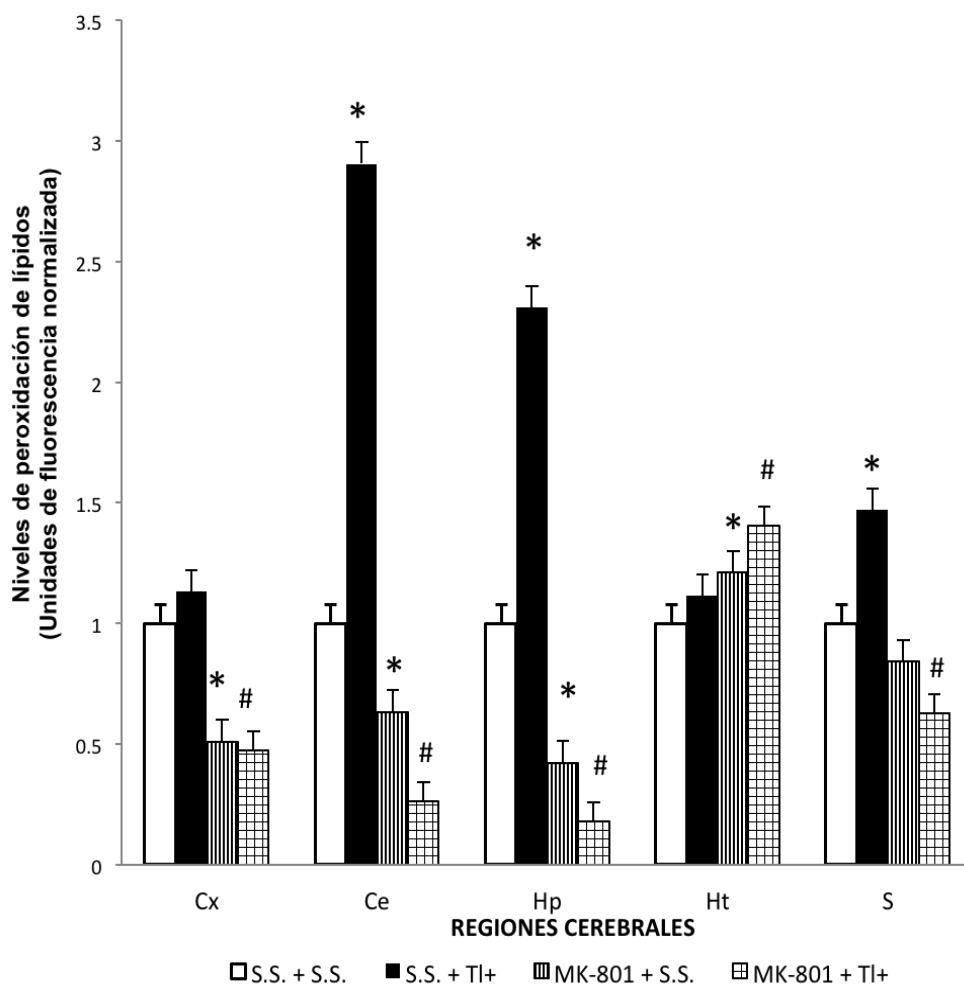
**Figura 2.** Concentración de  $TI^+$  en las diferentes regiones cerebrales. Se administró una sola dosis de  $TI^+$  (32 mg/Kg, 24 h, i.p.). Las regiones cerebrales fueron corteza (Cx), cerebelo (Ce), Hipocampo (Hp), Hipotálamo (Ht) y estriado (S). Las regiones fueron analizadas por espectrometría de absorción atómica. Los datos son expresados como la media  $\pm$  E.E. con una  $n = 5$  experimentos independientes. \* $p < 0.05$  representa la significancia contra el grupo control (S.S.). #  $p < 0.05$  es la diferencia entre el grupo de S.S. +  $TI^+$  y el antagonista de los NMDAr (MK-801, 1 mg/Kg, i.p. 30 min). La prueba estadística fue análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguida de la prueba de Tukey-Kramer.

### 7.3 Peroxidación de lípidos (PL)

La peroxidación de lípidos (PL) se determinó en las diferentes regiones cerebrales como un índice de daño oxidante de los lípidos. Los niveles de PL se calcularon en unidades de fluorescencia por mg de proteína; sin embargo, los resultados se normalizaron para hacer más objetiva la comparación entre regiones y los efectos farmacológicos. Bajo las mismas condiciones experimentales empleadas en este estudio, el  $Tl^+$  (grupo S.S. +  $Tl^+$ ) incrementó significativamente la PL en Ce (190 %), Hp (130 %) y S (50%), siendo las tres regiones las que presentaron la mayor concentración del metal. Mientras que en Ht y Cx no hubo cambios significativos en este marcador. En el pre-tratamiento con MK-801 en el modelo de intoxicación por  $Tl^+$ , en comparación con el grupo administrado solo con el metal, la PL disminuyó en Hp (95 %), Ce (91 %), Cx (67 %) y S (61 %), mientras que en Ht no se observó un cambio significativo, aunque si se registró un incremento en el grupo MK-801 + S.S. (39%) (Figura 3).

El  $Tl^+$  afecta el complejo II mitocondrial (SDH), el cual activa una disminución de ATP y del potencial de membrana mitocondrial, incrementando la producción de ERO. El déficit de energía hace que las neuronas sean más vulnerables a los niveles basales de glutamato endógeno (excitotoxicidad secundaria). Nuestra propuesta en este trabajo es que estos cambios llevan a la despolarización de la membrana plasmática, donde los NMDAr son sensibles a voltaje, por lo que el  $Mg^{2+}$  podría liberarse, permitiendo la entrada masiva de  $Ca^{2+}$  intracelular a través de los canales acoplados al receptor. El MK-801, al ser el antagonista de los NMDAr, evita la entrada de este ión y podría prevenir el daño excitotóxico. Probablemente debido a

esto, el MK-801 (administrado 1 mg/Kg y 30 min antes de administrar el  $\text{TI}^+$ ) disminuyó la PL comparada con el grupo control. Algunos estudios han demostrado la protección de MK-801 en diferentes modelos neurodegenerativos, y al parecer el MK-801 *per se* solo evita la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , pero además cuando se administra  $\text{TI}^+$ , la disminución fue mayor en tres regiones: Ce, Hp y S (regiones que además mostraron mayor peroxidación y mayor concentración de  $\text{TI}^+$ ).



**Figura 3.** El MK-801 disminuye la peroxidación de lípidos inducida por TI<sup>+</sup> en diferentes regiones cerebrales. Las ratas fueron administradas con solución salina (S.S.) o MK-801 (1 mg/Kg, i.p. 30 min) antes de la administración del metal (32 mg/Kg, i.p.) o S.S. como vehículo. Veinticuatro horas después se disecaron las regiones cerebrales: corteza (Cx), cerebelo (Ce), Hipocampo (Hp), Hipotálamo (Ht) y estriado (S). Las regiones fueron analizadas por fluorescencia. Los datos fueron expresados como la media  $\pm$  E.E. con una n = 5 experimentos independientes. \*p < 0.05 representa la significancia con el grupo control (S.S.), # p < 0.05 diferencias significativa con el grupo de SS+ TI<sup>+</sup>. La prueba estadística fue análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguida de la prueba de Tukey-Kramer.

#### 7.4 Niveles de glutatión reducido en las diferentes regiones cerebrales de la rata (GSH)

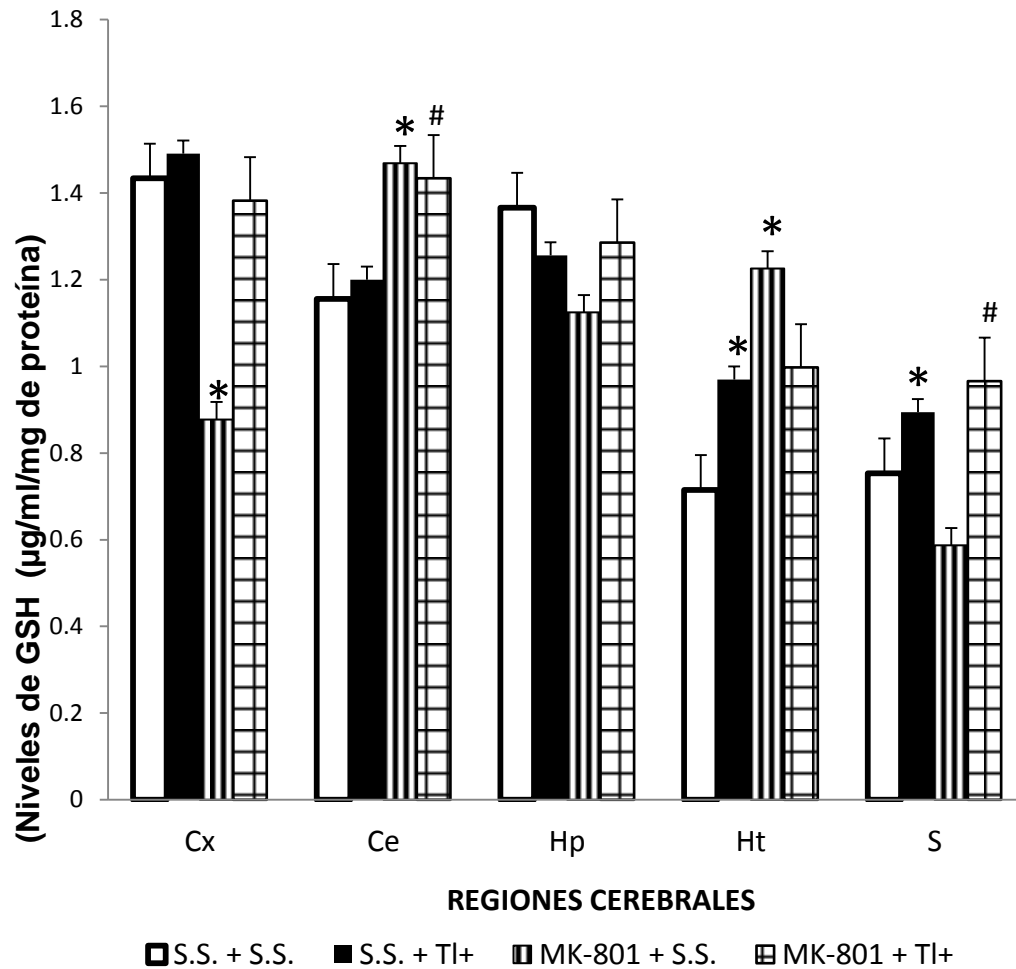
Los niveles de GSH, no mostraron diferencias significativas en las regiones cerebrales en presencia de  $Tl^+$ , en comparación con el grupo control, excepto en Ht donde se observó un incremento del 43%. El grupo MK-801 +  $Tl^+$  no modificó los niveles de GSH regional comparado con el grupo con  $Tl^+$  (S.S. +  $Tl^+$ ). En las regiones cerebrales como Hp (21 %), S (34 %) y Cx (40 %), se redujo considerablemente el nivel de GSH en el grupo MK-801 + S.S. comparado con el grupo control. Sin embargo, en Ht (28 %) y Ce (77 %), los niveles de GSH se incrementaron. Estos efectos podrían sugerir mecanismos compensatorios y adaptativos para preservar la homeostasis de GSH en la regulación de la vía redox (Figura 4).

