

R.153 97

T. 1149

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

**DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA,
BROMATOLOGIA Y TOXICOLOGIA.**

**ESTUDIO DEL EFECTO DE LA VITAMINA E, EL SELENIO,
EL DEPRENILO Y LA ACETIL-L-CARNITINA SOBRE LA
ACCION TOXICA DEL 1-METIL-4-FENILPIRIDINIO.**

Tesis que presenta la Lda.
Vera Maria Steffen
para optar al grado de Doctor
en Farmacia.

Sevilla, 13 de Mayo de 1994

219434509

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

**DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA, BROMATOLOGIA Y
TOXICOLOGIA.**

Tesis que presenta la Lda. Vera Maria Steffen para
optar el grado de Doctor en Farmacia.



Fdo. Vera Maria Steffen

Director



Fdo. Dr. Alberto Machado
de la Quintana

Director



Fdo. Dra. Josefina Cano García

ALBERTO MACHADO DE LA QUINTANA, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA, BROMATOLOGIA Y TOXICOLOGIA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA.

CERTIFICA: Que la tesis doctoral titulada "**Estudio del efecto de la vitamina E, el selenio, el deprenilo y la acetil-L-carnitina sobre el efecto tóxico del 1-metil-4-fenilpiridinio**", presentada por la Lda. VERA MARIA STEFFEN para optar al grado de Doctor en Farmacia, ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica, Bromatología y Toxicología de la Universidad de Sevilla, reuniendo los requisitos exigidos.

Y para que así conste, firmamos el presente certificado en Sevilla, 13 de Mayo de 1994.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'A. Machado', with a horizontal line extending to the right.

Fdo. Alberto Machado de la Quintana

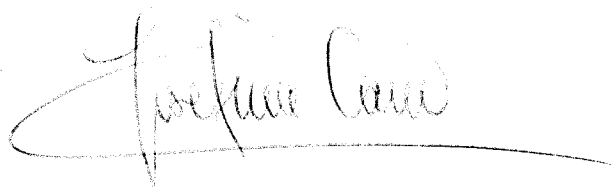
**ALBERTO MACHADO DE LA QUINTANA, CATEDRATICO
NUMERARIO Y JOSEFINA CANO GARCIA, PROFESORA
TITULAR, DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA,
BROMATOLOGIA Y TOXICOLOGIA DE LA UNIVERSIDAD
DE SEVILLA.**

CERTIFICAN: Que la tesis doctoral titulada "Estudio del efecto de la vitamina E, el selenio, el deprenilo y la acetil-L-carnitina sobre el efecto tóxico del 1-metil-4-fenilpiridinio", presentada por la Lda. VERA MARIA STEFFEN para optar al grado de Doctor en Farmacia, ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica, Bromatología y Toxicología de la Universidad de Sevilla, reuniendo los requisitos exigidos.

Y para que así conste, firmamos el presente certificado en Sevilla, 13 de Mayo de 1994.



Fdo. Alberto Machado
de la Quintana



Fdo. Josefina Cano García

Agradecimientos

Quiero expresar mi gratitud al Dr. Alberto Machado de la Quintana por darme la oportunidad de venir a este Departamento para realizar este trabajo, y por la especial atención y dedicación que ha puesto en mi formación investigadora .

A la Dra. Josefina Cano, por su amabilidad y disponibilidad en todo momento, por la orientación científica de mi trabajo y el empeño que ha puesto para que fueran posibles las publicaciones.

A Antonio José, por la gran simpatía y paciencia que ha mostrado tener conmigo desde mi llegada a este laboratorio, en especial la dedicación en la corrección ortográfica de este trabajo.

A Marisa, mi compañera de trabajo, por su amistad y por todo lo que me ha enseñado.

A Martiniano, por su inestimable ayuda técnica, sin la cual no habría sido posible parte de este trabajo, y por los buenos consejos en la escritura y corrección de la tesis.

A Antonio Ayala y José Luis por la confianza y el tiempo de trabajo compartido.

A Enrique, por su gran ayuda en el trabajo con los animales y su amistad.

A los profesores Consuelo Santa-María, Elisa Revilla, Javier Vitorica, Juan Bautista Palomas, por su buena disposición en ayudarme en todo momento.

A Angélica, Cristina, Diego, Eloisa, Paco, Inmaculada, Isabel, José Antonio, Juan Parrado, María José, Mati, Marina, Mohammed, Pepa, Piupa, por los buenos y malos ratos que hemos compartidos durante los 4 años y medio de convivencia en el laboratorio y fuera de él. Todos en algún momento me han ayudado de una forma particular, lo que ha hecho más agradable mi estancia en España.

A todos los amigos que he hecho en España, a los que no nombro pero no olvido.

A Flávio, por ser la persona que es.

A mis padres

A mis hijos Ricardo

Leandro(en memoria)

1.INTRODUCCION	1
1.1 Radicales libres	2
1.2 Vitamina E	5
1.3 Selenio	9
1.4 Acetil-L-carnitina	13
1.5 Enfermedad de Parkinson	15
1.6 Aspectos bioquímicos de la toxicidad del MPP ⁺	22
1.7 Deprenilo	27
1.8 Ganglios basales	32
2. OBJETIVOS	38
3. MATERIAL Y METODOS	41
3.1 Animales de experimentación	42
3.2 Dietas utilizadas	42
3.3 Productos y reactivos	48
3.4 Aparatos	50
3.5 Medidas de aminas biógenas y sus metabolitos en cerebro	51
3.6 Determinación de aminoácidos por HPLC en fase reversa	52
3.6.1 Determinación de triptófano	54
3.7 Medida de actividades enzimáticas	54
3.7.1 Actividad glutatión peroxidasa	54

3.7.2	Actividad superóxido dismutasa	54
3.7.3	Actividad catalasa	55
3.8	Medida de la cantidad de proteína	55
3.9	Tratamiento con deprenilo	55
3.10	Cortes en estriado	56
3.11	Medidas de grupos carbonilos	56
3.12	Tratamiento con acetil-L-carnitina	57
3.13	Estudio del efecto de la acetil-L-carnitina "in vivo"	57
3.14	Inyección del MPP ⁺ en ventrículo lateral	58
3.15	Cuantificación de Tirosina Hidroxilasa	59
3.16	Cuantificación de Neurofilamentos y Glía	60
3.17	Análisis estadístico	60
4.	RESULTADOS	61
4.1	Efecto de la disminución en la dieta de la vitamina E o selenio	62
4.1.1	Dieta deficiente en vitamina E	62
4.1.1.1	Peso corporal y cantidad de dieta ingerida	62
4.1.1.2	Estudio de diferentes mecanismos de protección frente a las oxidaciones: Actividades de las enzimas glutatión peroxidasa, SOD y catalasa	63
4.1.1.3	Estudio de los niveles de aminoácidos en sustancia negra, estriado e hipocampo de ratas tratadas con dieta deficiente en vitamina E durante 15 días	64

4.1.1.4 Efecto del MPP ⁺ en las concentraciones de DA y sus metabolitos en cortes de estriado de ratas controles y alimentadas con dieta deficiente en vitamina E	66
4.1.2 Dieta deficiente en selenio	68
4.1.2.1 Peso corporal y cantidad de dieta ingerida	68
4.1.2.2 Estudio de diferentes mecanismos de protección frente a las oxidaciones: actividades de las enzimas glutatión peroxidasa, SOD y catalasa	68
4.1.2.3 Efecto de la disminución de la capacidad protectora frente a las oxidaciones producidas por la alimentación deficiente en selenio sobre la acción tóxica del MPP ⁺	69
4.2 Efecto del tratamiento con deprenilo, inhibidor de la enzima monoamina oxidasa, sobre la acción tóxica del MPP ⁺	71
4.2.1. Efecto del MPP ⁺ en la concentración de DA y sus metabolitos	71
4.2.2 Estudio de diferentes mecanismos de protección frente a las oxidaciones: actividades de las enzimas glutatión peroxidasa, SOD y catalasa	73
4.2.3 Grupos carbonilos	73
4.4 Tratamiento con aceti-l-carnitina	75
4.4.1 Estudio "in vivo" :	75
4.4.2.1 Mortalidad	77
4.4.2.2 Efecto del tratamiento con ALC en la neurotoxicidad del MPP ⁺ en sustancia negra y estriado	77
4.4.2.3 Efecto del tratamiento con ALC en la neurotoxicidad del MPP ⁺ en bulbo olfatorio, eminencia media e hipófisis	79

4.4.2.4 Efecto del tratamiento de la ALC frente al neurotóxico MPP+ en relación a la cantidad de Tirosina Hidroxilasa, Neurofilamentos y Glía en estriado y sustancia negra	85
5. DISCUSION	87
6. CONCLUSIONES	102
7. BIBLIOGRAFIA	105

1. INTRODUCCION

1.1. RADICALES LIBRES

Los radicales libres están implicados en reacciones bioquímicas que son parte de la función normal de la célula. Existen evidencias que indican que los radicales libres pueden causar daño oxidativo a moléculas biológicas, incluyendo proteínas, lípidos y DNA (Mello y Meneghini, 1984; Halliwell y Gutteridge, 1985). En el sistema nervioso central, donde las membranas contienen una concentración elevada de lípidos insaturados, los radicales libres tienden a reaccionar con los ácidos grasos poliinsaturados, causando peroxidación lipídica, daños en la membrana y muerte celular. La oxidación normalmente ocurre como resultado de la transferencia de un solo electrón de los metales de transición, como el hierro, cobre y manganeso. El hierro es el más abundante de los metales presentes en el organismo, y puede catalizar reacciones de oxidación (Fig.1). La toxicidad de estas reacciones de oxidación es causada primeramente por la generación de radicales hidroxilos ($^{\circ}\text{OH}$), generados a partir del peróxido de hidrógeno (H_2O_2), los cuales reaccionan directamente con el hierro (Halliwell y Gutteridge, 1985). (Fig.2).

El organismo posee mecanismos de protección para evitar el acúmulo de radicales libres generados por reacciones de oxidación. La enzima superóxido dismutasa elimina por catalización los radicales superóxidos ($\text{O}_2^{\circ-}$) convirtiéndolos en peróxido de hidrógeno y oxígeno (McCord y Fridovich, 1969). El peróxido de hidrógeno puede ser eliminado por las enzimas catalasa y peroxidasas. Entre las peroxidasas está la glutatión peroxidasa, que junto con la glutatión reductasa juegan un papel importante en la eliminación del peróxido de hidrógeno, evitando así la acumulación de radicales hidroxilos (Cohen, 1985). Los "scavengers" de radicales libres, tales como el α -tocoferol (vitamina E), interaccionan con los radicales libres y protegen a las membranas celulares de la peroxidación lipídica. En el cerebro, el mecanismo de defensa más importante es el sistema glutatión-reductasa/glutatión peroxidasa el cual transforma el peróxido de hidrógeno en H_2O por acción de la enzima glutatión peroxidasa (Fig. 3). No obstante, el sistema glutatión es saturable por lo que un aumento en la producción de peróxido de hidrógeno en presencia del radical superóxido (Reacción de Haber-Weiss) o en presencia de hierro ferroso (Reacción de Fenton),

produce la formación de radicales hidroxilos con el consecuente daño en los tejidos. (Fig. 2) (Halliwell y Gutteridge, 1985; Spina y Cohen, 1989).

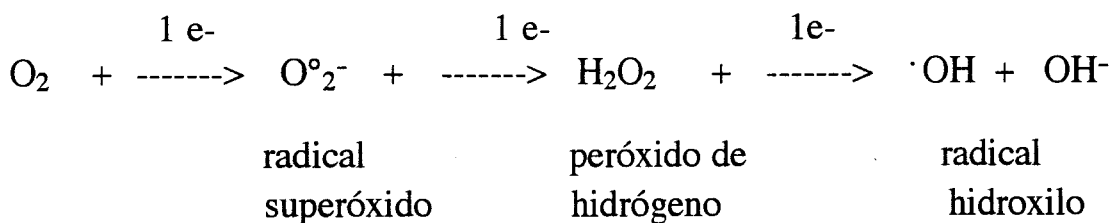
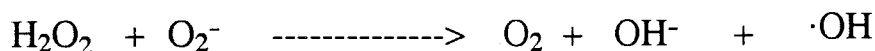


Fig.1. La reducción de oxígeno forma el radical libre hidroxilo. El oxígeno recibe un electrón y forma el radical superóxido. En solución acuosa, $\text{O}_2^{\cdot-}$ recibe un electrón adicional y forma el peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno acepta un electrón y forma el radical libre hidroxilo. Los radicales hidroxilos son el primer mecanismo por el cual las reacciones de oxidación causan daño a los tejidos y pueden inducir peroxidación lipídica causando alteraciones en la integridad y funciones bioquímicas de la membrana.