En relación a la interacción  $Tl^+$  - GSH, ésta ha mostrado generar estrategias para incrementar los niveles de GSH para proteger el daño inducido por el metal, de manera similar a como lo haría el metilmercurio (MeHg) (Kaur et al., 2006; Shanker, 2005), mientras que estudios *in vitro* e *in vivo* se ha demostrado la disminución de GSH como un aspecto crucial para mantener la homeostasis redox (Dringen et al., 2005; Farina et al., 2013). Kaur et al (2006) observaron que los efectos tóxicos del MeHg sobre el GSH fueron diferenciales sobre las neuronas en comparación con los astrocitos cerebelares. Esto apoya el concepto de que la disminución de GSH incrementa la concentración intracelular de MeHg en ambos tipos celulares, y por lo tanto influye en la generación de ERO. La diferencia del estatus celular de GSH provee una posible explicación para las diferencias de toxicidad neuronal y astrogial inducida por MeHg, lo cual establece que la modulación de los niveles de GSH



efectivamente cambia la concentración de MeHg y aumenta el riesgo de estrés oxidante inducido por el metal. Así, la disminución de GSH incrementa la acumulación de MeHg y aumenta el estrés oxidante inducido por el metal, y contrariamente, la suplementación con el precursor de GSH protege del daño a la exposición de MeHg *in vitro*. Algo similar podría estar ocurriendo con el  $TI^+$ .

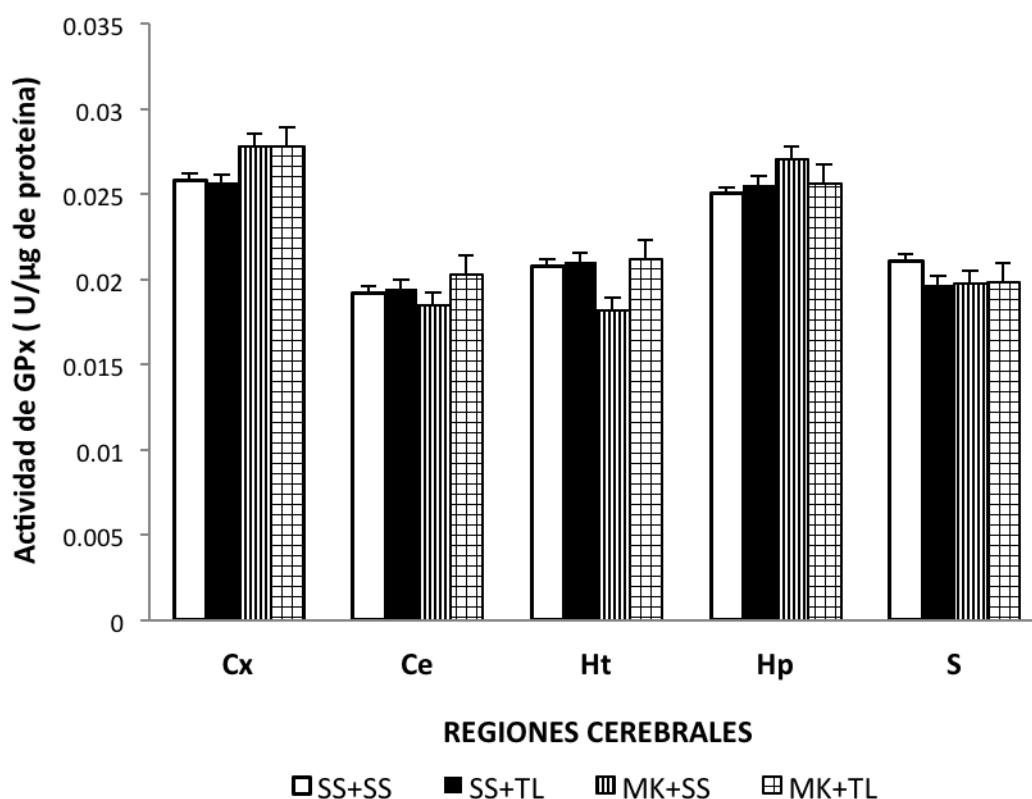
Con respecto al efecto del grupo que solo se administró con MK-801, se observa que existe una atenuación de la LP y del balance GSH/GSSG en áreas como Cx, Ce y S, mientras que en Ht hay un incremento de la LP. De acuerdo con la hipótesis del efecto indirecto de la activación de NMDAr por  $TI^+$ , el Ht evoca respuestas tanto excitatorias como inhibitorias sobre las neuronas histaminérgicas, dopaminérgicas y serotoninérgicas. Esto podría deberse a la activación glutamatérgica de neuronas que contienen conexiones excitatorias e inhibitorias (GABAérgicas) (Yang y Hatton, 1997). Estos cambios diferenciales en las regiones cerebrales se observaron en otros estudios bioquímicos realizados por Motawaj y colaboradores (2010) en un modelo de la enfermedad de Alzheimer usando memantina (otro antagonista de NMDAr), en el cual la actividad de los receptores histaminérgicos aumentó solo en Ht cuando se administra memantina, siendo protector en las regiones Cx, Hp y S.



**Figura 4.** Niveles de glutatión en las diferentes regiones cerebrales de la rata después de la administración de TI<sup>+</sup> y MK-801. El contenido de GSH fue estimado en las diferentes regiones cerebrales: corteza (Cx), cerebelo (Ce), Hipocampo (Hp), Hipotálamo (Ht) y estriado (S), por un método fluorométrico. Los datos fueron expresados como la media ± E.E. con una n = 5 experimentos independientes. \*p < 0.05 representa la significancia con el grupo control (S.S.), # p < 0.05 diferencias significativa con el grupo de SS + TI<sup>+</sup>. El análisis estadístico fue por ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey.

## 7.5 La actividad cerebral de glutatión peroxidasa (GPx) después del tratamiento de $\text{TI}^+$ y MK-801 en ratas

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que no existen cambios en la actividad de GPx en los cuatro grupos evaluados en ninguna de las regiones cerebrales de la rata, sugiriendo que esta enzima no participa en los cambios oxidantes inducidos por  $\text{TI}^+$  en este modelo (Figura 5).



**Figura 5.** Actividad cerebral de la enzima glutatión peroxidasa (GPx). Los niveles de la enzima no fueron modificados ni por  $\text{TI}^+$  ni por el antagonista de los NMDAr. Las cinco regiones cerebrales fueron analizadas por un método fluorométrico. Los datos son expresados como la media  $\pm$  E.E.

## 7.6 Estudio morfológico (Tinción H-E)

El efecto del MK-801 (1 mg/Kg, 30 min antes de la administración de TI<sup>+</sup>) sobre las alteraciones histológicas en las regiones cerebrales: corteza (Cx), estriado (S) e hipocampo (Hp) posterior a la intoxicación por TI<sup>+</sup> (32 mg/Kg; 24 h) fue explorado histológicamente en el cerebro de ratas. Se presentan datos del grupo control (S.S.+ S.S.), grupo con MK-801 + S.S., grupo de daño S.S. + TI<sup>+</sup> y grupo con el antagonista de los NMDAr y el inductor de daño (MK-801 + TI<sup>+</sup>). El número de ratas por cada grupo fue de 3 individuos. Las imágenes de la figura 6 se presentan en un aumento 40X.

En los grupos S.S + S.S., MK-801 + S.S. y MK-801 + TI<sup>+</sup> se observan la mayoría de las neuronas normales, bien conservadas en Cx y S. En cambio, en el grupo con TI<sup>+</sup> hay retracción nucleosomática con picnosis y se observan varias neuronas amorfas (↑), así como deslaminación anormal.

En los grupos S.S. + S.S.; MK-801 + S.S. y MK-801 + TI<sup>+</sup> del hipocampo se observan las células redondas del giro dentado, conservadas y bien organizadas, mientras que en el grupo con TI<sup>+</sup> hay picnosis, retracción nucleosomática, células amorfas y un ligero edema intersticial (\*) (Figura 6).

## 7.7 Determinación de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP)

Se determinó el incremento en la aparición de la proteína GFAP como evidencia de astrogliosis en los cortes de cerebros después de los distintos tratamientos. La figura 7 muestra el efecto del MK-801 (1 mg/Kg, 30 min antes de la administración de TI<sup>+</sup>) sobre las alteraciones histológicas en las regiones cerebrales

(Cx, S y Hp) posterior a la intoxicación por TI<sup>+</sup> (32 mg/Kg; 24 h). El número de ratas estudiadas fue n= 3 por cada grupo.

Corteza: en los grupos S.S. + S.S., MK-801 + S.S. y MK-801 + TI<sup>+</sup> se observan pocos astrocitos reactivos, mientras que en el grupo S.S. + TI<sup>+</sup> hay un incremento de astrocitos reactivos (↑).

Hipocampo: En los grupos S.S. + S.S., MK-801 + S.S. y MK-801 + TI<sup>+</sup> podemos observar pocos astrocitos reactivos. En el grupo de S.S. + TI<sup>+</sup> encontramos un incremento en la expresión de GFAP (↑).

Estriado: Los grupos S.S. + S.S. y MK-801 + TI<sup>+</sup> muestran una ligera expresión de GFAP, pocos astrocitos reactivos y un ligero aumento de astrocitos. En el grupo de S.S. + TI<sup>+</sup>, la mayoría de los astrocitos son reactivos (↑). Referente al grupo con MK-801 + S.S, no se observaron cambios significativos.

La proliferación de astrocitos ocurre secundariamente al daño en el SNC. El incremento de la tinción de GFAP en las áreas cerebrales estudiadas sugiere que estas áreas son un sitio importante de daño cerebral debido a la administración de TI<sup>+</sup>, mismo que se vio atenuado cuando se administró MK-801 (Figura 7).

### 7.8 Immunohistoquímica de caspasa 3

La figura 8 presenta imágenes representativas del efecto del MK-801 (1 mg/kg, 30 min antes de la administración de TI<sup>+</sup>) sobre las alteraciones histológicas en las regiones cerebrales Cx, S y Hp posterior a la intoxicación por TI<sup>+</sup> (32 mg/kg; 24 h). El número de ratas fue de 3 por cada grupo.

Corteza: En el grupo control, la mayoría de las neuronas presentan una morfología normal, conservadas y pocas neuronas expresan la proteína. En los grupos MK-801 + S.S. y MK-801 + TI<sup>+</sup>, las neuronas también se observan con poca expresión de la caspasa 3. En el grupo con S.S. + TI<sup>+</sup> se ve una elevada expresión del marcador histoquímico (↑).

Hipocampo: En los grupos S.S. + S.S.; MK-801 + S.S. y MK-801 + TI<sup>+</sup> se observa una ligera expresión de la caspasa 3; sin embargo, en el grupo con S.S. + TI<sup>+</sup> se observa una expresión muy incrementada de la proteína (↑).

Estriado: En los grupos S.S. + S.S. y MK-801 + S.S. se observan pocas neuronas expresando la proteína, mientras que en el grupo MK-801 + TI<sup>+</sup> se incrementa ligeramente la expresión y en el grupo con S.S. + TI<sup>+</sup>, las neuronas y fibras expresan fuertemente la caspasa 3 (↑) (Figura 8).

#### 7.9 Inmunoreactividad de caspasa 9

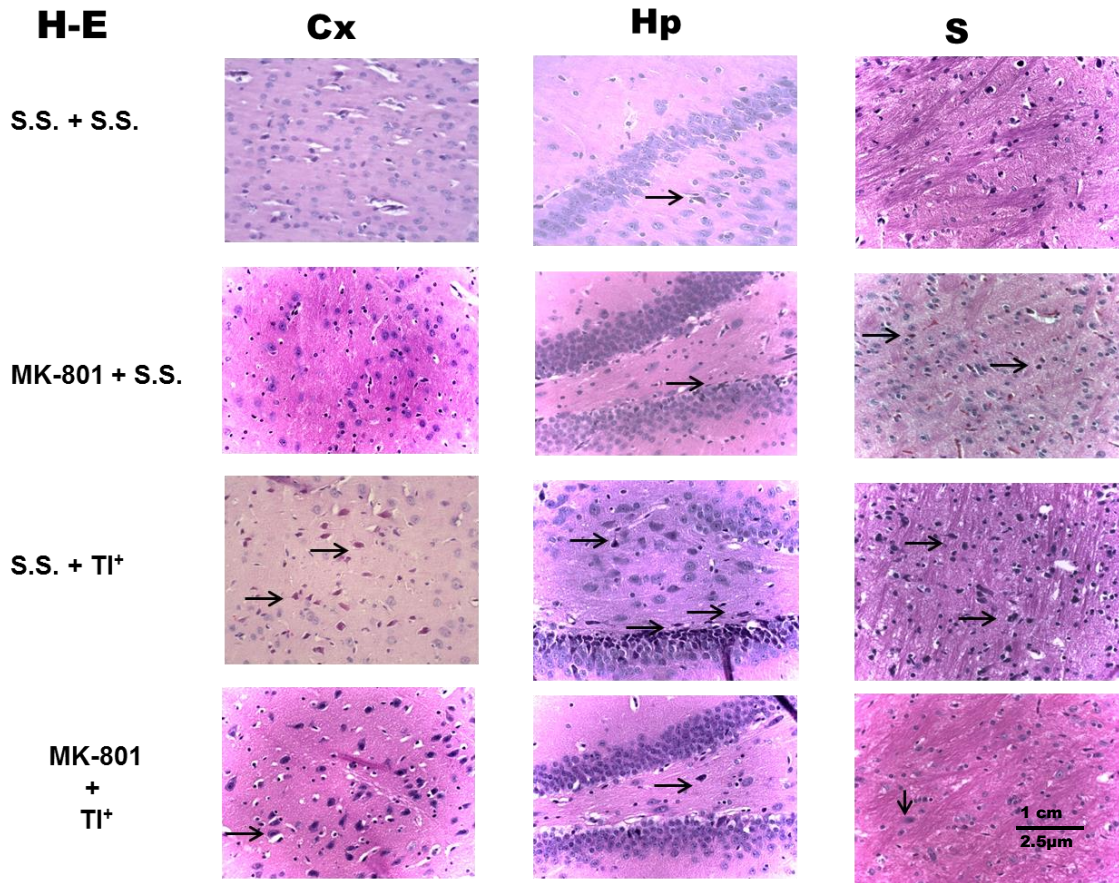
En la figura 9 se muestra el efecto del MK-801 (1 mg/Kg, 30 min antes de la administración de TI<sup>+</sup>) sobre las alteraciones histoquímicas en las regiones cerebrales Cx, S y Hp posterior a la intoxicación de TI<sup>+</sup> (32 mg/Kg; 24 h). El número de ratas fue n = 3 por cada grupo.

Corteza: En el grupo con S.S. + TI<sup>+</sup> se observa ligeramente incrementada la expresión de esta proteína. Sin embargo, en los otros tres grupos se observa muy poca expresión de la caspasa 9 (↑).

Hipocampo: En todos los grupos se encontró ligera expresión de la caspasa 9.

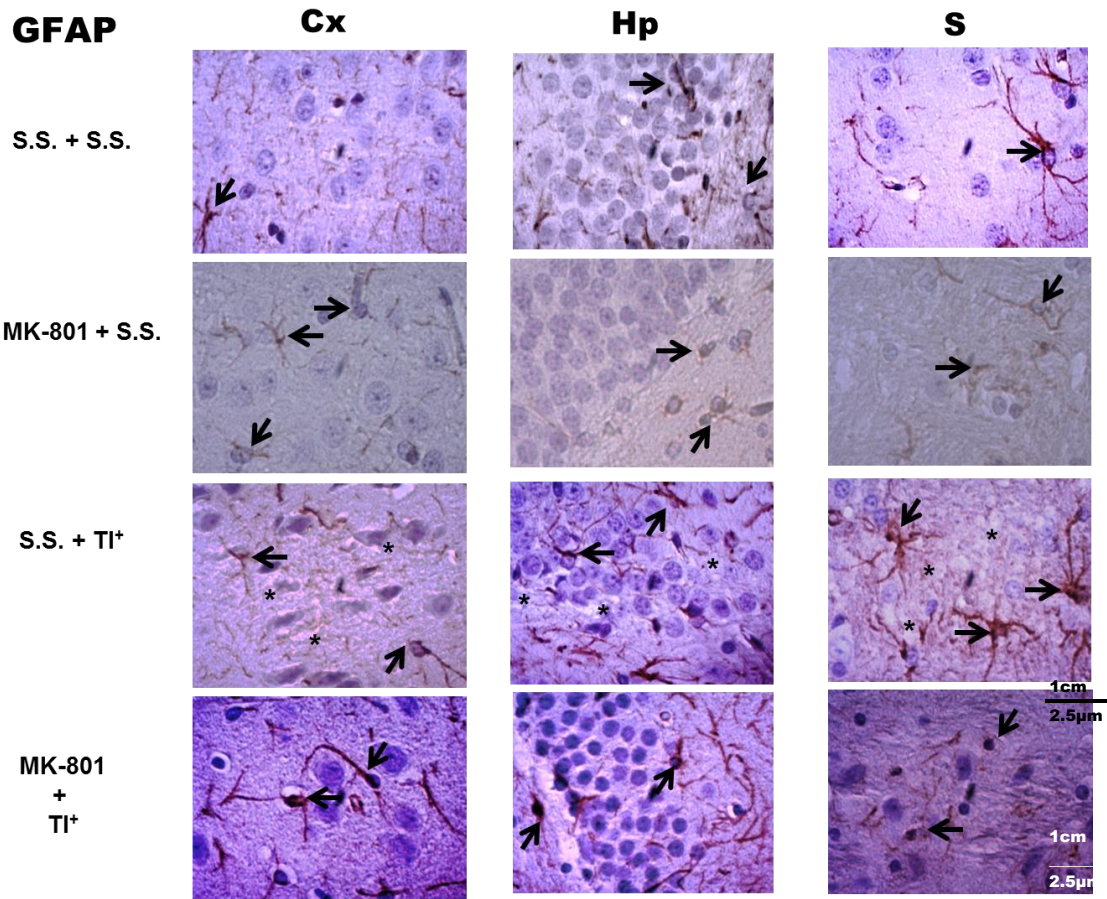
Estriado: En el grupo con S.S. +  $Tl^+$  encontramos un ligero incremento en la expresión de caspasa 9 tanto en neuronas como en fibras ( $\uparrow$ ). En los otros tres grupos restantes se observó poca expresión de la proteína (Figura 9).

El bloqueo de los receptores NMDA por MK-801 muestra una atenuación del marcador pro-apoptótico de las caspasas 3 y 9 en presencia de  $Tl^+$  involucrando procesos apoptóticos vinculados a estos receptores en la intoxicación por el metal.

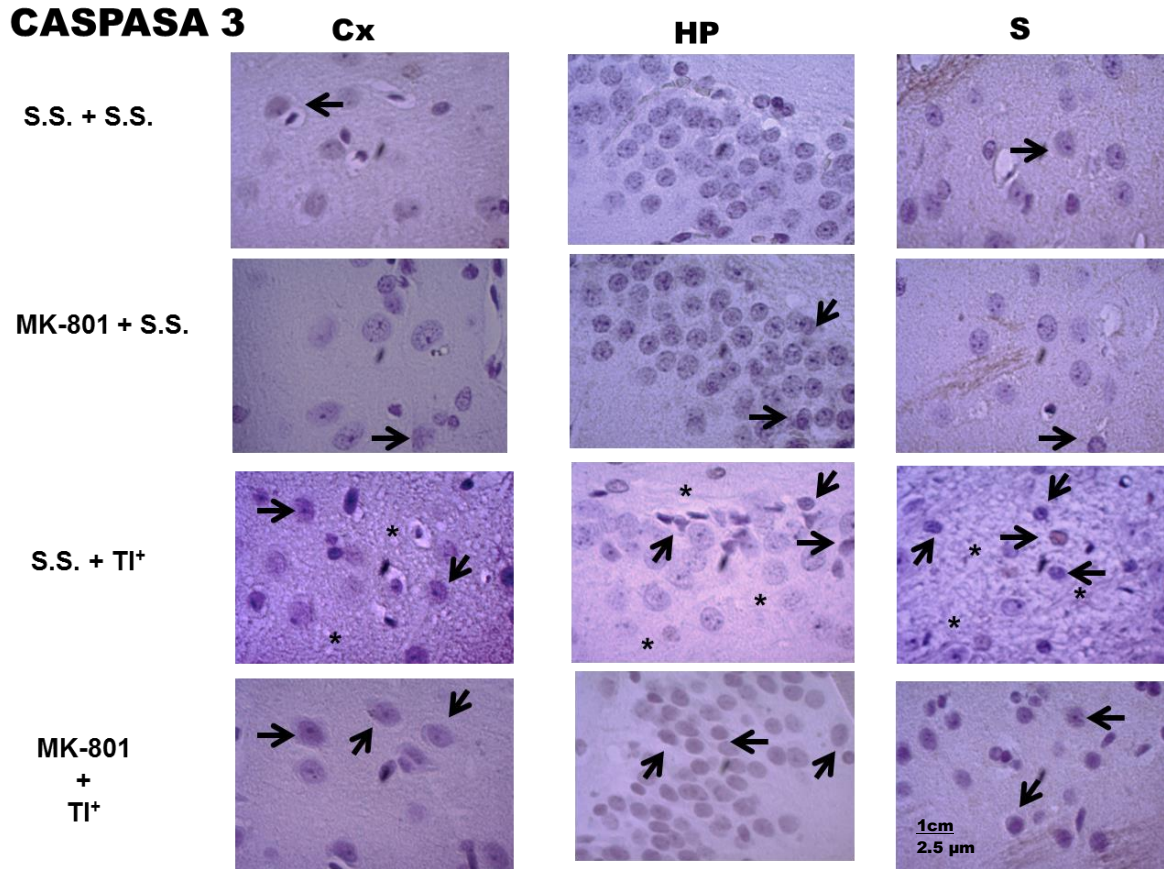


**Figura 6.** Tinción H-E. Corteza frontal (Cx), hipocampo (Hp) y estriado (S). Tratamientos: 1) Solución salina (S.S.), 2) MK-801 (1 mg/Kg, i.p.30 min) + S.S.; 3) S.S. + TI<sup>+</sup> (32 mg/Kg, i.p. 24 h), y 4) MK-801+TI<sup>+</sup>. El tejido cerebral tiene apariencia normal en el grupo control (S.S.). El grupo con TI<sup>+</sup> muestra una desorganización celular y presencia de células picnóticas (flechas) en las tres regiones cerebrales. En el grupo MK-801 + TI<sup>+</sup>, el daño fue atenuado (40X).Escala de la barra (2.5µm).