1. Reacción de Haber-Weiss



2. Reacción de Fenton

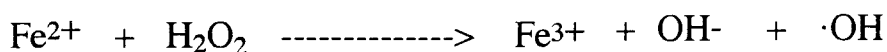
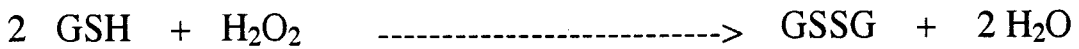


Fig. 2. Generación de radicales libres hidroxilo por las reacciones de Haber-Weiss y Fenton. El peróxido de hidrógeno es reducido y forma el radical libre hidroxilo, que es tóxico, mediante el transporte de un electrón del radical superóxido (Haber-Weiss) o por el paso de hierro en estado ferroso a estado férrico (Reacción de Fenton). En condiciones fisiológicas la reacción de Haber-Weiss es muy lenta y los radicales hidroxilo son normalmente formados por la reacción de Fenton.

Glutación peroxidasa



Glutación reductasa

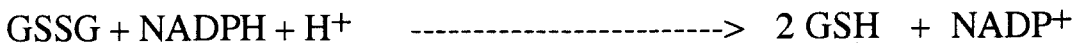


Fig.3 En el cerebro el sistema glutación es un mecanismo fundamental de eliminación de H_2O_2 y de protección contra la formación de radicales libres hidroxilo. La glutación peroxidasa cataliza la reacción de 2 moléculas de glutación con peróxido de hidrógeno para formar glutación oxidado y H_2O . El glutación puede ser recuperado por la reducción del glutación oxidado en una reacción catalizada por la glutación reductasa. El NADPH consumido en esta reacción se produce fundamentalmente en el ciclo de las pentosas fosfafos, el cual es necesá-rio para mantener la actividad antioxidante del sistema.

El catabolismo de la DA mediado por la enzima monoamina oxidasa (MAO) produce un "pool" de peróxido de hidrógeno (Fig.4). En varios estudios se ha visto que la actividad MAO B, que cataliza la oxidación de la DA, aumenta con la edad (Fowler y col.,1980). Un aumento en el metabolismo de la DA podría aumentar la formación de peróxido de hidrógeno y exceder la capacidad antioxidante del sistema glutación. De la misma manera, una disminución de glutación o de glutación peroxidasa podría impedir la eliminación del peróxido de hidrógeno generado por el metabolismo normal de la DA, causando un aumento en la concentración de H_2O_2 que podría no ser eliminado adecuadamente por el sistema del glutación, lo que conduciría a la formación de radicales libres hidroxilo, que pueden causar daño o contribuir al ya producido por la DA.

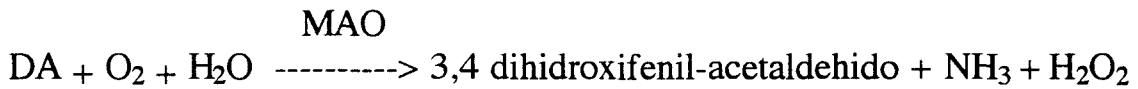


Fig.4 La oxidación de la DA por la MAO forma peróxido de hidrógeno. En estriado de cerebro humano, la DA es metabolizada principalmente por la MAO B.

El cerebro humano es particularmente vulnerable a las reacciones de oxidación debido a que:

1) Contiene altas concentraciones de lípidos poliinsaturados, que sirven como sustrato para la peroxidación lipídica.

2) Recibe un porcentaje de oxígeno muy alto en relación al oxígeno total presente en el organismo.

3) Es relativamente deficiente en mecanismos protectores. Por ejemplo: posee menos cantidad de glutatión, glutatión peroxidasa y tocoferol comparado con el hígado.

4) El hierro está presente en altas concentraciones en regiones específicas del cerebro.

1.2 VITAMINA E

La vitamina E es un nutriente esencial en los animales (incluido el hombre), que no son capaces de sintetizarla. Su requerimiento depende de los niveles de otros constituyentes de la dieta, tales como grasas poliinsaturadas, aminoácidos azufrados, otras vitaminas liposolubles, selenio, antioxidantes, prooxidantes, etc. La deficiencia en vitamina E, rara dado que esta vitamina está ampliamente distribuida en la naturaleza, está asociada normalmente a procesos que cursan con mala absorción de la vitamina E de la dieta.

Entre el 20 y el 40% de la vitamina E de la dieta es absorbida por el intestino (Blomstrand y col., 1968). En el organismo, la vitamina E es metabolizada por oxidación dando quinonas que son irreversibles o bien radicales α -tocoferil que son reducidos por acción de la vitamina C, volviendo a dar α -tocoferol activo (Bendich y col., 1984; 1986).

El hígado actúa como una reserva de vitamina E de turnover rápido, mientras que el tejido adiposo es de turnover lento (Machling y col., 1979; Traber y col., 1984). La presencia de vitamina E en el tejido adiposo se piensa que es simplemente debida a su carácter liposoluble, mientras que es en los fosfolípidos de las mitocondrias y microsomas donde la vitamina E se encuentra íntimamente relacionada con su actividad en la prevención de la peroxidación en estos orgánulos (Lucy, 1972). En los animales, la vitamina E está principalmente concentrada en los fosfolípidos de las mitocondrias, retículo endoplásmico y membranas plasmáticas celulares, donde ejerce su papel fundamental como antioxidante al ceder un H^+ a los radicales libres, reduciendo a éstos y formando radical α -tocoferil. De esta forma, protege a los fosfolípidos del ataque por radicales libres y evita así la destrucción de orgánulos como mitocondrias y microsomas. La vitamina E sería una primera línea de defensa mientras que el selenio constituiría una segunda línea a través de la glutatión peroxidasa. Un mecanismo por el que se podrían explicar las diversas alteraciones en las deficiencias de vitamina E es la modificación en la producción de ATP como consecuencia de la peroxidación de los lípidos de las membranas mitocondriales (Heffron y col., 1978; Hornsby y col., 1982).

Ya hemos indicado que la deficiencia en vitamina E no es frecuente dada su amplia distribución en la naturaleza tanto en productos de origen vegetal como animal; sin embargo existen una serie de enfermedades crónicas que cursan con malaabsorción de grasas y dan lugar a bajos niveles séricos de vitamina E; son las llamadas deficiencias secundarias de vitamina E. Entre ellas está la abetalipoproteinemia que se caracteriza por una deficiencia infantil en la síntesis de apolipoproteína B, esencial para la secreción de betalipoproteínas, principales transportadores de la vitamina E circulante (Sokol, 1989). Otras enfermedades son la fibrosis cística o la colestasis crónica. Todas ellas dan lugar a alteraciones en el sistema nervioso y músculo (ataxia,

degeneración axonal, encefalomacia, etc) que se presentan desde los primeros estadios de la vida. Existe además una deficiencia primaria que no está asociada a síndromes de mala absorción (Stumpt y col., 1987). La causa principal de esta enfermedad no está clara. Sólo se sabe que es un error en el metabolismo de la vitamina E que aparece antes del nacimiento. Al igual que las otras deficiencias, presenta ataxia o neuropatías periféricas aunque no presenta lesiones retinales, por lo que se sugiere que en las deficiencias secundarias que cursan con retinopatías debe existir una carencia de vit.A y otros nutrientes esenciales además de una deficiencia en vit. E (Sokol, 1989). No olvidemos que la vitamina E protege las reservas tisulares de vitamina A frente a la peroxidación (Witting, 1977). Por tanto, en pacientes con alteraciones neurológicas y sin síntomas de mala absorción, también se debe estudiar los niveles séricos de vitamina E. En todas estas enfermedades, dado que presentan bajos niveles séricos de vitamina E, se ha administrado ésta en el tratamiento, consiguiéndose una mejoría en algunos síntomas, si bien la mejoría es mayor cuanto menos avanzados estén los desórdenes del sistema nervioso y muscular (Muller y col.,1976; Burck y col., 1981; Harding y col., 1982; Sokol y col., 1987). De gran interés es el papel de la vitamina E en la anemia hemolítica presente en niños prematuros, que revierte al administrar esta vitamina.

El papel neurológico de la vitamina E fue descrito por primera vez por el doctor Evans en 1928. En el cerebro, la vitamina E se encuentra fundamentalmente en las membranas de mitocondrias, microsomas y sinaptosomas ejerciendo su papel de "scavenger" de radicales libres, evitando así la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados y de las proteínas ricas en grupos tioles, constituyentes de las membranas celulares y del citoesqueleto (Tappel, 1962). En la neurona en desarrollo, existe una zona rica en ácidos grasos poliinsaturados llamada "cono de crecimiento", responsable de establecer las relaciones entre neuronas, proceso esencial en el desarrollo del sistema nervioso (Pfenninger, 1986); la oxidación de los ácidos grasos de la membrana plasmática del cono podría alterar la expresión de proteínas de membranas y los segundos mensajeros. Esto concuerda con el hecho de que en sistemas nerviosos inmaduros los trastornos causados por la deficiencia en vitamina E son más severos que en los ya desarrollados.

Otra función importante de la vitamina E en el cerebro es el

control de la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos (Meydani y col., 1985), así como en la síntesis de ácidos nucleicos (Castignani, 1980).

El mecanismo preciso por el que la vitamina E pasa desde las lipoproteínas circulantes hasta el cerebro, médula espinal, nervios periféricos y músculo no está aún bien establecido. Lo que sí se sabe es que la distribución no es uniforme, ni en el sistema nervioso central ni en el periférico (Vatassery y col., 1984). En la deficiencia en vitamina E los centros nerviosos afectados (bulbo, médula espinal y cerebelo), tienen bajo contenido en vitamina E, inferior a la de otros centros y además, menor en los animales jóvenes que en los viejos (Vatassery y col., 1984; Vatassery, 1987). La relación entre vitamina E y las alteraciones neurológicas no se conoció durante muchos años. Sin embargo, hoy existen un gran número de evidencias que demuestran la existencia de esta relación. En el hombre, una deficiencia prolongada en vitamina E puede provocar ataxia espinocerebelar con pérdida de reflejos, alteraciones en la percepción de la postura y de la vibración, oftalmoplegia, debilidad muscular, escoliosis... Estos síntomas aparecen tanto en la deficiencia asociada a síndromes de mala absorción (Guggenheim y col., 1982; Muller y col., 1983) como en la forma aislada de deficiencia primaria (Sokol y col., 1988). La presencia de deformaciones esféricas en las membranas axonales es típica en deficiencias de vitamina E y en procesos de envejecimiento; estas distrofias axonales se han encontrado en los fascículos delgados y cuneiforme de ratas, monos y hombres con colestasis crónica (Rosenblum y col., 1981), fibrosis cística (Hayes y col., 1969) y otros problemas de absorción de grasas (Weder y col., 1984). Las proyecciones axonales de estas neuronas hacia la zona posterior de la médula espinal y nervios sensoriales periféricos también sufren distrofia y posterior desmielinización (Landrieu y col., 1985), lo que se conoce como distrofia neuroaxonal. Otra característica encontrada en ratas, monos y humanos con deficiencia en vitamina E es la presencia de acúmulos de lipofuscina en neuronas sensoriales dorsales y en el citoplasma de la célula de Schwann en los nervios periféricos (Hayes y col., 1969). Los acúmulos de lipofuscina a nivel neuronal y la distrofia neuroaxonal son comunmente observados después de la tercera década de la vida en personas normales, por lo que se puede establecer un paralelismo entre la deficiencia en vitamina E y el proceso de envejecimiento (Sokol, 1989).

En los procesos patológicos ya descritos, los daños se encontraban principalmente a nivel del sistema nervioso periférico y a nivel muscular. Sin embargo, existen alteraciones a nivel del sistema nervioso central en las que la vitamina E puede jugar un papel fundamental, como la enfermedad de Batten o lipofuscinosis neuronal ceroida que cursa con retraso mental progresivo y en la que se ha señalado la deficiencia en los sistemas antioxidantes de las neuronas (Santivuori y col., 1984).