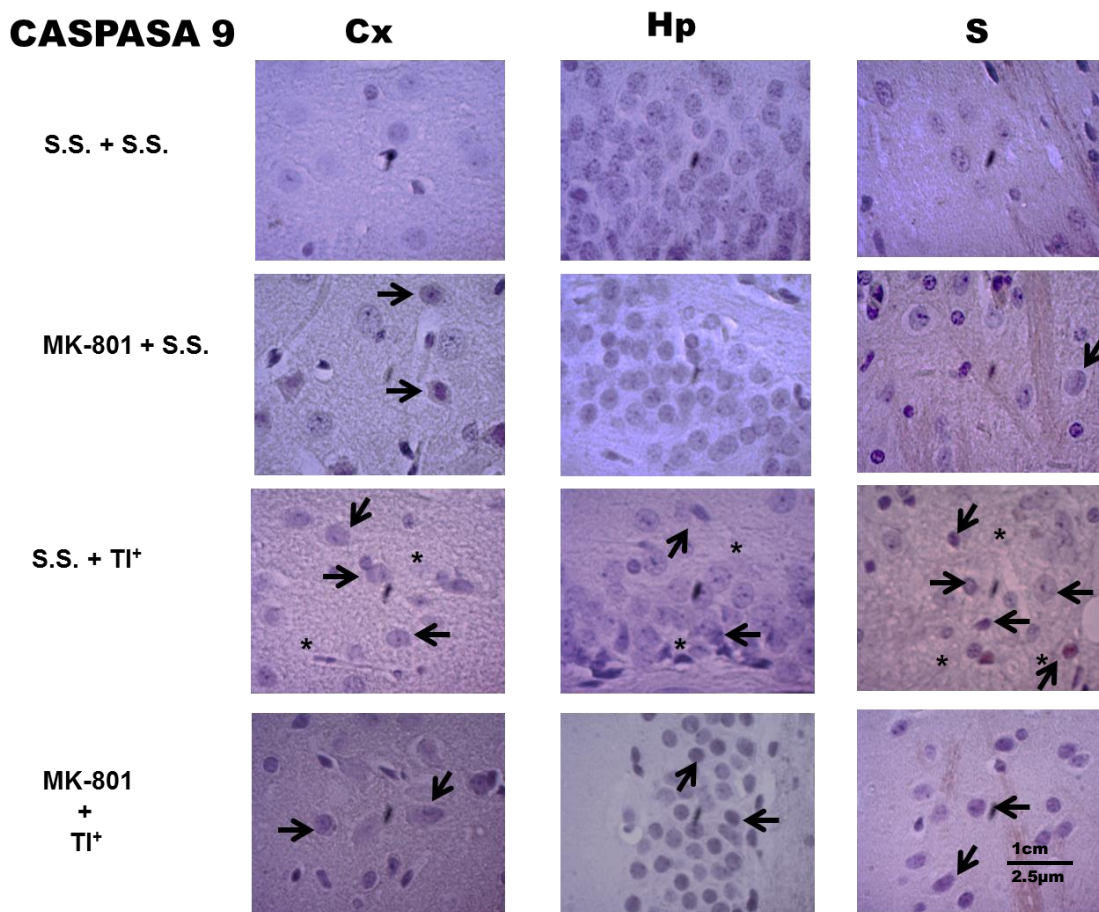




**Figura 7.** GFAP. Corteza frontal (Cx), hipocampo (Hp) y estriado (S). Tratamientos: 1) Solución salina (S.S.), 2) MK-801 (1 mg/Kg, i.p.30 min) + S.S.; 3) S.S. + TI<sup>+</sup> (32 mg/Kg, i.p. 24 h) y 4) MK-801 + TI<sup>+</sup>. El grupo con TI<sup>+</sup> mostró inmunoreactividad positiva a GFAP (flechas), mientras que el grupo con MK-801 + TI<sup>+</sup> atenúa la inmunoreactividad (40X). Escala de la barra (2.5µm).



**Figura 8.** El MK-801 atenúa la activación de caspasa-3 en respuesta al daño producido por TI<sup>+</sup>. Corteza frontal (Cx), hipocampo (Hp) y estriado (S). Tratamientos: 1) Solución salina (SS), 2) MK-801 (1 mg/Kg, i.p. 30 min) + S.S.; 3) SS + talio (32 mg/Kg, i.p. 24 h) y 4) MK-801+TI<sup>+</sup>. El grupo tratado con TI<sup>+</sup> presenta un incremento a la inmunotinción a caspasa-3 en las tres regiones cerebrales (flechas). La administración del antagonista al receptor NMDA disminuye el daño producido por el metal (40X). Edema (\*).Escala de la barra (2.5μm).



**Figura 9.** El MK-801 atenúa la activación de caspasa-9 en respuesta al daño producido por TI<sup>+</sup>. Corteza frontal (Cx), hipocampo (Hp) y estriado (S). Tratamientos: 1) Solución salina (SS), 2) MK-801 (1 mg/Kg, i.p. 30 min) + SS; 3) SS + talio (32 mg/Kg, i.p. 24 h) y 4) MK-801 + TI<sup>+</sup>. Se muestra una mayor inmunoreactividad en el grupo administrado con TI<sup>+</sup> en comparación con los otros grupos en las tres regiones cerebrales (flechas) (40X). Edema (\*). Escala de la barra (2.5µm).

## 8. DISCUSIÓN

La toxicidad del  $Tl^+$  en las regiones cerebrales de la rata después de la administración aguda y sistémica del metal (i.p. x 24 h) a una dosis de 32 mg/Kg ( $LD_{50}$ : Ríos y Monroy-Noyola, 1992) ha sido previamente demostrada. Un nuevo mecanismo para la toxicidad de  $Tl^+$  es sugerido a través de la excesiva excitabilidad de las células nerviosas como fuente de daño del tejido. Los animales pre-tratados con un potente antagonista de los NMDAr, el MK-801 (administrado 30 min antes del metal) proveen evidencia de un componente glutamatérgico en la toxicidad producida por el  $Tl^+$ .

### 8.1 Distribución diferencial del contenido de $Tl^+$ en el cerebro de rata

En este estudio, el  $Tl^+$  se acumuló de manera diferencial en las cinco regiones cerebrales de rata, siendo Hp, Ce y S las regiones que muestran el contenido del metal más alto. Esta distribución heterogénea discrepa de algunos reportes previos, en los cuales el  $Tl^+$ , a dosis menores (8 y 16 mg/Kg) y a un tiempo más largo (7 días), produjo una distribución homogénea entre las regiones cerebrales (Galván-Arzate et al., 2005). La distribución regional de  $Tl^+$  obedece a varios factores: la dosis, el tiempo de administración del metal y la edad de las ratas (Hasan y Ali, 1981; Brown et al., 1985; Ríos et al., 1989; Aoyama et al., 1998; Galván-Arzate et al., 2000; Eskandari et al., 2015). En nuestro estudio, el uso de una dosis  $LD_{50}$  (32 mg/Kg) fue relevante como modelo tóxico para producir un efecto más tóxico y rápido del metal. El tiempo de elección del tratamiento fue de 24 h con la finalidad de garantizar el efecto agudo y temprano.

## 8.2 El MK-801 atenúa el contenido de $Tl^+$ en las diferentes regiones cerebrales

La acumulación de  $Tl^+$  en el cerebro se presenta de manera diferencial en el cerebro de rata, donde Hp, Ce y S presentaron la mayor concentración, como se observó en reportes previos (Ríos & Monroy 1993). El tiempo para este efecto fue importante para dicha distribución de acuerdo a los resultados de este estudio, así como lo reportado por Wanger y colaboradores (2012), mostrando que el  $Tl^+$  a los 5 min de la administración se encuentra principalmente en el bulbo olfatorio y en las áreas corticales II/III y V, mientras que a las 24 h el metal se acumula más en el caudoputamen y el hipocampo. Otros metales como el  $Pb^{2+}$ , el  $Hg^+$  y el  $Al^{3+}$  mostraron también una acumulación diferencial en las regiones cerebrales, siendo el Hp la región más sensible a estos (Kumar et al. 2009; Nihei & Guilarte 1999); de igual manera, en nuestro estudio, el Hp es la región cerebral que mayor contenido de  $Tl^+$  contiene.

La modulación de NMDAr, receptores a AMPA/kainato y la actividad de los receptores a GABA puede involucrar la acción de metales como  $Zn^+$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  y  $Hg^+$  (Sadiq et al., 2012). Sin embargo, con respecto al efecto de  $Tl^+$  sobre los receptores glutamatérgicos, no existen reportes previos. Por su parte, el  $Pb^{2+}$  y el  $Zn^{2+}$  han mostrado modular la expresión de NMDAr en Hp, incrementando la expresión de la subunidad NMDAr-2A (Nihei y Guilarte, 1999; Nihei et al., 2000), mientras que el  $Mn^{2+}$  produce una respuesta dependiente de voltaje en los NMDAr (Mayer y Westbrook, 1987). Este trabajo demuestra que el pretratamiento con MK-801 en las ratas disminuye el contenido de  $Tl^+$  en las regiones con mayor contenido

del metal, sugiriendo un mecanismo modulador de los NMDAr sobre la distribución del metal en el cerebro. Sin embargo, siendo este un concepto especulativo, requiere de posterior demostración. Con respecto a la memantina (otro antagonista de los NMDAr), ejerce un efecto neuroprotector sobre la actividad de la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  en los modelo de la enfermedad de Alzheimer (Zhang et al., 2013). El  $\text{TI}^+$  muestra tener gran afinidad por la ATPasa de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  por tener un radio atómico y valencia similar a la del  $\text{K}^+$ . Parecido a otros metales, el  $\text{TI}^+$  podría también modular el canal asociado a NMDAr en las células nerviosas. Si este fuera el caso, el MK-801 podría bloquear la entrada del metal a la célula o al menos atenuar el daño producido por el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$ .