En el tratamiento del Parkinson, se ha utilizado una mezcla de deprenilo y vitamina E (Snyder y D'Amato, 1986). Este tratamiento sería de tipo preventivo, durante los primeros estadios de la enfermedad, así como en personas con alto riesgo.

1.3 SELENIO

En el hombre, la importancia del selenio se hizo patente cuando se vió que enfermedades endémicas de ciertas zonas de China con suelos pobres en selenio revertían si se administraba este elemento; es el caso de la enfermedad de Keshan, cardiomiopatía que afecta a mujeres jóvenes y niños, y la enfermedad de Kaschin-Beck que es una osteoartropatía (Keshan Disease Research Group, 1979).

Los enfermos con alimentación parenteral durante tiempo prolongado presentan bajos niveles séricos de selenio y pueden llegar a desarrollar alteraciones como distrofia muscular (Van Rij y col., 1979) o cardiomiopatías (Quercia y col., 1984). En pacientes con dieta exclusivamente parenteral, los niveles séricos de selenio bajan tras dos meses de dieta (McGee y col., 1985).

La más conocida de las funciones del selenio es formar parte del centro activo de la glutatión peroxidasa. Esta enzima, que está presente en el citosol y en la matriz mitocondrial de la célula, así como en fluidos corporales, está formada por cuatro subunidades idénticas entre sí y cada una de ellas con un átomo de selenio en forma de selenocisteína unido covalentemente en su estructura primaria (Forstrom y col., 1978). Como ya hemos visto en apartados anteriores, esta enzima cataliza el paso de

peróxido de hidrógeno a agua con intervención del GSH, que es oxidado y posteriormente regenerado por acción de la glutatión reductasa (Fig. 3). Por tanto el papel del selenio en el metabolismo celular sería la protección frente al daño producido por radicales libres. La función del selenio en los procesos de óxido-reducción se entiende fácilmente si se tiene en cuenta que pertenece al grupo VIa de la tabla periódica, situado entre el azufre y el telurio y presentando propiedades de no metal como el primero o de metal como el segundo. Así sus estados de oxidación varían, siendo +6, +4, 0 y -2.

Al hablar de la vitamina E hemos visto que las funciones de ésta y del selenio están íntimamente ligadas, siendo el selenio una segunda línea de defensa frente a la peroxidación lipídica en la membranas biológicas. La distrofia muscular de origen nutricional en oveja y cabra no responde al tratamiento con vitamina E si los niveles de selenio no son los adecuados (Madson y col., 1935).

El selenio tiene una actividad antitumoral, ya que cuando se administra a dosis farmacológicas (por encima de las nutricionales), forma selenodiglutatión, que es un inhibidor de la síntesis proteica, evitando así la proliferación de la células cancerígenas (Schrauzer, 1988). Por ello el uso del selenio esta indicado en la prevención del cáncer

Estudios realizados en animales de laboratorio demuestran que la absorción del selenio va a depender de la forma en que se encuentre en los alimentos. La selenometionina se absorbe en el intestino por un transporte activo que, al utilizar el mismo transportador que la metionina, es inhibido por altas concentraciones de este aminoácido (McConell y Cho, 1965); la absorción de selenometionina depende de la bomba de Na⁺ (McConell y Cho, 1967). En forma de selenocisteína (se estima que aproximadamente el 85% del selenio en el organismo de la rata está como selenocisteína) (Deagen y col., 1991), la absorción es por difusión. Otros autores han estudiado la absorción de selenito y selenato en íleon de rata siendo la absorción de selenato mediada por transportador superior a la de selenito, que se absorbe por difusión (Wolffram, 1985). La absorción de selenio estudiada en el hombre con el isótopo ⁷⁴Se en forma de selenito, muestra un valor del 76% (Janghorbani y col., 1982).

La vía de excreción más importante para el selenio es la orina,

siendo el riñón el órgano encargado de mantener su homeostasis en el organismo.

En cuanto a la distribución del selenio en el organismo, estudios en ratas demuestran que la mayor reserva de selenio es el hígado, seguido en orden decreciente por el pulmón, corazón, músculo, cerebro y eritrocitos (Gromadzinska y col., 1988). Igualmente, en estos órganos existe una relación directa entre la actividad glutatión peroxidasa y la cantidad de selenio presente en el tejido, e inversa entre la actividad glutatión peroxidasa y la cantidad de peróxidos lipídicos. La actividad glutatión peroxidasa dependiente de selenio es, en todos estos órganos, superior a la independiente de selenio (Gromadzinska y col., 1988).

Los niveles normales de selenio en el organismo y sus requerimientos varían ampliamente de unos lugares del mundo a otros (Nève, 1988) ya que los niveles de selenio en suelo y, por tanto, en los alimentos, varían según las características del mismo (Thorling, 1986). Las necesidades de selenio en el organismo también van a depender de factores como la edad, el sexo, deficiencia en vitamina E, hierro o vitamina B₁₂ (Hoekstra, 1975), y situaciones especiales como son la lactancia y la gestación (Butler y col., 1982; Robinson y col., 1985). Los habitantes de países con tierras pobres en selenio (como por ejemplo, China o Nueva Zelanda), presentan niveles de selenio en plasma entre 20-30 $\mu\text{g/l}$, mientras que en países como Estados Unidos, Canadá o Japón, con suelos ricos en selenio, los niveles están entre 100-200 $\mu\text{g/l}$ de plasma (Thorling, 1986). En Europa hay un amplio rango entre 50 y 110 $\mu\text{g/l}$. Valores inferiores a lo 30 $\mu\text{g/l}$ están asociados a síndromes de deficiencia (Van Rij y col., 1979; Yang y col., 1984) como distrofia muscular o cardiomiopatías.

En la novena edición de la RDAs (Recommended Dietary Allowance), el selenio aparece como un mineral esencial para el hombre (Recommended Dietary Allowances, 1980) y las necesidades diarias se establecen entre 50-200 $\mu\text{g/día}$. Sin embargo, estas recomendaciones han sido revisadas en estudios posteriores. Las necesidades diarias de selenio no pueden ser fijadas de forma general. Estudios metabólicos realizados por Levander y Morris (1984) en Estados Unidos estiman que las necesidades son de 80 μg de selenio/día para el hombre y 57 $\mu\text{g/día}$ para la mujer. Sin embargo, en China se calculan necesidades por debajo de los

10 $\mu\text{g}/\text{día}$. Esto se explica porque el organismo adapta la excreción urinaria de selenio a los niveles corporales (Robinson y col., 1985).

La mejor aproximación para conocer los niveles y requerimientos del selenio es a través de la actividad glutatión peroxidasa (Paglia y Valentine, 1970), ya que nos da una idea del estado del selenio desde un punto de vista funcional. La medida de esta actividad en eritrocitos indicaría los niveles de selenio en el organismo a largo plazo, dado que el eritrocito tiene un turnover relativamente lento en la sangre (Perona y col., 1978), mientras que las plaquetas, de turnover rápido, nos dan una idea de los niveles de selenio de una población en un momento dado (Nève y Carpentier, 1989). Estudios realizados con la medida de la actividad glutatión peroxidasa en plaquetas, calculan necesidades diarias de selenio en China sobre 40 $\mu\text{g}/\text{día}$ y para Estados Unidos entre 50-70 $\mu\text{g}/\text{día}$.

El selenio tiene un papel importante en el envejecimiento y en el sistema nervioso central, ya que tanto en enfermedades neurológicas como en el envejecimiento se han observado niveles bajos de selenio. Se puede decir que el selenio es importante para la prevención de la disminución de la respuesta inmune y de la acumulación de peróxidos lipídicos que se observan en el envejecimiento (Pryor, 1987). La administración de selenio junto con otros antioxidantes como la vitamina E a pacientes geriátricos disminuye las concentraciones de malondialdehído en suero. Asimismo se observa una correlación negativa entre los niveles séricos de selenio y los productos derivados de la peroxidación de lípidos (Pryor, 1987).

En la lipofuccinosis neuronal ceroida, de la que ya hemos hablado anteriormente, se observa una deficiencia en selenio así como una correlación entre disfunción neurológica y la actividad glutatión peroxidasa (Santivuori, 1988). A nivel del sistema nervioso central, estudios con ratas demuestran que los ácidos grasos poliinsaturados de la región sináptica son protegidos de la peroxidación, al menos en parte, por el selenio (Clausen, 1991). El rápido envejecimiento y degeneración neuronal que aparece en los enfermos con síndrome de Down, se ha relacionado con el daño que origina el exceso de producción de peróxido de hidrógeno por la enzima superóxido dismutasa (Sinet y col., 1979), consecuencia de la trisomía del cromosoma 21 donde se encuentra el gen

que codifica la SOD. Estudios en fetos con síndrome de Down demuestran que la actividad glutatión peroxidasa en eritrocitos es elevada; no así en el cerebro (Brooksbank y Balazs, 1984), donde además se presenta un elevado índice de peroxidación lipídica y alteraciones en la composición en ácidos grasos poliinsaturados (Brooksbank y Balazs, 1984). Por ello, los cambios en la corteza cerebral de estos pacientes pueden ser un reflejo de un metabolismo inadecuado del peróxido de hidrógeno y, por tanto, del daño por radicales libres. Además, estos pacientes pueden presentar demencia de tipo Alzheimer que, al igual que el Parkinson, ha sido relacionada con el daño por radicales libres (Volicer y Crino, 1990).

1.4. ACETIL-L-CARNITINA

La carnitina (ácido 3-hidroxi-4-N-trimetilaminobutírico) existe en la dieta de forma natural, particularmente en los productos animales, y puede ser sintetizada endogenamente a través de dos amino ácidos esenciales, la metionina y la lisina (la metionina que proporciona los grupos metilos y la lisina la cadena carbonada y el nitrógeno). La síntesis de carnitina tiene lugar en el hígado y riñon y requiere varios otros componentes, incluyendo entre ellos ascorbato, niacina, vit. B₆, hierro (Broquist, 1988; Feller y Rudman, 1988). La carnitina parece ser un nutriente esencial en determinadas condiciones específicas como malnutrición, prematuros, en mujeres embarazadas y en período de lactancia, en pacientes que reciben diálisis, o nutrición parenteral y en pacientes con enfermedades relacionadas con el hígado. El almacenamiento de la carnitina es en músculo esquelético y cardiaco. La carnitina esta presente en el plasma en forma libre y de ésteres de acilcarnitina (Bieber y Lewin, 1981) y de la misma forma son excretados (Montgomery y Mamer, 1989).

La L-carnitina tiene distintas funciones. Su función en el metabolismo energético de los ácidos grasos es problamente la más conocida. Esta es la de facilitar la entrada de ácidos grasos de cadena larga en la mitocondria para su utilización en el proceso de generación de energia. Los ácidos grasos de cadena larga, como ésteres de CoA, son

transesterificados a L-carnitina en la reacción catalizada por la carnitina palmitoil transferasa I (E.C. 2.3.2.21) en la membrana externa de la mitocondria. Los ésteres de acilcarnitina de cadena larga entran en la mitocondria via un transportador específico acilcarnitina translocasa. Los ácidos de cadena larga no pueden entrar en la mitocondria independiente de su translocación como un éster de carnitina.

La acetil-L-carnitina (ALC) es una sustancia endógena sintetizada en la mitocondria por la enzima ALC-transferasa. La ALC también participa en la función energética como transportador de grupos acetil fuera de la mitocondria y está relacionada con la captación de ácidos grasos de cadena larga activados para su ingreso en el interior de la mitocondria (Fritz, 1963; Moris y Carey, 1983). La ALC moviliza grupos acetil y estimula la síntesis de proteínas y fosfolípidos de membrana (Falcheto y col., 1971; Janiri y col., 1983). Esta función energética la tiene en todos los tejidos incluido en SNC. Se produce un incremento en la velocidad de oxidación cerebral de ácidos grasos de cadena larga cuando la carnitina es añadida a homogeneizado de cerebro (Fritz, 1963); la mitocondria cerebral oxida ALC a velocidades comparables a otros tejidos (Brenner, 1962; Clark y Nicklas, 1970). La actividad acetil transferasa está presente en el tejido nervioso (McCamen y col., 1966). Paradies y col. (1992), han propuesto que la ALC puede restaurar la composición de fosfolípidos (a nivel de cardiolipina) en la membrana mitocondrial alterada por la edad, y por lo tanto, restaurar la actividad del transportador fosfato.

Esta función energética puede ser importante para los diferentes efectos protectores del envejecimiento del SNC descritos tras su administración prolongada. Se ha descrito que la ALC tiene efectos benéficos en desordenes asociados al envejecimiento con deficiencia colinérgica, tales como Alzheimer (Loeb y col., 1985; Bonavita, 1986; Calvani y col., 1986). Sin embargo, el efecto de la ALC en el SNC parece ser debido también a una acción específica sobre el SNC.

Varios de los efectos beneficiosos atribuidos a la ALC son debidos al efecto positivo en el sistema colinérgico, debido a su semejanza estructural con la acetil colina (Dolezal y Tucek., 1981; White y Scates, 1990). Estudios experimentales muestran que la ALC aumenta la actividad de acetil-CoA y colina acetil transferasa, la captación de la

colina y la liberación de acetil colina (Imperato y col., 1989). Estos resultados apoyan la observación de que la ALC puede tener actividad colinérgica (Onofrij y col., 1983). Por otro lado, ALC es capaz de disminuir los cambios en la morfología cerebral del envejecimiento, en los niveles de receptores de hormonas esteroides, en el factor de crecimiento y enzimas (Fariello y col., 1988; Angelucci y col., 1988; Patacchioli y col., 1989).

La ALC tiene además otros efectos en el SNC, como por ejemplo, se ha observado un aumento en los niveles de GABA y el antioxidante glutatión reducido en sustancia negra de ratones sometidos a su administración repetida (Fariello y col., 1988). El tratamiento a largo plazo con ALC induce un aumento en la expresión del receptor de NGF en el SNC de roedores adultos (Angelucci y col., 1988), así como en una línea celular que responde a NGF (Pérez-Polo y col., 1988). La ALC también posee efectos benéficos en el sistema dopaminérgico. Sershen y col. (1991) mostrarán que la ALC aumenta la liberación de [³H]-dopamina provocada por estimulación eléctrica y disminuye la reducción en el número de receptores D1 dopaminérgicos en estriado que ocurre en el envejecimiento.

1.5 ENFERMEDAD DE PARKINSON

El Parkinson es un desorden neurodegenerativo progresivo de los ganglios basales, que afecta a uno de cada 500 individuos (Jenner, 1992) o a 10 de cada 100.000 individuos con menos de 45 años y 140 de cada 100.000 hasta 75 años (Schoenberg, 1987). Los síntomas iniciales de la enfermedad son rigidez muscular, bradiquinesia, pérdida de peso, depresión y disminución de la capacidad intelectual. Después de 10 a 15 años de enfermedad se llega a la completa aquinesia. Los exámenes "post-mortem" de los cerebros de enfermos de Parkinson revelan un gran número de anormalidades neuroquímicas e histológicas. La más importante es la degeneración de células pigmentadas de la sustancia negra compacta y la disminución de la liberación de DA en el estriado desde las terminales nerviosas del tracto nigroestriado. La muerte celular va acompañada de la aparición de inclusiones eosinofílicas llamadas

"cuerpos de Lewy". El tratamiento con L-DOPA o agonistas dopaminérgicos puede reemplazar a la DA y con ésto retrasar los síntomas de la enfermedad, pero no evita la progresión de la degeneración celular. El sistema dopaminérgico tiene una mayor degeneración con la edad que otros sistemas neuronales. En un individuo normal los niveles de DA decrecen un 13% cada década y los síntomas del Parkinson sólo aparecen cuando la degeneración llega al 70% (Riederer y Wuketich, 1976). Una aquinesia severa esta asociada a una perdida del 95% de DA.

Actualmente se considera de gran interés el papel que el medio ambiente juega en el origen de la enfermedad de Parkinson. Una serie de estudios epidemiológicos han sugerido una relación entre la industrialización y el uso de pesticidas con el desarrollo de la enfermedad (Tanner, 1989). Sin embargo el desarrollo del Parkinson en personas jóvenes (menores de 40 años) tiene una correlación con la exposición temprana al medio rural unido al consumo de agua de pozo. Estos estudios concluyen que el factor tóxico existente en el medio ambiente conlleva a un aumento en la incidencia del Parkinson, pero hay además otros factores que deben contribuir al desarrollo de esta enfermedad. En Quebec hubo una alta correlación (0,97) entre el Parkinson y el uso de pesticidas (Barbeau, 1985). En una hacienda en el sudeste de Montreal, se usaron pesticidas en grandes cantidades y la incidencia del Parkinson fue 7 veces mayor que en regiones donde éstos fueron usados en pequeñas cantidades.

Según varios estudios, el Parkinson en general no es considerado como una enfermedad genética primaria, aunque en un 10% de los pacientes el origen podría tener algún componente genético (Duvoisin, 1986). Estudios familiares recientes sugieren que puede existir algún factor hereditario en algunos casos de Parkinson (Golbe y col., 1990; Jonhson y col., 1990; Maraganore y col., 1991).

Existe la opinión de que los individuos que desarrollan la enfermedad de Parkinson tienen una susceptibilidad mayor a la acción de las toxinas o una menor capacidad para destoxificar contaminantes ambientales. Esto está basado en una disminución en la capacidad de los enfermos de Parkinson para metabolizar sustratos endógenos y

xenobióticos por una serie de enzimas principalmente implicadas en el metabolismo del disulfuro (Steventon y col., 1989; Waring y col., 1989).

Desde el descubrimiento de que en el Parkinson se produce una pérdida importante de la dopamina en el estriado, se han buscado modelos animales para el estudio de esta enfermedad. En 1977, un estudiante de 23 años de edad desarrolló repentinamente los síntomas del Parkinson. El paciente admitió que había sintetizado y utilizado algunas droga. Al visitar su laboratorio se descubrió que había algunas piridinas, entre la que se encontraba el MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina) formado como un subproducto en la síntesis del éster de meperidina (MPPP) (Davis y col.,1979). También un químico industrial desarrolló la enfermedad a los 37 años de edad después de trabajar con MPTP como intermediario sintético sin haberlo ingerido (Langston y col., 1983). La absorción se produjo por inhalación y a través de la piel. La identificación del MPTP como un tóxico selectivo de la sustancia negra proporcionó un gran avance al estudio de esta enfermedad (Davis y col.,1979; Burns y col., 1983; Langston y col.,1983; 1984).

El MPTP atraviesa la barrera hematoencefálica, es metabolizado por la MAO B y produce el compuesto intermediario dihidropiridio (MPDP⁺) el cual a su vez es convertido a la especie piridio (MPP⁺) (Salach y col., 1984; Heikkila y col., 1985). El MPP⁺ es transportado al interior de las terminales dopaminérgicas (Javitch y col., 1985) acumulandose en la mitocondria e inhibiendo la cadena respiratoria mitocondrial a nivel del complejo I (Nicklas y col.,1985; Ramsay y col., 1986;) De esta manera inicia la depleción del ATP (Di Monte y col., 1986) alterando la homeostasis del calcio celular (Kass y col., 1988) y produciendo la muerte celular.

Se acepta que la incidencia del Parkinson aumenta con la edad, ya que el número de células que contienen DA en la sustancia negra disminuye con la edad. Así, un proceso acelerado de envejecimiento podría disminuir el número de neuronas hasta un nivel a partir del cual se iniciaría la enfermedad de Parkinson (McGeer y col., 1989). Sin embargo el patrón de degeneración celular que ocurre en sustancia negra durante el envejecimiento normal es distinto al observado en en Parkinson (Fearnely and Lees, 1991). En la patología del Parkinson, la

perdida neuronal en la región ventrolateral es más marcada ,mientras que en el envejecimiento normal es la parte dorsal la que está más afectada. Otra hipótesis es que el daño celular ocasionado por la exposición temprana a tóxicos reduce el número de neuronas dopaminérgicas; la pérdida neuronal normal debida al envejecimiento añadida a esta degeneración previa haría que se alcance el límite de degeneración neuronal necesario para el desarrollo de la enfermedad de Parkinson más tempranamente.

Una teoría más reciente es que el número de neuronas dopaminérgicas en sustancia negra disminuye lentamente por procesos tóxicos continuos, que producen una formación excesiva de radicales libres e inducen de este modo a un estado de estrés oxidativo que favorece el desarrollo de la enfermedad de Parkinson. Como estrés oxidativo se entiende el balance que existe en las células entre las sustancias prooxidantes y las antioxidantes (Sohal y Allen, 1985; 1986), existiendo una relación entre ellos puesto que los oxidantes inducen un aumento de los antioxidantes endógenos que protegen a las células de la oxidación, manteniéndose el estado rédox de la célula por un mecanismo de retroalimentación.

El estrés oxidativo puede ser causado por la acción de neurotoxinas o por la alteración del propio metabolismo de la DA. La autooxidación de la DA hasta neuromelanina genera tóxicos tales como semiquinonas, que pueden ser tóxicas para las células dopaminérgicas de la sustancia negra (Graham, 1978). El metabolismo de la DA via MAO produce peróxido de hidrógeno que puede ser convertido en radicales hidroxilo tóxicos por un mecanismo catalizado por hierro (Cohen, 1987; Youdin y col., 1989). El metabolismo de la DA puede estar alterado en estadios tempranos de la enfermedad de Parkinson, produciéndose un aumento en el turnover de DA, lo que genera un aumento en los niveles de peróxido de hidrógeno y, consecuentemente, de radicales hidroxilo. En ratones el incremento del turnover de la DA puede aumentar la formación de peróxido de hidrógeno y llevar a una depleción del glutatión reducido que se puede revertir por inhibidores de la MAO B (Cohen y Spina., 1989).

La peroxidación lipídica apoya la teoría de que en la enfermedad

de Parkinson se produce un estrés oxidativo. En la sustancia negra de enfermos de Parkinson se produce un aumento en los niveles de malondialdehído, intermediario estable en la peroxidación lipídica, que no se produce en otras regiones del cerebro (Dexter y col., 1989a). Dicho aumento en la formación de malondialdehído es paralelo a una pequeña pero significativa disminución en los niveles de sustratos de ácidos grasos poliinsaturados.

En la sustancia negra de enfermos de Parkinson la peroxidación lipídica está aumentada unas diez veces comparada con la de los controles (Dexter y col., 1991b), lo que apoya la idea de que en un estadio avanzado de la enfermedad se produce un proceso reactivo continuo en esta estructura. En base a los estudios actuales, no podemos excluir la posibilidad de que el aumento de la peroxidación lipídica sea debido al tratamiento con drogas. La acumulación de L-DOPA y otros agonistas dopaminérgicos tras su administración se produce en un amplio rango de áreas cerebrales, en tanto que el aumento de la peroxidación sólo fue observado en la sustancia negra.

La implicación del estrés oxidativo en la enfermedad de Parkinson sugiere una incapacidad de los mecanismos normales de protección para inactivar radicales de especies tóxicas. Sin embargo, diferentes autores muestran resultados diferentes cuando valoran los niveles de glutatión, catalasa, glutatión peroxidasa (Ambani y col., 1975; Kish y col., 1985; Pery y Yong, 1986; Martilla y col., 1988; Riederer y col., 1989; Johanssen y col., 1991). La cuestión que se plantea entonces es si la administración de antioxidantes puede suministrar o no una protección contra la progresión de la enfermedad (Dexter y col., 1991c).