### 8.3 Las alteraciones motoras inducidas por $\text{TI}^+$ fueron atenuadas por MK-801

En este trabajo se encontró que los movimientos horizontales se incrementaron por el tratamiento de  $\text{TI}^+$ , produciendo un patrón de hiperactividad que fue atenuado por la administración de MK-801, posiblemente por la participación de los NMDAr. El MK-801 ha mostrado proveer protección en la neurotoxicidad asociada con modelos experimentales de la enfermedad de Parkinson, HD y epilepsia (Wang y Qin, 2010; Sencer et al., 2008; Hardingham, 2009; Clarke, 1995). Este patrón temprano de hiperactividad se ha sugerido en las primeras fases de la HD, así como en el modelo de dicha enfermedad. Tal hiperactividad se produce por la toxina mitocondrial 3-NP, la cual participa en la sobreactivación de NMDAr a través de la alteración del potencial de membrana (Borlongan et al. 1997).

#### 8.4 El MK-801 reduce el daño oxidante producido por $Tl^+$

La toxicidad de  $Tl^+$  produce un incremento en la producción de ERO y daño oxidante, en particular en la PL (Abdel-Daim y Abdou, 2015; Hanzel y Verstraeten 2006; Galván-Arzate et al., 2005). Las alteraciones antioxidantes del sistema de defensa en respuesta a los metales pesados, incluyendo el  $Tl^+$ , en las diferentes regiones cerebrales han sido reportadas (Farina et al., 2013; Kumar et al., 2008; Galván-Arzate et al., 2005; Hasan y Ali, 1981; Yang y Hatton 1997). Hp, Ce y S fueron las regiones más susceptibles a la intoxicación por  $Tl^+$  a las 24 h, y este efecto es apoyado con previas observaciones en Ce y S (Villaverde et al. 2004). La PL resultó más alta para el MK-801 en comparación con  $Tl^+$  y control, y este efecto podría estar relacionado con las propiedades de balance del estado redox (transferencia de electrones y la bioactividad de los metabolitos redox) que se han reportado (Kovacic y Somanathan, 2010), lo que ayuda a explicar porque los niveles de GSH son afectados por MK-801 durante las primeras horas.

En reportes previos la disminución de los niveles de GSH solo se mostraron en S, a los 7 días y a una dosis de 16 mg/Kg de  $Tl^+$  (Galván-Arzate et al., 2005); sin embargo, en este estudio no existen cambios en los niveles de GSH en otras regiones cerebrales solo en Ht, encontrándose un incremento en su actividad. Este efecto debe considerarse debido al tiempo más corto de exposición (24 h) al metal, involucrando mayores cambios agudos en el GSH endógeno. Esto es contrastado con la falta de cambio en la actividad de GPx, una enzima que emplea al GSH como cofactor (Haidara et al., 1999). La actividad de GPx no mostró cambios en ninguna

de las regiones cerebrales, sugiriendo que la conversión de GSH no involucra la actividad enzimática al tiempo investigado.

En relación al efecto del MK-801 sobre los cambios en los niveles de GSH, se encontró una disminución de este antioxidante en Cx, Hp y S notablemente con el incremento en Ce y Ht. Esta oscilación podría ser explicada como un proceso adaptativo/compensatorio debido a la naturaleza redox moduladora del MK-801 (Kovacic y Somanathan, 2010), lo cual lamentablemente no discierne si estos cambios son nocivos o solo son adaptativos.

#### 8.5 La apoptosis producida por $TI^+$ fue atenuada por el MK-801

La apoptosis es un mecanismo regulado por varios miembros de la familia Bcl-2, constituidas tanto por proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2 y Bcl-xl) como proteínas pro-apoptóticas (Bad y Bax), el  $TI^+$  disminuye la expresión de las proteínas anti-apoptóticas y aumenta la expresión de las proteínas pro-apoptóticas en células de glioma C6, facilitando la liberación del citocromo c de la mitocondria hacia el citosol, lo que conlleva a la unión con el adaptador de la proteína APAF-1 y promueve la activación de caspasas (Chee-Fah et al., 2005). En estudios recientes en células PC12 de rata, se observó que el  $TI^+$  (I) produce apoptosis por la vía intrínseca mitocondrial dependiente de caspasas a través de la liberación de citocromo c, seguida de la activación de las caspasas 9 y 3. Adicionalmente, el  $TI^+$  (III) causa un incremento de FAS, y posteriormente conduce a la activación de caspasa 8 por la activación de la vía extrínseca de apoptosis (Hanzel y Verstraeten 2009). En células Jurkat, el metal produce apoptosis en (Bragadin et al., 2003).



En este estudio, el  $Tl^+$  produce un aumento de las expresiones de caspasa 3 y caspasa 9 en las diferentes regiones cerebrales, llevando a apoptosis. Este daño fue atenuado por la administración de MK-801 en las regiones cerebrales estudiadas.

El MK-801 protege de la apoptosis en neuronas generada por estaurosporina, indicando mecanismos de protección en la liberación de citocromo c y la activación de APAF-1 y caspasa 9 (Lévillé et al., 2010).

#### 8.6 El talio, la mitocondria y la excitotoxicidad

El  $Tl^+$  estimula el hinchamiento de las membranas intracelulares y mitocondriales (Douglas, 1990; Zierold, 2000). Estos efectos ocurren simultáneamente con un incremento de las concentraciones de  $Ca^{2+}$  o  $Na^+$  y con una disminución de  $K^+$  en hepatocitos tratados con  $TlCl$  (Zierold 2000), acompañado por una deficiencia de ATP en las células tratadas con sales de  $Tl^+$  (Woods y Fowler, 1986). El hinchamiento mitocondrial debido a la permeabilidad de  $Ca^{2+}$  es diferencial en las regiones cerebrales, siendo el Hp más vulnerable en comparación con Cx y Ce (Friberg et al., 1999). Korotkov (2009) reportó que el  $Tl^+$  disminuye el estado III y produce un hinchamiento mitocondrial por inhibición de enzimas respiratorias. El  $Tl^+$  afecta a los grupos sulfhidrilos, el hinchamiento mitocondrial y la respiración (Korotkov et al. 2014), así como el daño en la cadena de transporte de electrones en las mitocondrias del hígado en los complejos I, II y IV, llevando a un incremento en la producción de ERO, al rompimiento de la fosforilación oxidativa, la disminución del ATP, la disminución en el radio de la tasa ATP/ADP, la permeabilidad mitocondrial y la liberación de citocromo c (Eskandari et al., 2015). Nuestros resultados están de

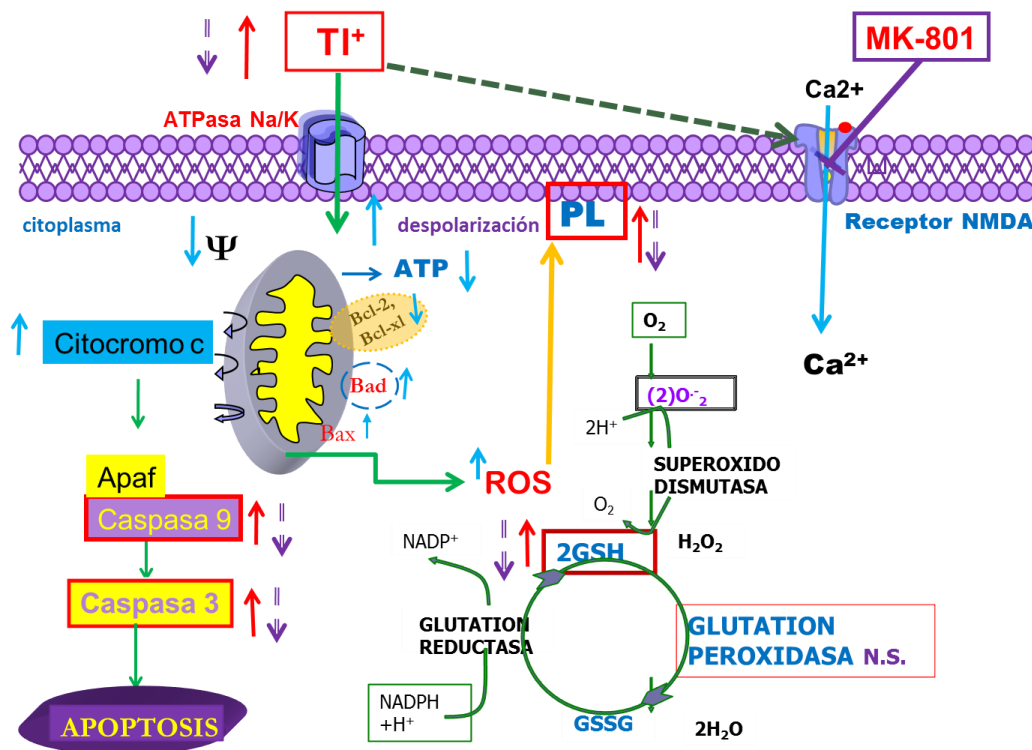
acuerdo con la hipótesis de “excitotoxicidad secundaria”, la cual propone que la pérdida de ATP es el resultado del daño en la energía que lleva al rompimiento de la actividad de las bombas iónicas, resultando en la despolarización y la remoción del  $Mg^{2+}$  de los NMDAr dependientes de voltaje (Beal et al., 1993). Este evento ocurre con otras neurotoxinas como el 3-NP, el cual causa excitotoxicidad secundaria (inhibición primaria del complejo II), siendo las neuronas más vulnerables a los niveles basales de glutamato, y llevando a la muerte celular (Pérez-De la Cruz y Santamaría, 2007). Esto nos lleva a la hipótesis de que el  $Tl^+$  podría ejercer un efecto similar sobre la función mitocondrial, como lo hacen las otras toxinas mitocondriales. Preliminarmente, los hallazgos de este estudio proveen evidencia de una posible participación de  $Tl^+$  sobre eventos excitatorios en el cerebro de la rata.

Otra consideración importante es que el MK-801 atenúa los efectos producidos por el  $Tl^+$  a las 24 h después de la administración del metal. Esto es relevante en el sentido de que las concentraciones mayores de  $Tl^+$  se encuentran a las 24 h, mientras que los picos de concentración para MK-801 en el cerebro se llevan a cabo entre los 10 y 30 min después de su administración (2 mg/Kg), con una vida media de eliminación de 1 a 2.05 h, respectivamente (Vezzani et al., 1989). Los efectos preventivos del MK-801 sobre la intoxicación de  $Tl^+$  involucran que las acciones tóxicas del metal se previenen durante las primeras horas en presencia del MK-801 a través de la inhibición de los NMDAr (protección aguda), aunque la existencia de una posible interacción química entre las dos moléculas durante las primeras horas en las cuales ambas moléculas están simultáneamente presentes en el cerebro no puede ser descartado, en un posible escenario donde el  $Tl^+$  podría ser

inactivado químicamente por MK-801. Ambas posibilidades requieren de mayor investigación.

Los cambios morfológicos en las diferentes regiones cerebrales muestran picnosis de las células solo en el grupo que se administró con  $TI^+$  y no se observaron cambios en el grupo MK-801 +  $TI^+$ . De igual forma para los astrocitos activos, el grupo que solo fue administrado con  $TI^+$  mostró mayor reactividad, sugiriendo que la participación de los NMDAr podría modular también las respuestas gliales. La proliferación de astrocitos ocurre secundariamente al daño en el sistema nervioso central. El incremento de la tinción de GFAP en las áreas cerebrales estudiadas sugiere que estas áreas son un sitio importante de daño cerebral debido a la administración de  $TI^+$ , y esto se vio atenuado cuando se administró MK-801.