De especial interés son también los estudios realizados sobre la actividad glutatión peroxidasa en el Parkinson. Como vimos al hablar de los radicales libres, existe una teoría que apunta como causa de esta enfermedad los daños que causa en el sistema nervioso central el desequilibrio en los sistemas antioxidantes. Perry y colaboradores (1982) encuentran que los niveles de GSH en el sistema nervioso de pacientes parkinsonianos están muy disminuídos; Kish y colaboradores (1985) encuentran además una actividad glutatión peroxidasa baja, si bien Poirier y Barbeau (1987) no encuentran en estos pacientes alteraciones en las

enzimas protectoras frente a radicales libres. Esta falta de acuerdo entre unos resultados y otros se debe a que los pacientes utilizados para el estudio no presentan uniformidad en cuanto al grado de la enfermedad (Johanssen y col., 1991). Pacientes con síntomas recientes de la enfermedad tienen niveles de actividad glutatión peroxidasa superiores a aquellos que llevan varios años con tratamiento de L-DOPA, e incluso presentan las alteraciones motoras que derivan de esta terapia (Johanssen y col., 1991); estos niveles bajos de actividad no dependen de la edad del paciente sino del tiempo que lleve con los síntomas de la enfermedad. No se sabe si estos niveles de actividad están relacionados con la patogénesis de la enfermedad o son consecuencia del tratamiento (Johanssen y col., 1991), ya que se sabe que el tratamiento prolongado con L-DOPA origina estrés oxidativo, pues esta droga es susceptible de sufrir autooxidación originando radicales de oxígeno (Parson, 1985). Mas recientemente Riederer y colaboradores (1989) demostraron una disminución en el nivel del glutatión en sustancia negra en enfermos de Parkinson que tiene correlación con el estado de la enfermedad.

La actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en sustancia negra de enfermos de Parkinson es muy importante por dos razones: a) el radical superóxido puede ser formado a partir del MPTP y sus metabolitos; b) esta enzima existe bajo dos isoformas: una está presente en el citosol y otra asociada a la membrana mitocondrial en el sitio donde el MPP⁺ ejerce su acción tóxica. En los enfermos de Parkinson la enzima SOD total y la fracción citosólica no cambian de actividad, pero la actividad de la forma mitocondrial disminuye en sustancia negra (Saggu y col., 1989). Estos últimos resultados sugieren que en la enfermedad de Parkinson existen cambios selectivos en los mecanismos protectores y pueden conducir a una mayor comprensión de la naturaleza de los procesos tóxicos y en particular su implicación en la alteración de la función mitocondrial.

Los niveles de NADH citocromo c reductasa se encuentran disminuidos en la sustancia negra de enfermos de Parkinson (Schapira y col., 1989). Contrariamente, los niveles de succinato citocromo c reductasa no muestran cambios. El complejo I NADH co-Q10 reductasa, se encuentra reducido en enfermos de Parkinson en relación a individuos sanos (Schapira y col., 1990a). En la enfermedad de Parkinson se

produce una deficiencia en la función mitocondrial en las células de la sustancia negra similar a la que produce el MPP⁺. La deficiencia de la enzima NADH Co-Q reductasa ocurre sólo en sustancia negra de enfermos de Parkinson y no en otras enfermedades, como atrofia múltiple del sistema. Los pacientes con atrofia múltiple del sistema que habían sido tratados antes de su muerte con L-dopa por períodos de tiempo prolongados no presentaban deficiencia del complejo I, por lo que se puede deducir que ésta no parece ser iniciada por tratamiento con drogas.

La deficiencia mitocondrial puede ser debida a la acumulación de algunas toxinas endógenas, que pueden actuar a nivel del complejo I. El hierro es una sustancia que puede estar relacionada con la producción del estrés oxidativo y, por esta razón, con la alteración de la función mitocondrial.

Hay varios estudios que observaron un aumento de hierro en sustancia negra de enfermos del Parkinson, pero no en otras regiones cerebrales (Dexter y col., 1987; 1989b; Sofic y col., 1988; Riederer y col., 1988; 1989). El aumento en los niveles de hierro está restringido a la zona compacta de la sustancia negra (Sofic y col., 1991). También se midieron los niveles de otros metales en cerebros de enfermos de Parkinson (Dexter y col., 1989b), como plomo y manganeso que no cambian, aunque sí hay una disminución en los niveles de cobre y un aumento significativo en los de zinc. El aumento de este ión antioxidante apoya la teoría de que el exceso de hierro está presente en su forma libre y reactiva. Los cambios en el contenido de hierro en cerebro de enfermos de Parkinson no son específicos de estos enfermos (Dexter y col., 1991a) porque también se ha encontrado un aumento de hierro en enfermedades como atrofia múltiple del sistema y otras. Sin embargo en dichas enfermedades el contenido de ferritina y zinc no cambian. Por lo tanto sólo en enfermos de Parkinson se produce a la vez un aumento de hierro y zinc y una disminución del contenido de ferritina. Se puede concluir que la alteración en el metabolismo del hierro puede resultar en una excesiva producción de radicales libres lo que desencadenaría el estrés oxidativo que contribuye a la muerte celular en la sustancia negra.

En resumen, se ha descrito un gran descenso en los niveles de

glutación reducido en cerebro y plasma después de la inyección de MPTP (Ferraro y col.,1986), así como una gran disminución en los niveles de glutación reducido en sustancia negra de enfermos de Parkinson (Perry y col., 1982, 1986).

En estudios "post-mortem" realizados en enfermos de parkinson se observo una serie de cambios bioquímicos en la sustancia negra, entre los cuales cabe destacar un aumento de la peroxidación lipídica, una disminución de los niveles de glutación reducido, un aumento de la actividad superóxido dismutasa, una deficiencia en la función mitocondrial y una alteración del metabolismo del hierro. Sin embargo, la causa primaria de la enfermedad de Parkinson aún permanece desconocida. Una alternativa que se ofrece para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson es el desarrollo de una terapia neuroprotectora que podría mejorar en mucho las condiciones de vida del paciente.

1.6 ASPECTOS BIOQUIMICOS DE LA TOXICIDAD DEL MPP⁺.

Se sabe que el MPTP produce daño mitocondrial por inhibición de la NADH deshidrogenasa (Singer y col., 1987). Como hemos dicho anteriormente, la activación del MPTP por la MAO B ocurre en la mitocondria, la cual secuestra activamente al MPP⁺ con gasto de ATP. La depleción del ATP rompe la cadena respiratoria y causa la muerte celular. Es importante resaltar que la inhibición de la NADH deshidrogenasa por el MPP⁺ es reversible ya que el MPP⁺ es un inhibidor reversible débil de esta enzima, requiriéndose concentraciones en el rango de milimolar para inhibirla. Tras la inhibicion de la NADH deshidrogenasa, los niveles de ATP caen, y la captación de MPP⁺ disminuye. Esto implica un descenso en la concentración mitocondrial de MPP⁺, lo que permite la regeneración de la actividad NADH deshidrogenasa. Por lo tanto, la toxicidad mitocondrial del MPP⁺ es autolimitante, dependiendo de la interacción entre el MPP⁺ y la concentración de ATP.

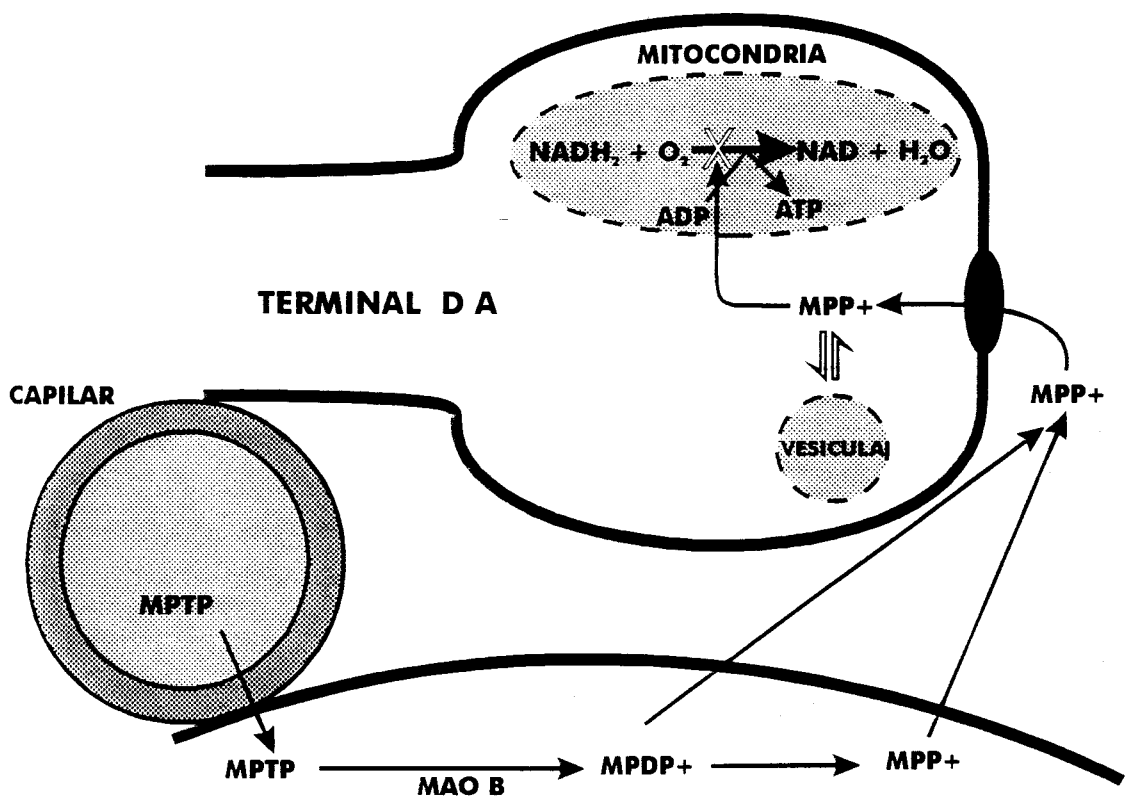


Figura 5. Modelo del mecanismo de acción del MPTP. El MPTP entra rápidamente en el cerebro a través de la circulación debido a su alta liposolubilidad, pasando a la astrogliia. La enzima MAO B convierte el MPTP en MPDP⁺, el cual se transforma en el metabolito tóxico MPP⁺. Inhibidores de la MAO B (como el deprenilo) pueden impedir el paso de MPTP a MPP⁺. Este último es captado y acumulado en las terminales dopaminérgicas por un transportador específico de DA. El sitio de acción del MPP⁺ es la mitocondria, donde es acumulado e inhibe el complejo I de la cadena respiratoria, con la consiguiente disminución de la concentración de ATP.

En el cerebro la transformación del MPTP por la MAO B mitocondrial produce el metabolito tóxico MPP⁺ y peróxido de hidrógeno en astrocitos, neuronas serotoninérgicas y células endoteliales (Chiba y col., 1985). El peróxido de hidrógeno es tóxico para las células cerebrales porque puede producir especies activas de oxígeno tales como el radical hidroxilo (Cohen, 1985). El peróxido de hidrógeno puede ser destoxificado por la glutatión peroxidasa citosólica con la producción de glutatión oxidado (GSSG) el cual es reducido por la glutatión reductasa. El glutatión oxidado es tóxico para las células porque puede alterar la función enzimática de varias proteínas por la formación de un complejo proteínas-glutatión oxidado (Ziegler, 1985).

El estrés oxidativo inducido por la generación de peróxido de hidrógeno puede explicar el daño producido por el MPTP en los astrocitos y células endoteliales (Adams y col., 1989). Estas células forman la barrera hematoencefálica, que impide la entrada del MPTP en el cerebro. Si ésta barrera es dañada puede permitir una mayor entrada de MPTP en las neuronas.

Una hipótesis sobre la acción del MPTP y el estrés oxidativo es que el MPP⁺, metabolito activo del MPTP producido por la acción de la MAO B, es improbable que genere por sí solo especies de radicales libres en el ciclo rédox. (Frank y col., 1987). La reacción rédox se produciría entre MPP⁺ y MPDP⁺, generando radicales superóxido tóxicos (Rossetti y col., 1988). Por lo tanto, se ha sugerido que podría haber una interacción entre MPTP y sus metabolitos con NADH reductasa y NADP citocromo P450 reductasa para generar especies de radicales libres (Adams y Odunze, 1991). Además la inhibición del complejo I de la cadena respiratoria por el MPP⁺ genera un exceso de electrones libres que también contribuyen al estrés oxidativo. En ambos procesos está implicada la MAO B, lo que es un factor muy importante ya que la MAO B aumenta con la edad (Yong y Perry, 1986; Danielczyk y col., 1988; Humfrey y col., 1990).