La expresión de la caspasa 3 se observó en las tres regiones estudiadas por la administración de  $TI^+$  en comparación con el grupo MK-801 +  $TI^+$ , en el cual se observó una atenuación en la expresión de dicha caspasa. Para la caspasa 9 la expresión fue menor en comparación con la caspasa 3. Este hallazgo pone de manifiesto la ocurrencia de eventos apoptóticos en la toxicidad del  $TI^+$  y su posible prevención por el bloqueo de NMDAr.



**ESQUEMA 9. PROPUESTA DEL EFECTO DEL MK-801 SOBRE LA TOXICIDAD DEL TALIO.**

El  $Tl^+$  promueve hinchamiento en las mitocondrias, daño en los complejos I, II y IV de la cadena de transporte de electrones, llevando a la producción de ERO, rompiendo la fosforilación oxidativa, la disminución del ATP. La pérdida de ATP es el resultado del daño en la energía que lleva al rompimiento de la actividad de las bombas iónicas, resultando en la despolarización y la remoción del  $Mg^{2+}$  de los NMDAr dependientes de voltaje y la entrada de  $Ca^{2+}$  al citoplasma celular, causando excitotoxicidad secundaria. Por su parte, la administración de  $Tl^+$  produce aumento de ERO y la PL, ante esto existen mecanismos de defensa antioxidante de GSH (aumento) y GPx (sin cambio significativo). El  $Tl^+$  produce daño principalmente en mitocondrias, aumentando las proteínas Bad y Bax y disminuyendo Bcl-2 y Bcl-xl, provocando la liberación de citocromo c, uniéndose al factor APAF1 y formando el apoptosoma con la caspasa 9 y la activación de caspasa 3 llevando a la apoptosis (flechas azules). En este trabajo, el MK-801, antagonista de los NMDAr, disminuye la concentración de  $Tl^+$  en las diferentes regiones cerebrales y atenúa los cambios producidos por el metal (flechas rojas): PL, GSH, y la actividad de caspasas 9 y 3 (flechas moradas). Parecido a otros metales, el  $Tl^+$  podría también modular el canal asociado a NMDAr en las células nerviosas. Si este fuera el caso, el MK-801 podría bloquear la entrada del metal a la célula o al menos atenuar el daño producido por el flujo de  $Ca^{2+}$  (línea verde punteada). El MK-801 ejerció efectos benéficos o protectores sobre la intoxicación por talio a nivel bioquímico, inmunohistoquímico y motor.

## 9. CONCLUSIÓN

El MK-801 ejerció efectos benéficos o protectores sobre la intoxicación por talio a nivel bioquímico, inmunohistoquímico y motor. Nuestro estudio confirma los efectos neuroprotectores de este antagonista de NMDAr y su importancia en el estudio de posibles mecanismos que lleven al diseño de agentes terapéuticos para el tratamiento de la intoxicación por  $Tl^+$ . Debido a que la exposición al metal responde a diferentes fuentes ocupacionales, accidentales o intencionales, así como a la contaminación ambiental, este estudio tiene relevancia en términos de aplicación *a posteriori* para la salud humana. Al no existir un tratamiento eficaz que evite la redistribución del metal hacia el SNC, es importante el desarrollo de más estudios que contribuyan al mayor entendimiento de como el metal produce daño en el SNC.

## 10. PERSPECTIVAS

El estudio de los mecanismos de talio se enfoca a la posible terapia para evitar los síntomas en el humano, y se debe considerar a futuro su toxicidad no sólo en la ingesta accidental u ocupacional, sino como agente contaminante. Varios países reportan la presencia del metal en las masas de agua que son requeridas para riego y consumo en humanos. Los efectos ambientales a largo plazo por el crecimiento en la tecnología con la aplicación del  $Tl^+$  llevan a proponer investigar el reciclaje de la basura con el metal en las industrias.

A pesar de los múltiples estudios realizados para el  $Tl^+$ , aún no se cuenta con un tratamiento efectivo contra su intoxicación debido a que aunque ya se han utilizado quelantes para otros metales aplicables en humanos, estos redistribuyen al  $Tl^+$  hacia otros órganos, principalmente a SNC, por lo que la búsqueda de los mecanismos implicados en su toxicidad y la identificación de mecanismos para atenuar su daño son muy necesarios.

Todo esto, en conjunto, favorece el desarrollo de investigaciones más detalladas y específicas que identifiquen los mecanismos de acción de este y otros metales en diferentes sistemas biológicos y el silenciamiento de las vías de señalización que se activen por el  $Tl^+$  en deterioro de la homeostasis celular. Nuestro estudio continuará evaluando estas vías en sistemas *in vitro* y con mayores criterios de control experimental.

## 11. REFERENCIAS

- ❖ Abdel-Daim MM., Abdou RH. (2015). Protective effects of diallyl sulfide and curcumina separately against thallium-induced toxicity in rats. *Cell J.*17: 379-388.
- ❖ Aoyama H., Yoshida M., Yamamura Y. (1988). Induction of lipid peroxidation in tissues of thallous malonate-treated hamster. *Toxicol.* 53:11-18.
- ❖ Beal MF., Brouillet E., Junkins B., Henshaw R., Rosen B., Hyman BT. (1993). Age-dependent striatal excitotoxic lesions produced by the endogenous mitochondrial inhibitor malonate. *J Neurochem.* 61: 1147-1150.
- ❖ Benarroch EE. (2011). NMDA receptors: recent insights and clinical correlations. *Neurology.* 76:1750-1757.
- ❖ Borlongan CV., Koutouzis TK., Freeman TB., Hauser RA., Cahill DW., Sanberg PR. (1997). Hyperactivity and hypoactivity in a rat model of Huntington's disease: the systemic 3-nitropropionic acid model. *Brain Res Brain Res Protoc.* 1: 253-257.
- ❖ Bragadin M., Toninello A., Bindoli A., Rigobello MP., Canton M. (2003). Thallium induces apoptosis in Jurkat cells. *Ann NY Acad Sci.* 1010: 283-291.
- ❖ Brown DR., Callahan BG., Cleaves MA., Schatz RA. (1985). Thallium induced changes in behavioral patterns: correlation with altered lipid peroxidation and lysosomal enzyme activity in brain regions of male rats. *Toxicol Ind Health.* 1: 81-98.
- ❖ Chia CF., Chen SC., Chen CS., Shih CM., Lee HM., Wu CH. (2005). Thallium acetate induces C6 glioma cell apoptosis. *Ann NY Acad Sci.* 1042: 523-530.

- ❖ Choi DW. (1992). Excitotoxic cell death. *J Neurobiol.* 23: 1261-1276.
- ❖ Clarke PB., Reuben M. (1995). Inhibition by dizocilpine (MK-801) of striatal dopamine release induced by MPTP and MPP<sup>+</sup>: possible action at dopamine transporter. *Br J Pharmacol.* 114: 315-322.
- ❖ Colle D., Hartwig JM., Soares FA., Farina M. (2012). Probucol modulates oxidative stress and excitotoxicity in Huntington's disease models in vitro. *Brain Res Bull.* 887: 397-405.
- ❖ Danial NN., Korsmeyer SJ. (2004). Cell death: critical control points. *Cell.* 116: 205-219.
- ❖ Dawson VL., Dawson TM., London ED., Bredt DS., Snyder SH. (1991). Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 88: 6368-6371.
- ❖ Dingledine R., Borges K., Bowie D., Traynelis SF. 1999. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev.* 51:7-61.
- ❖ Douglas KT., Bunni MA., Baidur SR. (1990). Thallium in biochemistry. *Int J Biochem.* 22:429-438.
- ❖ Dringen R., Pawlowski PG., Hirrlinger J. (2005). Peroxide detoxification by brain cells. *J Neurosci Res.* 79: 157-165.
- ❖ Dröge W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 82:47-95.
- ❖ Duke RC., Ojcius DM., Ding E., Young C. (1996). Cell suicide in health and disease. *Sci Am.* 275:80-87.



- ❖ Eskandari MR., Mashayekhi V., Krocak TJ., Aslani M., Hosseini MJ. (2015). Toxicity of thallium on isolated rat liver mitochondria: the role of oxidative stress and MPT pore opening. *Environ Toxicol.* 30: 232-241.
- ❖ Esposito E., Paterniti I., Mazzon E., Genovese T., Galuppo M., Meli R., Bramanti P., Cuzzocrea S., (2011). MK-801 attenuates secondary injury in a mouse experimental compression model of spinal cord trauma. *BMC Neurosci.*14; 12-31.
- ❖ Farina M., Achner M., Rocha JB. (2011). Oxidative-stress in MeHg-induced neurotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 256:405-417.
- ❖ Farina M., Avila D.S., Rocha JB., Achner M. (2013). Metals, oxidative stress and neurodegeneration: a focus on iron, manganese and mercury. *Neurochem Int.* 62:575-594.
- ❖ Favari L., Mourelle M. (1985). Thallium replaces potassium in activation of the (Na<sup>+</sup> / K<sup>+</sup>)-ATPase of rat liver plasma membranes. *J Appl Toxicol.* 5:32-34.
- ❖ Friberg H., Connern C., Halestrap AP., Wieloch T. (1999). Differences in the activation of the mitochondrial permeability transition among brain regions in the rat correlate with selective vulnerability. *J Neurochem.* 72: 2488-2497.
- ❖ Galván-Arzate S., Ríos C. (1994). Thallium distribution in organs and brain regions of developing rats. *Toxicol.* 90: 63-69.
- ❖ Galván-Arzate S., Santamaría A. (1998). Thallium toxicity. *Toxicol Lett.* 99: 1-13.

- ❖ Galván-Arzate S., Martínez A, Medina E., Santamaría A., Ríos C. (2000). Subchronic administration of sublethal doses of thallium to rats: effects on distribution and lipid peroxidation in brain regions. *Toxicol Lett.* 116: 37-43.
- ❖ Galván-Arzate S., Pedraza-Chaverri J., Medina-Campos ON., Maldonado PD., Vázquez-Román B., Ríos C., Santamaría A. (2005). Delayed effects of thallium in rat brain: regional changes in lipid peroxidation and behavioral markers, but moderate alterations in antioxidants, after a single administration. *Food Chem Toxicol.* 43: 1037-1045.
- ❖ García-Vargas GG., Rothenberg SJ., Silbergeld EK, Weaver V., Zamoiski R., Resnick C., Rubio-Andrade M., Parsons PJ., Steuerwald AJ., Navas-Acién A., Guallar E. (2014). Spatial clustering of toxic trace elements in adolescents around Torreón, México lead-zinc smelter. *J Expo Sci Environ Epidemiol.* 24:634-642.
- ❖ Gilbert ME., Lasley SM. (2007). Developmental lead (Pb) exposure reduces the ability of the NMDA antagonist MK-801 to suppress long-term potentiation (LPT) in the rat dentate gyrus, in vivo. *Neurotoxicol Teratol.* 29:385-393.
- ❖ Gorter JA., Botterblom MH., Feenstra MG., Boer GJ. (1992). Chronic neonatal NMDA receptor blockade with MK-801 alters monoamine metabolism in the adult rat. *Neurosci Lett.* 137: 97-100.
- ❖ Hafeman DG., Sunde RA, Hoekstra WG. (1974). Effect of dietary selenium on erythrocyte and liver glutathione peroxidase in the rat. *J Nut.* 104: 580-587.