Un tratamiento previo con dietilditiocarbamato aumenta la toxicidad del MPTP en el estriado (Corsini y col., 1985; Pikarsky y col., 1987). Este compuesto es un inhibidor de las enzimas que contienen cobre

o zinc como la SOD, aldehído deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa. El aumento de la toxicidad del MPTP por dietilditiocarbamato puede indicar que la SOD es importante para proteger a las células frente a la toxicidad del MPTP, probablemente porque elimina el anión radical superóxido. También la administración de etanol o acetaldehído previa al tratamiento con MPTP aumenta su toxicidad en el estriado (Corsini y col., 1987). Naturalmente, serán necesarios más estudios para valorar la importancia de la SOD, alcohol deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa en la toxicidad del MPTP.

Un tema de discusión es que el MPTP o el MPP⁺ no parecen inducir estrés oxidativo en hepatocitos (Smith y col., 1987). Esto puede ser debido a los altos niveles de citocromo P450 presente en estas células, que puede eliminar el MPTP citosólico (Baker y col., 1984), y que previene o disminuye la producción de estrés oxidativo citosólico. Por lo tanto, la toxicidad del MPTP en estas células parece ser un hecho estrictamente mitocondrial. Las neuronas de la SN poseen poca cantidad de P450 (Warner y col., 1988), lo que las hace fundamentalmente diferentes del hepatocito. La toxicidad del MPTP se expresa de manera diferente en los distintos tipos de células, como las pulmonares y células hepáticas. Por lo tanto la patología del MPTP y MPP⁺ es distinta en hígado y pulmón (Johannessen y col., 1986). En el pulmón induce edema periarteriolar, lo que es idéntico a la patología del paraquat y puede producir una severa pérdida de la función pulmonar, en tanto que en el hígado no resulta una patología significativa. Esto indica que el MPTP posee más de un mecanismo de acción.

La peroxidación lipídica puede ser una secuela del estrés oxidativo, especialmente en animales deficientes en vitamina E, ya que especies de oxígeno activo pueden causar daño a los lípidos. Si el acúmulo de lipofucsina es una medida de peroxidación lipídica "in vivo", entonces el MPTP puede inducir una cierta cantidad de peroxidación lipídica en el cerebro y retina de ratones normales. En ambas sustancia negra y retina, un pretratamiento con MPTP produce un aumento de la deposición de lipofucsina en un corto periodo de tiempo (The Parkinson study-group 1989; Myllyla y col., 1991) La peroxidación lipídica ha sido estudiada "in vitro" con MPTP y MPP⁺ utilizando preparaciones de homogeneizado de cerebro. Con MPP⁺ se ha visto que estimula la peroxidación lipídica

(Ríos y Tapia, 1987), mientras que el MPTP la inhibe (Ríos y Tapia, 1987; Lambert y Bondy, 1989). Sin embargo, en presencia de hierro, el MPTP induce peroxidación lipídica y oxidación de dopamina, tal vez por formar el radical MPDP (Poirier y Barbeau., 1987; Lambert y Bondi, 1989).

Se ha comprobado que el glutatión es un antioxidante crítico en la toxicidad del MPP⁺. El glutatión está también implicado en el estrés oxidativo ya que actúa como sustrato para la glutatión peroxidasa. Experimentos llevados a cabo con ratones inyectados intracerebroventricularmente con dietilmaleato (Adams y col.,1989) demuestran una depleción de glutatión en el estriado y mesencéfalo en la misma proporción (60% de los controles). El MPTP es más tóxico en la sustancia negra de ratones en términos de letalidad y depleción de DA. No hubo potenciación en la depleción de DA en el estriado por el pretratamiento de dietilmaleato.

También está descrito que 24 h después del tratamiento con MPTP, el glutatión está disminuido en el mesencéfalo pero no en el estriado (Yong y col., 1986., Ferraro y col.,1986). Además, el glutatión se encuentra disminuido en estriado 2 horas después del tratamiento con MPTP. La depleción del glutatión puede ser una característica de varios agentes que inducen estrés oxidativo, porque es más común que produzca la depleción del glutatión debido a agentes que forman conjugados de glutatión. Sin embargo, el MPTP no parece formar conjugados de glutatión. Una parte de la depleción del glutatión producido por MPTP puede ser causada por disminución de los niveles de ATP, visto que el ATP es necesario para la glutatión sintetasa. La depleción de ATP es producida por el daño mitocondrial causado por el MPTP. Como hemos dicho anterior-mente la glutatión reductasa es una enzima crítica en la regeneración del glutatión durante el estrés oxidativo.

En la literatura existen múltiples ejemplos que indican que el estriado es bioquímicamente diferente de la sustancia negra en términos de respuesta a la toxicidad del MPTP. Los niveles de glutatión son bajos en los cuerpos neuronales y algo más altos en las terminales. Esto hace que los cuerpos neuronales sean más susceptibles al estrés oxidativo que las terminales (Shimizu y col., 1960). Los niveles de vitamina E son algo

más altos en estriado que en sustancia negra (Korytowski y col., 1988). La catalasa, que normalmente elimina el peróxido de hidrógeno peroxisomal, está presente en niveles más bajos en estriado que en SN. La catalasa también disminuye con la edad, lo cual puede explicar parcialmente la mayor sensibilidad de los ratones viejos a la toxicidad del MPTP (Adams y col., 1989). El citocromo P450, que desactiva el MPTP, está presente en cantidades más altas en el estriado que en SN (Kapitulnik y col., 1987; Warner y col., 1988). Otras enzimas de defensa tales como superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa están presentes en niveles similares en estriado y sustancia negra. Los niveles distintos de glutatión y citocromo P450 en las terminales y cuerpos pueden ser el factor más importante en la diferente susceptibilidad al estrés oxidativo de estriado y sustancia negra.

1.7 DEPRENILO

El deprenilo (fenilisopropil-N-metilpropinilamina) fue descubierto en 1961 en Hungría por Z. Ecséri y J. Knoll. Llamado entonces E-250, era una mezcla de las dos formas ópticamente activas, (-) y (+) deprenilo, y fue descrito como un inhibidor irreversible de la monoamino oxidasa (Knoll y col., 1965). Más tarde, los isómeros ópticos del E-250 fueron separados y la forma L fue descrita como menos tóxica recibiendo el nombre genérico de selegiline o (-) deprenilo

En 1968 fueron identificadas dos formas de Monoamino oxidasa, la MAO A y la MAO B. La MAO A es inhibida selectivamente por clorgilina y la MAO B por selegiline (deprenilo). Los sustratos de la MAO A son serotonina y adrenalina, los de la MAO B son fenilalanina (PEA), benzilamina y metil-histamina. La tiramina, octopamina, dopamina, noradrenalina y triptamina son sustratos de ambas enzimas (Glover y col., 1986). La distribución de los dos tipos de MAO es muy distinta en los diferentes órganos y especies. En el hombre, la mayor actividad se encuentra en el hígado donde ambas MAO se encuentran en la misma proporción. En el intestino, el 74% de la actividad total es MAO A; el papel de la MAO intestinal es metabolizar las aminas biológicamente activas de los alimentos. En las plaquetas humanas existe solamente la MAO B y en el cerebro el 70% de la actividad total es

MAO B. La MAO A se encuentra normalmente dentro de la neurona y la MAO B fuera de ella, especialmente en las células gliales. Sin embargo, estas poseen ambos tipos de esta enzima, así como otras áreas catecolaminérgicas y serotoninérgicas. La actividad de ambas enzimas está demostrada en sustancia negra (Riederer y col., 1986) y puede ser que las células gliales sean responsables de la actividad de la MAO en este centro.

En varias regiones cerebrales y en plaquetas, la actividad de la MAO B aumenta con la edad (Robinson y col., 1972, Fowler y col., 1980). Este aumento es más pronunciado aún en algunas enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer (Jossan y col., 1990). En enfermos de Parkinson todavía no se ha comprobado un claro aumento de la MAO B (Riederer y col., 1986). El aumento de la MAO B con la edad puede ser asociado a un aumento de las células gliales (Oreland y col., 1980).

A bajas dosis, el deprenilo es un inhibidor selectivo de la MAO B, pero a altas dosis también puede inhibir la MAO A (Knoll, 1978). La actividad intestinal de la MAO A es mucho menos sensible a la acción del deprenilo que la actividad de la MAO B en plaquetas (Elswort y col., 1978). Esta propiedad explica en parte porqué el deprenilo, a las dosis clínicas que es utilizado (10mg/día/40Kg), no está sujeto a la potenciación de los efectos de la tiramina que causa crisis hipertensivas durante el tratamiento con inhibidores no específicos de la MAO.

Clínicamente, el neurotransmisor más importante donde actúa el deprenilo es la dopamina, la cual es metabolizada sólo por la MAO B en cerebro humano (Glover y col., 1980). Estudios "in vivo" con ratas demuestran que el tratamiento con deprenilo a altas dosis aumenta la concentración de DA en estriado (Knoll, 1983; Zsilla y col., 1986) y disminuye la concentración de los dos metabolitos mayoritarios, ácido homovanílico (HVA) y ácido 3,4-dihidroxi-fenilacético (DOPAC) (O'Regan y col., 1987). En cerebro humano, la concentración de dopamina es un 40-50% más alta en pacientes con Parkinson tratados con deprenilo (10mg/día) que en los no tratados.

Se ha descrito que el deprenilo a dosis bajas inhibe la captación de DA (Ekstedt y col., 1979; Zsilla y col., 1986), lo que parece ser

reversible, y aumenta el turnover de DA al contrario, que la clorgilina que lo disminuye (Zsilla y Knoll, 1982; Knoll, 1983). Esto hace pensar que el deprenilo inhibe los receptores presinápticos DA y de este modo aumenta su síntesis (Knoll, 1987).

La L-DOPA es la principal sustancia en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. En pacientes con Parkinson tratados con deprenilo (5-10mg/día) se ha demostrado que éste prolonga y potencia la eficacia de la L-DOPA, por lo que las dosis de esta se pueden disminuir significativamente (Golbe, 1988; Chrisp y col., 1991). Cuando el deprenilo es utilizado sólo en los primeros estadios de la enfermedad, la necesidad de utilización de la L-DOPA puede ser retrasada (Tetrud y col., 1989; Myllyla y col., 1991). El deprenilo es utilizado sólo o asociado a otras drogas antiparkinsonianas (Marsden, 1990). La combinación de deprenilo con amantadine aumenta la razón DA/DOPAC y DA/HVA en animales tratados con MPTP mostrando el efecto sinérgico de ambas drogas (Rausch y col., 1990). Cuando es utilizado con agonistas dopaminérgicos como lisuride y bromocriptine, la dosis de L-DOPA puede ser disminuida (Rinne, 1989). A diferencia de los inhibidores no específicos de la MAO, el deprenilo en dosis de 10 mg/día no causa el efecto del queso (Knoll y col., 1968; Sandler y col., 1978). A altas dosis (50 mg/día) el deprenilo utilizado para el tratamiento de la depresión no presenta problemas cardiovasculares cuando se sigue una dieta baja en tiramina (Mann y col., 1989)

La feniletilamina (PEA) está presente en pequeñas cantidades en cerebro y orina de mamíferos. La estructura es similar a la d-anfetamina (α -metilfeniletilamina), y han sido descritas como "anfetaminas endógenas" (Sandler, 1976). La PEA es formada a partir de fenilalanina por descarboxilación. En el cerebro humano, las mayores cantidades son encontradas en cerebelo, hipotálamo, hipocampo y putamen (McQuade, 1984). La PEA libera catecolaminas de un "pool" extragranular presináptico (Fluxe y col., 1967; Ono y col., 1991). Se ha descrito que la PEA puede estar localizada en neuronas que contienen catecolaminas, ya que la destrucción de la sustancia negra por la 6-OHDA lleva a una disminución de ambas DA y PEA (Boulton y col., 1990). En ratas, la PEA aumenta la actividad motora y el comportamiento estereotipado. Durante el tratamiento con deprenilo, la concentración de PEA aumenta en

cerebro de roedores (Lauber y col., 1984; Philips, 1981) y humano (Reynolds y col., 1978). El deprenilo potencia el comportamiento estereotipado inducido por PEA incluso con dosis que no alteran el metabolismo de las catecolaminas (Brastrup y col., 1975). La combinación de fenilalanina, precursor de la PEA, y bajas dosis de deprenilo es efectivo en el tratamiento de la depresión (Birkmayer y col., 1984).

En el transcurso de la vida se va produciendo la muerte de las células dopaminérgicas, mientras que la concentración de la MAO B aumenta (Robinson y col., 1972). Se ha comprobado que la vida media de las ratas aumenta con el tratamiento continuo de deprenilo durante un año (Knoll, 1988; Knoll y col., 1989). Se demostró que este aumento de la supervivencia no estaba asociado con la reducción de la ingesta de alimento, pues la disminución del peso fue menor en el grupo tratado con deprenilo. Estos datos fueron confirmados por Birkmayer y col. (1985).

La dopamina tiene un papel importante en el control de la secreción adenopituitaria de algunas hormonas, incluyendo la prolactina y la hormona del crecimiento (GH). En tratamientos prolongados con deprenilo está descrito que se reduce significativamente los niveles de prolactina (Mendlewicz y Youdim, 1977), aunque esto no ha sido confirmado por otros investigadores (Wajsbort y col., 1982). Además, en pacientes con galactorrea el deprenilo reduce los niveles de prolactina y disminuye la galactorrea (Sas y col., 1986). Los niveles plasmáticos de la hormona de crecimiento no son afectados tras el tratamiento con deprenilo (Agnoll y col., 1981), pero están significativamente aumentados tras el tratamiento con L-DOPA (Koulu y Lammintausta, 1983).

Las interacciones descritas entre deprenilo y otros fármacos son relativamente pocas. Está descrito que la utilización del deprenilo con inhibidores no selectivos de la MAO causan hipotensión grave (Pare y col., 1985), por lo que su uso no es recomendado.

El uso conjunto de petidina (meperidina) e inhibidores no específicos de la MAO como fenilazina pueden conducir a excitación, convulsión, hipertermia y grave depresión respiratoria. De acuerdo con estudios en animales, el deprenilo no afecta a la toxicidad de la

meperidina (Jounela y col. 1977; Boden y col. 1984). Además, ha sido descrita una reacción hipertérmica en los enfermos de Parkinson después de la retirada o disminución de la concentración de L-dopa o agonistas dopaminérgicos (Sechi y col. 1984; Gibb y Lee, 1985). Como el mecanismo básico de las interacciones no está totalmente claro es mejor evitar el uso conjunto de deprenilo y meperidina.

El deprenilo es absorbido en el tracto gastrointestinal (Magyar y Tothfalusi, 1984), y su concentración máxima aparece entre las 0,5 y 2 horas después de la administración oral. El deprenilo es una sustancia lipofílica básica, la cual penetra fácilmente en los tejidos y es rápidamente distribuída por todo el organismo. A concentraciones terapéuticas, el 94 % del deprenilo se une a proteínas plasmáticas. Las uniones con macroglobulinas son más fuertes que con albúmina o gammaglobulina (Szoko y col., 1984; Kalasz y col., 1990). El deprenilo atraviesa rápidamente la barrera hematoencefálica debido a su baja polaridad.

El deprenilo posee un gran metabolismo de primer paso, siendo metabolizado a (-)-desmetildeprenilo y (-)-metanfetamina (MA) y ambos pueden ser convertidos a (-)-anfetamina (A) y su correspondiente metabolito p-hidroxilado (Yoshida y col., 1986). La hidroxilación es seguida de la conjugación con el ácido glucurónico. El metabolismo ocurre principalmente en el hígado y parece ser dependiente del citocromo P450 microsomal.

La estereoselectividad de los metabolitos del deprenilo es importante (Ariens, 1986). Los metabolitos son de la forma (-) y no ha sido detectada una transformación racémica (Scachter y col., 1986; Meeker y Reynolds, 1990). Por otro lado, la dextroanfetamina (dA) formada a partir de (+) deprenilo puede, en parte, explicar el efecto antidepresivo del E-250, el cual, es una mezcla racémica de ambas formas. Es importante reconocer las diferentes propiedades de los dos isómeros de la anfetamina. La acción farmacológica básica de la dextro o levo anfetamina es la liberación de catecolaminas de la neurona presináptica.

La pérdida de peso encontrada durante el uso prolongado de

deprenilo ocurre solamente con la forma (d) y no con la (l). Los efectos del deprenilo son claramente diferentes de la acción de la anfetamina (Quitkin y col., 1984) y los efectos clínicos no dependen de las propiedades farmacológicas de sus metabolitos anfetamínicos (Elsworth y col., 1982). En un reciente estudio se ha descrito que los metabolitos del deprenilo, L-metanfetamina y L-anfetamina, protegen frente a la neurotoxicidad del MPTP y sus análogos en ratones (Sziráki y col. , 1993)

1. 8 GANGLIOS BASALES: VIA NIGRO-ESTRIADA

El término ganglios basales agrupa a los núcleos telencefálicos subcorticales; estos núcleos son el cuerpo estriado y el núcleo amigdaloides. Sin embargo, la sustancia negra, los núcleos subtalámicos e importantes partes del tálamo, como la formación reticular, operan en estrecha asociación con aquellos y, en consecuencia, se las considera parte del sistema de los ganglios basales para el control motor. El cuerpo estriado se divide a su vez en paleoestriado o globo pálido y neostriado. Este último está dividido en dos núcleos, el caudado y el putamen que en el caso de la rata constituyen el "caudoputamen".

Los ganglios basales funcionan en estrecha relación con la corteza cerebral para el control de actividades tanto motoras como sensitivas. Uno de los hallazgos recientes más importantes ha sido el de que, cuando el cuerpo lleva a cabo una actividad muscular, aparecen potenciales de acción en los ganglios basales antes de hacerlo en las áreas motoras corticales. Por esto se cree que los ganglios basales tienen un papel esencial en la iniciación de la mayor parte de las actividades motoras del cuerpo

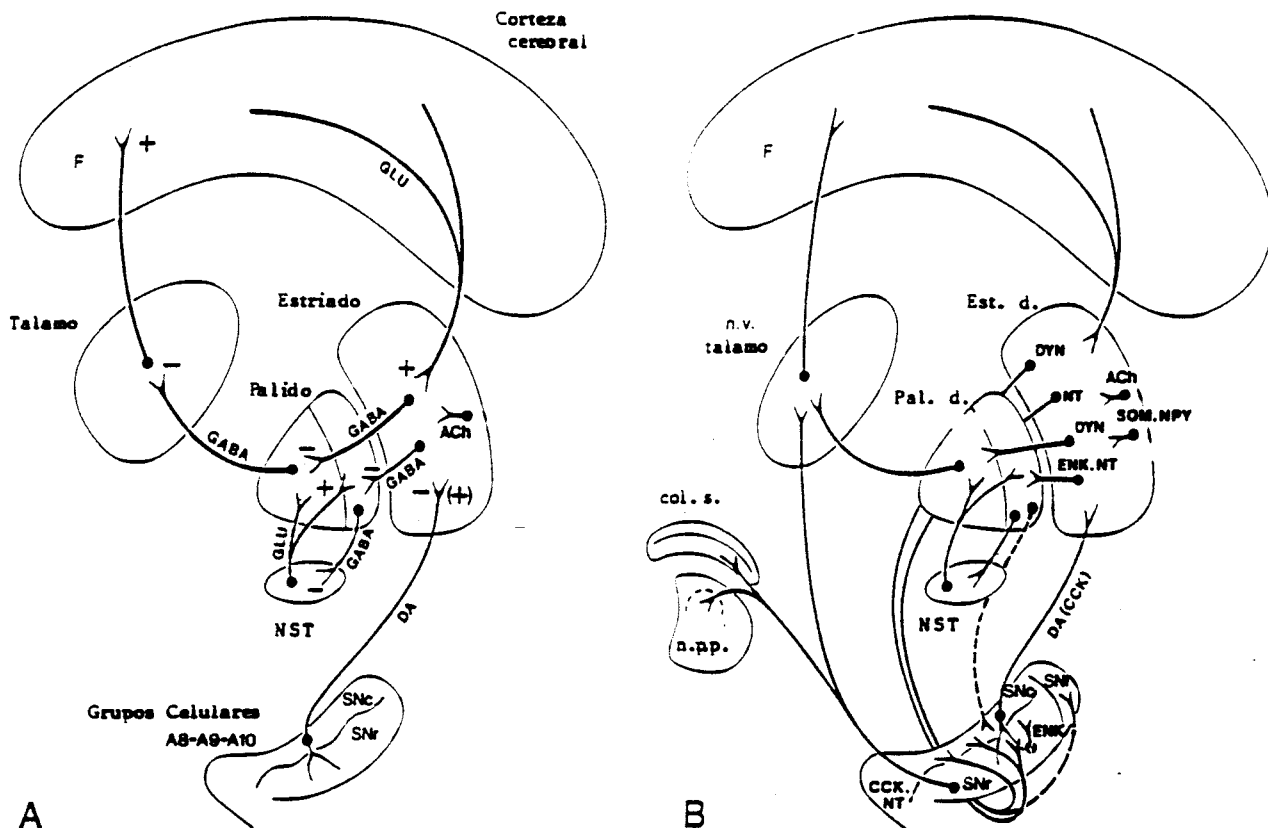


Figura 6. Principales vías que convergen entre la sustancia negra, ganglios basales y estructuras relacionadas. La corteza cerebral proyecta a través de la vía inhibitoria estrió-pálido-talámico, la cual termina, de vuelta a la corteza, en el lobo frontal (F). Este circuito básico está modulado por interneuronas colinérgicas estriales, con participación de los núcleos subtalámicos (NST) y la parte compacta de la sustancia negra (SNc). La SNc forma parte del grupo celular A₈-A₉-A₁₀ de Dahlström y Fuxe (A₈ equivale al núcleo retrorrubral, A₉ a la SNc y A₁₀ al área tegmental ventral de Tsai). Este circuito básico no solo conlleva la participación de los núcleos caudado y putamen (estriado dorsal; Est. d., neoestriado) y del globo pálido (pálido dorsal; Pal. d., paleoestriado), sino que también participan diversas estructuras del sistema límbico (region del núcleo accumbens-tubérculos olfatorios). Otras abreviaturas: ACh (acetilcolina); CCK (colecistokinina); col. s. (colículo superior); DA (dopamina); DYN (dinorfina); ENK (encefalina); GABA (ácido γ -amino butírico); GLU (glutamato); NT (neurotensina); n.p.p. (núcleo pedúnculo pontino); NPY (neuropéptido Y); n.v.tálamo (núcleo ventral del tálamo); SNL (parte lateral de la sustancia negra); SNr (parte reticulada de la sustancia negra); SOM (somatostatina).

Los ganglios basales son integradores de las funciones motoras, pero no sólo están implicados en el aspecto sensorimotor sino también en la selección del programa motor, planificación del movimiento, la memoria motora y la recuperación (Graybiel, 1990).

El estriado recibe proyecciones de forma masiva desde la sustancia negra parte compacta, corteza, tálamo y, menos abundantemente, desde el globo pálido, núcleos subtalámicos, núcleo dorsal del rafe y núcleo tegmental pedúnculo-pontino. En contraste, el estriado sólo envía impulsos de forma masiva a la sustancia negra y globo pálido (Parent, 1990). En el estriado existen dos compartimentos con diferencias neuroquímicas: los estriosomas y la matriz. Las aferencias y eferencias llegan y salen selectivamente de uno y otro compartimento. Además, un mismo neurotransmisor puede tener diferentes efectos en cada compartimento (Graybiel, 1990).

La figura 6 muestra las vías de conexión de los ganglios basales, que como se observa es un circuito córtico-estrio-negro-tálamo-cortical. De todas las vías de los ganglios basales, la vía nigro-estriada es la que más nos interesa. La sustancia negra es el mayor núcleo mesencefálico, y se divide en: 1) parte compacta (SNc) que es rica en cuerpos neuronales que contienen melanina; 2) parte reticulada (SNr), a donde van la mayor parte de las aferencias que llegan a la sustancia negra, y 3) parte lateral.

Las fibras nigro-estriadas, que nacen en las células de la SNc, proyectan ipsilateralmente al caudoputamen y sólo un 5% son contralaterales (Parent, 1983). Estas proyecciones son dopaminérgicas y llegan fundamentalmente a los estriosomas del estriado (Graybiel, 1990).

Las interneuronas moduladoras tienen un papel importante en los ganglios basales. Por ejemplo, en la vía nigro-estriada existe un equilibrio entre la DA liberada por las terminales nigro-estriales y la acetilcolina liberada en las interneuronas colinérgicas del estriado. La pérdida de este equilibrio da lugar a alteraciones tales como la hiperquinesia que aparece en la Corea de Huntington, donde existe poca

acetilcolina, o bien la hipoquinesia del Parkinson, donde los niveles de DA están muy disminuidos (Graybiel, 1990).