- ❖ Haidara K., Moffantt P., Denizaeu F. (1999). Metallothionein induction attenuates the effects of glutathione depletors in rat hepatocytes. *Toxicol Sci.* 49:297-305.
- ❖ Halliwell B., Gutteridge J. (1999). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press (Clarendon), Oxford, U.K.
- ❖ Hammouri FA., Darwazeh G., Said A., Ghosh RA. (2011). Acute Thallium poisoning: series of ten cases. *J Med Toxicol.* 7:306-311.
- ❖ Hanzel CE., Verstraeten SV. (2006).Thallium induces hydrogen peroxide generation by impairing mitochondrial fuction. *Toxicol Appl Pharmacol.* 216:485-492.
- ❖ Hanzel CE., Verstraeten SV. (2009). TI (I) and TI (III) activity both mitochondrial and extrinsic pathways of apoptosis in rat pheochromocytoma (PCL12) cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 236: 59-70.
- ❖ Hara MR., Agrawal N., Kim SF., Cascio MB., Fujimoro M., Ozaki Y., Takahoshi M., Cheah JH., Tankou SK., Hester LD., Ferris CD., Haywaed SD., Snyder SH., Sawa A. (2005). S-Nitrosylated GADPH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding *Nat. Cell Biol.* 7: 665-674.
- ❖ Hardingham GE. (2009). Coupling of the NMDA receptor to neuroprotective and neurodestructive events. *Biochem Soc Trans.* 37:1147-1160.
- ❖ Hasan M., Ali S.F. (1981). Effects of thallium, nickel and cobalt administration on the lipid peroxidation in different regions of the rat brain. *Toxicol Appl Pharmacol.* 57:8-13.

- ❖ Heffes C.S., Mullick F.G. (1995). Métodos histopatológicos. Editores prophet E.B. Mills B., Arrinton J.B., Sobin L.H., Instituto de patología AFIP y ARP USA, 280p.
- ❖ Heim M., Wappelhorst O., Markert B. (2002). Thallium in terrestrial environments-occurrence and effects. *Ecotoxicol.* 11:369-377.
- ❖ Hissin P.J., Hilf R. (1976). A fluorometric methods for determination of oxidize and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem.* 74: 214-226.
- ❖ Imaizumi K., Morihara, T., Mori Y., Katayama T., Tsuda M., Furuyama T., Wanaka A., Takeda M., Tohyama M. (1999). The cell death-promoting gene DP5, which interacts with the Bcl-2 family, is induced during neuronal apoptosis following exposure to amyloid beta protein. *J Biol Chem.* 274: 7975-7981.
- ❖ Jacquard C., Triouler Y., Cosker F., Escartin C., Bizat N., Hantraye P., Cancela JM., Bonvento G., Brouillet E. (2006). Brain mitochondrial defects amplify intracellular  $[Ca^{2+}]$  rise and neurodegeneration but not  $Ca^{2+}$  entry during NMDA receptor activation. *FASEB J.* 20:1021-1023.
- ❖ Kaur P., Aschner M., Syversen T. (2006). Glutathione modulation influences methyl mercury induced neurotoxicity in primary cell cultures of neurons and astrocytes. *Neurotoxicol.* 27:492-500.
- ❖ Kawabe K., Iwasaki T., Ichitani Y. (2007). Repeated treatment with N-methyl-D-aspartate antagonist in neonatal, but not adult, rats causes long-term deficits of radial-arm maze learning. *Brain Res.* 1169:77-86.

- ❖ Kehrer JP. (1993). Free radicals as mediator of tissues injury and disease. *Crit Rev Toxicol.* 23: 21-48.
- ❖ Kern JC., Kehrer JP. (2005). Free radicals and apoptosis: relationships with glutathione, thioredoxin and the BCL family of proteins. *Front Biosci.* 1:1727-1738.
- ❖ Kluck RM., Bossy-Wetzel E., Green DR., Newmeyer DD. (1997). The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation apoptosis. *Science.* 275:1132-1136.
- ❖ Korotkov SM., Glazunov VV., Yagodina OV. (2007). Increase in the toxic effects of  $Tl^+$  on isolated rat liver mitochondria in the presence of nonactin. *J Biochem Mol Toxicol.* 21:81-91.
- ❖ Korotkov SM., Emel'yanova OV., Yagonina OV. (2008). Inorganic phosphate stimulates the toxic effects of  $Tl^+$  in rat liver mitochondria. *J Biochem Mol Toxicol.* 22:148-157.
- ❖ Korotkov SM. (2009). Effects of  $Tl (+)$  on ion permeability, membrane potential and respiration of isolated rat liver mitochondria. *J Bioenerg Biomembr.* 41: 277-287.
- ❖ Korotkov SM., Brailovskaya IV., Kormilitsyn BN., Fauraev VV. (2014).  $Tl (+)$  showed negligible interaction with inner membrane sulfhydryl groups of rat liver mitochondria, but formed complexes with matrix proteins. *J Biochem Mol Toxicol.* 28: 149-156.

- ❖ Kovacic P., Somanathan R. (2010). Clinical physiology and mechanism of dizocilpine (MK-801): electron transfer, radicals, redox metabolites and bioactivity. *Oxid Med Cell Longev.* 3: 13-22.
- ❖ Kovacic P., Pozos RS., Somanathan R., Shangari N., O'Brien P.J. (2005). Mechanisms of mitochondrial uncouplers, inhibitors, and toxins: focus on electron transfer, free radicals and structure-activity relationships. *Curr Med Chem.* 12:2601-2623.
- ❖ Kumar V., Bel A., Gil KD. (2008). Impairment of mitochondrial energy metabolism in different regions of rat brain following chronic exposure to aluminium. *Brain Res.* 1232:94-103.
- ❖ Kumar V., Bal A., Gill KD. (2009) Susceptibility of mitochondrial superoxide dismutase to aluminium induced oxidative damage. *Toxicol.* 255:117-123.
- ❖ Léveillé F., Papadia S., Fricker M., Bell KF., Soriano FX., Martell MA., Puddifoot C., Habel M., Wyllie DJ., Ikonomidou C., Tolkovsky AM., Hardingham GE. (2010). Suppression of the intrinsic apoptosis pathway by synaptic activity. *J Neurosci.* 30: 2623-2635.
- ❖ Li S., Xiao T., Zheng B. (2012). Medical geology of arsenic, selenium and thallium in China. *Sci Total Environ.* 422: 31-40.
- ❖ Lim AL, Taylor DA., Malone DT. (2012). Consequences of early life MK-801 administration: long-term behavioural effects and relevance to schizophrenia research. *Behav Brain Res.* 277:276-286.

- ❖ Lipton SA. (1993). Prospects for clinically-tolerated NMDA antagonists: open-channel blockers and alternative redox states of nitric oxide. *Trend Neurosci.* 16: 527-532.
- ❖ Lipton SA (2006). NMDA receptors, glial cells and clinical medicine. *Neuron* 50: 9-11.
- ❖ Lowry OH., Rosebrough NJ., Farr A., Randall RJ. (1951). Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J Biol Chem.* 193: 265-275.
- ❖ Lu CL., Huang CC., Chang YC., Tsai YT., Kuo HC., Chuang YH., Shih TS. (2007). Short-term Thallium intoxication: dermatological findings correlated with thallium concentration. *Arch Dermatol.* 143: 93-98.
- ❖ Lynch DR., Guttman RP. (2001). NMDA receptor pharmacology: perspectives from molecular biology. *Curr Drug Targets* 2: 215-231.
- ❖ Lynch DR., Guttman RP. (2002). Excitotoxicity: Perspective based on N-Methyl-D- Aspartate receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther.* 300:717-723.
- ❖ Marchetti C. (2003). Molecular targets of lead in brain neurotoxicity. *Neurotox Res* 5:221-236.
- ❖ Masella R., Dinedeto R., Vari R., Filesi C., Giovannini C. (2005). Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem.* 16:577-589.
- ❖ Mayer ML., Westbrook GL. (1987). Permeation and block of N-methyl-D-aspartate receptor channels by divalent cations in mouse culture central neurone. *J Physiol.* 394:501-527.

- ❖ McEligot AJ., Yang S., Meyskens FL. (2005). Redox regulation by intrinsic species and extrinsic nutrients in normal and cancer cells. *Ann Rev Nutr* 25:261-295.
- ❖ Melcher CL. (2000). Scintillation crystal for PET. *J Nucl Med.* 41:1051-1055.
- ❖ Miller DM., Buettner GR., Aust SD. (1990). Transition metals as catalysts of autoxidation reactions. *Free Radic Biol Med.* 8:95-108.
- ❖ Miyazaki A., Kimura A., Tao H. (2012). Distribution of indium, thallium and bismuth in the environmental water of Japan. *Bull Environ Contam Toxicol.* 89:1211-1215.
- ❖ Motawaj M., Burbán A., Davenas E., Gbahou F., Faucard R., Morisset S., Arrang JM. (2010). The histaminergic system: a target for innovative treatments of cognitive deficits. *Therapie* 65:415-422.
- ❖ Moyanova SG., Kortenska LV., Mitreva RG., Pashova VD., Ngomba RT., Nicoletti F. (2007). Multimodal assessment of neuroprotection applied to the use of MK-801 in the endothelin-1 model of transient focal brain ischemia. *Brain Res.* 1153:58-67.
- ❖ Mulkey JP, Oehme FW. (1993). A review thallium toxicity. *Vet Human Toxicol.* 35:445-453.
- ❖ Nasr P., Gursahani HI., Pang Z., Bondaka V., Lee J., Handley RW., Geddes JW. (2003). Influence of cytosolic and mitochondrial  $Ca^{2+}$ , ATP, mitochondrial membrane potential and calpain activity on mechanisms of neuron death induced by 3-nitropropionic acid. *Neurochem Int.* 43: 89-99.



- ❖ Nihei MK., Guilarte TR. (1999). NMDA-2A subunit protein expression is induced in hippocampus in rat exposed to  $Pb^{2+}$  during development. *Brain Res Mol Brain Res.* 66:42-49.
- ❖ Nihei MK., Desmond NL., McGlothan JL., Kuhlman AC., Guilarte TR. (2000). N-methyl-D-aspartate receptor subunit changes are associated with lead-induced deficits of long-term potentiation and spatial learning. *Neurosci.*99:233-242.
- ❖ Nihei MK, Guilarte TR. (2001). Molecular changes in glutamatergic synapses induced by  $Pb^{2+}$ : association with deficits of LTP and spatial learning. *Neurotoxicol.* 22:635-643.
- ❖ Niki E., Yoshida Y., Saito Y., Noguchi N. (2005). Lipid peroxidation: mechanism, inhibition and biological effects. *Biochem Biophys Res Commun.* 338:668-676.
- ❖ Niki E. (2009). Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects. *Free Radical Biol Med.* 47:469-484.
- ❖ Nriagu JO. Thallium in the environment. *Wiley Series in advances in environmental Science and Technology*, vol 29. John Wiley and Sons; 1998.
- ❖ Okamoto S., Li, Z., Ju C., Scholzke MN., Mathews E., Cui J., Salvesen GS., Bossy-Wetzael E., Lipton SA. (2002). Dominant-interfering forms of MEF2 generated caspase cleavage contribute to NMDA-induced neuronal apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99:3974-3979.

- ❖ Omelchenko IA., Nelson CS., Allen CN. (1997). Lead inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors containing NR2A, NR2C and NR2D subunits. *J Pharmacol Exp Ther.* 282: 1458-1464.
- ❖ O'Neill MJ., Bogaert L., Hicks CA., Bond A., Ward MA., Ebinger G., Ornstein PL., Michotte Y., Lodge D. (2000). LY377770. A novel iGlu5 kainate receptor antagonist with neuroprotective effects in global and focal cerebral ischemia. *Neuropharmacol.* 39: 1575-1588.
- ❖ Otsuka H., Terazawa K., Morita N., Otomi Y., Takao S., Iwamoto S., Harada M., Nishitani H. (2009). Thallium-201 chloride scintigraphy in soft tissue tumors. *J Med Invest.* 56:136-41.
- ❖ Pagnanelli RA, Basso DA. (2010). Myocardial perfusion imaging with <sup>201</sup>Tl. *J Nucl Med Technol.* 38: 1-3.
- ❖ Paoletti P., Bellone C., Zhou Q. (2013). NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci.* 14:383-400.
- ❖ Pastore A., Federici G., Bertini E., Piemonte F. (2003). Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clin Chim Acta.* 333:19-39.
- ❖ Pérez-De La Cruz V., Santamaría A. (2007). Integrative hypothesis for Huntington's disease : a brief of experimental evidence. *Physiol Res.* 56 : 513-526.
- ❖ Peter AL., Viraraghavan T. (2005). Thallium : a review of public health an enviromental concerns. *Environ Int.* 31 :493-501.

- ❖ Pourahmad J., O'Brien PJ. (2001). Biological reactive intermediates that mediate chromium (VI) toxicity. *Adv Exp Med Biol.* 500: 203-207.
- ❖ Pourahmad J., Eskandari MR., Daraei B. (2010). A comparison of hepatocyte cytotoxic mechanism for thallium (I) and Thallium (III). *Envior Toxicol* 25 :456-467.
- ❖ Porter NA., Caldwell SE., Mills KA. (1995). Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids* 30:277-290.
- ❖ Ríos C., Galván-Arzate S., Tapia R. (1989). Brain regional thallium distribution in rats acutely intoxicated with TI 2SO4. *Arch Toxicol.* 63, 34-37.
- ❖ Ríos C., Monroy-Noyola A. (1992). D-penicilamina and Prussian blue as antidotes against thallium intoxication in rats. *Toxicol.* 74:69-76.
- ❖ Sadiq S., Ghazala Z., Chowdhury A., Büsselberg D. (2012). Metal toxicity at synapse: presynaptic, postsynaptic, and long-term effects. *J Toxicol* 2012: 1-42.
- ❖ Santos FW., Zeni G., Rocha JB., Weis SN., Fachinetto JM., Favero AM., Nogueira CW. (2005). Diphenyl diselenide reverses cadmium-induced oxidative damage on mice tissues. *Chem. Biol. Interact.* 151:159-165.
- ❖ Sastry PS., Rao KS. (2000). Apoptosis and nervous system. *J Neurochem.* 74: 1-20.
- ❖ Schafer FQ., Buettner GR. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med.* 30: 1191-1212.

- ❖ Shanker G., Syversen T., Aschner JL., Aschner M. (2005). Modulatory effect of glutathione status and antioxidants on methylmercury-induced free radical formation in primary cultures of cerebral astrocytes. *Brain Res Mol Brain Res* 137: 11-22.
- ❖ Schulz JB., Matthews RT., Henshaw DR., Beal MF. (1996). Neuroprotective strategies for treatment lesions produced by mitochondrial toxins: implications for neurodegenerative diseases. *Neuroscience* 71: 1043-1048.
- ❖ Sheng M., Cummings J., Roldan LA., Jan YN., Jan LY. (1994) Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex. *Nature* 368:144-147.
- ❖ Selakovic V., Janac B., Radenovic L. (2010). Mk-801 effect on regional cerebral oxidative stress rate induced by different duration of global ischemia in gerbils. *Mol Cell Biochem.* 342: 35-50.
- ❖ Sencer A., Arica O., Kirin T., Görgülü A., Aktan D. (2008). Effects of memantine and MK-801 on ischemia in an experimental model of acute subdural hematoma. *Neurol Res.* 30: 497-503.
- ❖ Stayner LT., Dankovic DA., Lemen RA. (1996). Occupational exposure to chrysotile asbestos and cancer risk: a review of the amphibole hypothesis. *Am J Public Health.* 86: 179-186.
- ❖ Tao Z., Gemiro A., Grewer C. (2008). Thallium ions can replace both sodium and potassium ions in glutamate transporter amino acid carrier 1. *Biochem.* 47:12923-12930.

- ❖ Thompson CL., Drewery DL., Atkins HD., Stephenson FA., Chazot PL. (2000). Immunohistochemical localization of N-methyl-D-aspartate receptor NR1, NR2A, NR2B and NR2C/D subunits in the adult mammalian cerebellum. *Neurosci Lett.* 283:85-88.
- ❖ Tremel A., Masson P., Sterckeman T., Baize D., Mench M. (1997). Thallium in French agrosystems: I. Thallium contents in arable soils. *Environ Pollut.* 95: 293-302.
- ❖ Triggs WJ., Willmore, L. (1984). In vivo lipid peroxidation in rat brain following intracortical Fe<sup>2+</sup> injection. *J Neurochem.* 42: 976-980.
- ❖ Turner A., Turner D., Braungardt C. (2013). Biomonitoring of thallium availability in two estuaries of southwest England. *Mar Pollut Bull.* 69: 172-177.
- ❖ Valko M., Morris H., Mazúr M., Raptá P., Bilton RF. (2001). Oxygen free radical generating mechanisms in the colon: Do the semiquinones of Vitamin K play a role in the aetiology of colon cancer? *Biochim Biophys Acta.* 1527: 161-166.
- ❖ Valko M., Morris H., Cronin MT. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem.* 12:1161-1208.
- ❖ Valko M., Rhodes CJ., Moncol J., Izakovic M., Mazur M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress induced cancer. *Chem Biol Interact.* 160:1-40.

- ❖ Vezzani A., Serafini R., Stasi NA., Caccia S., Conti I., Tridico RV., Samanin R. (1989). Kinetics of MK-801 and its effect on quinolinic acid-induced seizures and neurotoxicity in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 289-283.
- ❖ Villaverde MS., Hanzel CE., Verstraeten SV. (2004). In vitro interactions of thallium with components of glutathione-dependent antioxidant defense system. *Free Radic Res.* 38: 977-984.
- ❖ Volbrach C., Van Beek J., Zhu C., Blomgren K., Leist M. (2006). Neuroprotective properties of memantine in different in vitro and in vivo models of excitotoxicity. *Eur J Neurosci.* 23: 2611-2622.
- ❖ Wafford KA., Bain CJ., Le Bourdelles B., Whiting PJ., Kemp JA. (1993). Preferential co-assembly of recombinant NMDA receptors composed of three different subunits. *Neuroreport.* 4:1347-1349.
- ❖ Wang Y., Qin AH. (2010). Molecular and cellular mechanism of excitotoxic neuronal death. *Apoptosis* 15: 1382-1402.
- ❖ Wanger T., Scheich H., Ohl FW., Goldschmidt J. (2012). The use of thallium diethyldithiocarbamate for mapping CNS potassium metabolism and neuronal activity;  $Tl^+$  redistribution  $Tl^+$ -kinetics and  $Tl^+$  equilibrium distribution. *J Neurochem.* 122:106-114.
- ❖ Winterbourn CC. (1995). Free radical toxicology and antioxidant defense. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 22: 877-880.
- ❖ Wollmuth LP., Sobolevsky AI. (2004). Structure and gating of the glutamate receptor ion channel. *Trends Neurosci.* 27: 321-328.

- ❖ Woods JS, Fowler BA. (1986). Alteration of hepatocellular structure and function by thallium chloride: ultrastructure morphometric and biochemical studies. *Toxicol Appl Pharmacol.* 83: 218-229.
- ❖ Wyllie AH., Kerr, JF., Currie, AR. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol.* 68: 251-306.
- ❖ Xia W., Du X., Zhang B., Li Y., Bassig BA., Zhou A., et al.(2015). A case-control study of prenatal thallium exposure and low birth weight in China. *Environ Health Perspect.* DOI:10.1289/ehp.1409202.
- ❖ Xiao T, Guha J., Boyle D., Liu Q., Zheng B., Wilson GC., Rouleau A., Chen J. (2004). Naturally occurring thallium a hidden geoenvironmental health hazard? *Environ Int.* 30:501-507.
- ❖ Xu B., Xu Z., Deng Y. (2010). Protective effects of MK-801 on manganese-induced glutamate metabolism disorder in rat striatum. *Exp Toxicol Pathol.* 62: 381-390.
- ❖ Yang QZ., Hatton GI. (1997). Electrophysiology of excitatory and inhibitory afferents to rat histaminergic tuberomammillary nucleus neurons from hypothalamic and forebrain sites. *Brain Res.* 773: 162-172.
- ❖ Zamoiski RD, Guallar E., García-Vargas GG., Rothenberg SJ., Resnick C., Andrade MR., Steuerwald AJ., Parson PJ., Weaver VM., Navas-Acien A., Silbergeld EK. (2014). Association of arsenic and metals with concentrations of 25-hydroxyvitamin D and 1, 25-dihydroxyvitamin D among adolescents in Torreón, México. *Environ Health Perspect.* 122: 1233-1238.

- ❖ Zhang LN., Sun YJ., Pan S., Li JX., Li Y., Wang YL., Gao ZB. (2013). Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase, a potent neuroprotective modulator against Alzheimer. *Fundam Clin Pharmacol.* 27: 96-103.
- ❖ Zhou Q., Sheng M. (2013). NMDA receptors in nervous system diseases. *Neuropharmacol.* 74: 69-75.
- ❖ Zierold K. (2000). Heavy metal cytotoxicity studied by electron probe X-ray microanalysis of cultured hepatocytes. *Toxicol In Vitro.* 14: 557-563.
- ❖ Zukin RS., Bennett MV. (1995). Alternatively spliced isoforms of the NMDAR1 receptor subunit. *Trends Neurosci.* 18:441.