La liberación de muchos neuropéptidos en las neuronas gabaérgicas del estriado está modulada por impulsos dopaminérgicos que descargan en las espinas de estas neuronas (Smith y Bolam, 1990).

La DA es sintetizada y liberada no sólo en los axones de las neuronas dopaminérgicas sino también en las dendritas de la sustancia negra (Geffen y col., 1976; Korf y col., 1976; Cheramy y col., 1981). Esta DA liberada en las dendritas actúa inhibiendo a las propias células que la liberan, a través de autorreceptores situados en los cuerpos celulares dopaminérgicos o en la misma dendrita. Una disminución en la liberación de este neurotransmisor conlleva un aumento de la liberación de DA en la terminal nerviosa que se proyecta en el caudado ipsilateral (Nieouillon y col., 1978). Igualmente la DA liberada en las dendritas también parece controlar la liberación de otros neurotransmisores inhibiendo a las neuronas cercanas a la dendrita (Groves y col., 1975). Esta DA dendrítica está relacionada con la plasticidad y regeneración neuronal y el establecimiento de nuevas sinapsis (Geffen y col., 1976). A su vez, otros neurotransmisores pueden ejercer control sobre esta liberación dendrítica. Así glicina, acetilcolina y serotonina la estimulan, mientras que el GABA y la sustancia P la inhiben (Michelot y col., 1979).

En cuanto a la vía estrío-negral, entre un 30% y un 50% de las células del núcleo caudado proyectan a la sustancia negra (Bunney y Aghajanian, 1976); las proyecciones que llegan a la SNc vienen principalmente de los estriosomas, mientras que la matriz del estriado envía fundamentalmente a la SNr (Graybiel, 1990). Los neurotransmisores más importantes en la vía estriado-negral son GABA, encefalina y sustancia P (Haber y Elde, 1982).

La mayor parte de las fibras nerviosas que proyectan desde el neostriado hacia el globo pálido son fibras inhibitorias que liberan el neurotransmisor GABA en sus terminaciones nerviosas. Debido a este paso inhibitorio, esta vía circular que comienza en la corteza y regresa nuevamente a ella, es un circuito de retroalimentación negativa que proporciona estabilidad a muchos aspectos de las interacciones del control

motor. Por tanto podemos decir que la transmisión entre el estriado y la sustancia negra es principalmente inhibitoria, mediada por la DA en la vía nigro-estriada y por el GABA en la vía estrío-nigral.

En la figura 6 se observa la gran cantidad de neurotransmisores relacionados entre si que intervienen en las conexiones de los ganglios basales. La inervación serotoninérgica de los ganglios basales se origina en los cuerpos de las neuronas serotoninérgicas del rafe dorsal y del rafe medial (Dahlstrom y Fuxe, 1964).

El 80% de las vías rafe-estriadas son serotoninérgicas (Steinbusch y col., 1981). La distribución de serotonina en el estriado es ventrocaudal, distinta a la DA que es rostral (Fonnum y col., 1978). El papel del 5-HT en el estriado no está totalmente claro, pudiendo llegar a tener efectos contrarios a los de DA. Lo que sí está claro es que DA y 5-HT están estrechamente relacionados (Waddington y Crow, 1979). Disminuciones de 5-HT aumentan los efectos de agentes dopaminérgicos, mientras que el aumento en 5-HT tiene efectos contrarios (Milson y Pycock, 1976). Por otra parte, la serotonina puede activar la liberación de DA en el estriado (Glowinski y col., 1981).

Los agentes neurolépticos, que inicialmente se pensó eran selectivos para el receptor de la DA, disminuyen el efecto electroforético del 5-HT sobre el estriado (Davies y Tongroach, 1978) y la sustancia negra (Dray, 1976). Esta interacción puede contribuir a los desórdenes en los movimientos producidos por la terapia crónica con neurolépticos. Además este tipo de tratamiento aumenta el número de receptores para 5-HT (Müller y Seaman, 1977).

En cuanto a la inervación serotoninérgica en sustancia negra, las vías rafe-nigrales son colaterales a las rafe-estriales (Van der Kooy y Hattori, 1980). La serotonina que llega a la sustancia negra parece inhibir la actividad de las neuronas dopaminérgicas (Dray y col., 1978). La sustancia negra, al igual que el estriado, cuenta con 5-HT y con triptófano hidroxilasa, que se encuentran principalmente en la región reticulada. En la sustancia negra, las fibras serotoninérgicas hacen contacto con los cuerpos y las dendritas dopaminérgicas (Reubi y Emson, 1978). Estudios "in vitro" sugieren que la dopamina de las neuronas nigrales activa la

liberación de serotonina desde el rafe (Reubi y col., 1978).

Los ganglios basales, en concreto la sustancia negra y el estriado, son centros de interés para nosotros por estar implicados en enfermedades asociadas con el envejecimiento como la enfermedad de Parkinson, cuya causa puede estar relacionada con el daño producido por radicales libres. En los enfermos de Parkinson existe una degeneración de la vía nigro-estriada dopaminérgica con la correspondiente pérdida de DA, lo cual ha llevado a usar una terapia con L-DOPA (precursor de la DA) (Cotzias y col., 1967). Sin embargo, y debido al gran número de problemas que presenta la terapia prolongada con L-DOPA, existe un interés por encontrar tratamientos alternativos. Si pensamos en la implicación de los radicales libres en esta patología, esta terapia puede ir encaminada hacia el uso de antioxidantes o bien sustancias que inhiban la formación de los radicales libres de oxígeno.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Las enfermedades degenerativas del sistema nervioso muestran frecuentemente predilección por un tipo específico de neuronas. Un ejemplo es la enfermedad de Parkinson, en donde la degeneración está fundamentalmente circunscrita a las neuronas dopaminérgicas del sistema nigroestriado. Este tipo de proceso degenerativo puede ser debido a una especial vulnerabilidad de las neuronas afectadas. El estudio de las características que pueden facilitar esta vulnerabilidad es importante, así como el de aquellos compuestos que pueden ser capaces de disminuirla o aumentarla. El agente causal específico de la enfermedad de Parkinson no es aún conocido. Sin embargo, se han propuesto algunos como posibles o como favorecedores de la aparición de dicha enfermedad. Entre ellos está la actuación de tóxicos específicos que se caracterizan por su acción inhibitoria de los sistemas de obtención de energía, fundamentalmente de la actividad respiratoria, y que son acumulados en las neuronas dopaminérgicas por el sistema de "uptake" de dopamina. El tóxico más conocido con estas características es el MPTP. Otra posibilidad importante es el aumento de la producción de radicales libres de oxígeno en el sistema dopaminérgico, lo que provocaría un aumento del daño oxidativo que conllevaría muerte neuronal. El aumento del daño oxidativo en las neuronas dopaminérgicas podría estar relacionado con el hecho de que la dopamina es metabolizada a través de la enzima monoamino oxidasa con la consiguiente producción de peróxido de hidrógeno, considerado como un radical de oxígeno. Este proceso puede relacionar la enfermedad de Parkinson con el envejecimiento debido el aumento de la MAO B. Aunque la enfermedad de Parkinson aumenta su incidencia con la edad, esta incidencia disminuye por encima de los 75 años. El aumento del daño oxidativo durante el envejecimiento podría ser producido por una disminución de la capacidad de los mecanismos de protección frente a estos daños. Por ello nos proponemos estudiar:

1. Animales con una menor capacidad protectora frente a los daños oxidativos. Para ello, los animales fueron alimentados durante 30 días con una dieta deficiente en vitamina E o selenio.

1.2. Los niveles de los aminoácidos en las estructuras relacionadas con la enfermedad de Parkinson, como sustancia negra y estriado, así como en otra estructura no relacionada, el hipocampo, en los animales anteriormente mencionados.

1.3. La neurotoxicidad del MPP⁺ en cortes de estriado de dichos animales mediante la medida de la concentración de DA y sus metabolitos.

2. El efecto protector del deprenilo frente a la neurotoxicidad del ión MPP⁺. Teniendo en cuenta que el deprenilo es un inhibidor de la MAO y por lo tanto sin ningún tipo de participación sobre el proceso metabólico necesario para que el MPP⁺ produzca su acción tóxica, este estudio se llevará a cabo:

2.1. En cortes de estriado de ratas, mediante la determinación del neurotransmisor DA y sus metabolitos DOPAC, 3-MT y HVA.

2.2. Mediante la determinación de los grupos carbonilos como medida del aumento del daño oxidativo en las proteínas.

2.3. Mediando las actividades enzimáticas SOD y Catalasa en el estriado de los animales tratados con deprenilo.

3. La posible acción protectora frente al efecto tóxico del MPP⁺ del tratamiento con compuestos que aumentan la capacidad de obtención de energía a nivel respiratorio, como la acetil-L-carnitina.

3. MATERIAL Y METODOS

3.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACION

Todos los experimentos se llevaron a cabo usando ratas macho de 3-5 meses de edad (300-400 g.), de la raza Wistar nacidas en nuestro laboratorio. Las ratas se mantuvieron en ciclos de 12 horas luz-12 horas oscuridad, bajo condiciones apropiadas de temperatura y humedad. En todos los ensayos las ratas tuvieron libre acceso a agua y comida.

Los animales se decapitaron entre las 10 y las 11 de la mañana, los cerebros se extrajeron rápidamente y se diseccionaron sobre hielo. Todas las estructuras cerebrales se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización. Las figuras 7 y 8, muestran respectivamente los cortes de sustancia negra, estriado y bulbo olfatorio, en las cuales se detalla la técnica de disección para cada uno de estos centros nerviosos. La figura 9 muestra una representación esquemática de la distribución de los compuestos neuroactivos de distintas partes del núcleo arcuato y las eferencias a la eminencia media. La figura 10 representa un esquema de la situación de la hipófisis en relación con los núcleos hipotalámicos.

3.2 DIETAS UTILIZADAS

Se utilizaron dietas comerciales: dieta semisintética de base (dieta control); dieta semisintética deficiente en vitamina E y dieta deficiente en selenio, todas ellas de Panlab S.L.

La composición de las dietas deficientes fue igual a la control (ver página siguiente), salvo los contenidos en vitamina E y selenio, que fueron:

-dieta deficiente en vitamina E

contenido en vitamina E $< 15\text{ mg/kg}$.

-dieta deficiente en selenio:

contenido en selenio: $10,1-12,4\text{ }\mu\text{g/kg}$.

COMPOSICION DE LA DIETA CONTROL

COMPOSICION PORCENTUAL:

Exto no azufrado	48,6%
Proteínas	19,0%
Humedad	12,0%
Lípidos	9,0%
Minerales	6,0%
Materia celulósica	5,4%

AMINOACIDOS:

Lisina	17,5 g/kg
Arginina	8,5 g/Kg
Metionina	7,1 g/Kg
Triptófano	5,1 g/Kg
Cisteína	3,0 g/Kg
Glicina	1,0 g/Kg

MINERALES:

Calcio	10.000,00 mg/Kg
Fósforo	7.750,00 mg/Kg
Potasio	6.000,00 mg/KG
Sodio	4.000,00 mg/KG
Magnesio	1.000,00 mg/Kg
Hierro	300,00 mg/Kg
Manganeso	80,00 mg/Kg
Zinc	45,00 mg/Kg
Cobre	12,50 mg/Kg
Yodo	0,49 mg/Kg
Selenio	0,20 mg/Kg

VITAMINAS:

Vitamina A	19.800,00 UI/Kg
Vitamina D	2.500,00 UI/Kg
Vitamina C	800,00 mg/Kg
Vitamina E	170,00 mg/Kg
Vitamina B7	150,00 mg/Kg
Vitamina B3	70,00 mg/Kg
Vitamina B1	20,00 mg/Kg
Vitamina B2	15,00 mg/Kg
Vitamina B6	10,00 mg/Kg
Vitamina B12	0,05 mg/Kg
Vitamina K	40,00 mg/Kg
Colina	1.360,00 mg/Kg
Acido fólico	5,00 mg/Kg
Biotina	0,30 mg/Kg
Acido PAB	50,00 mg/Kg

(p-aminobenzóico)

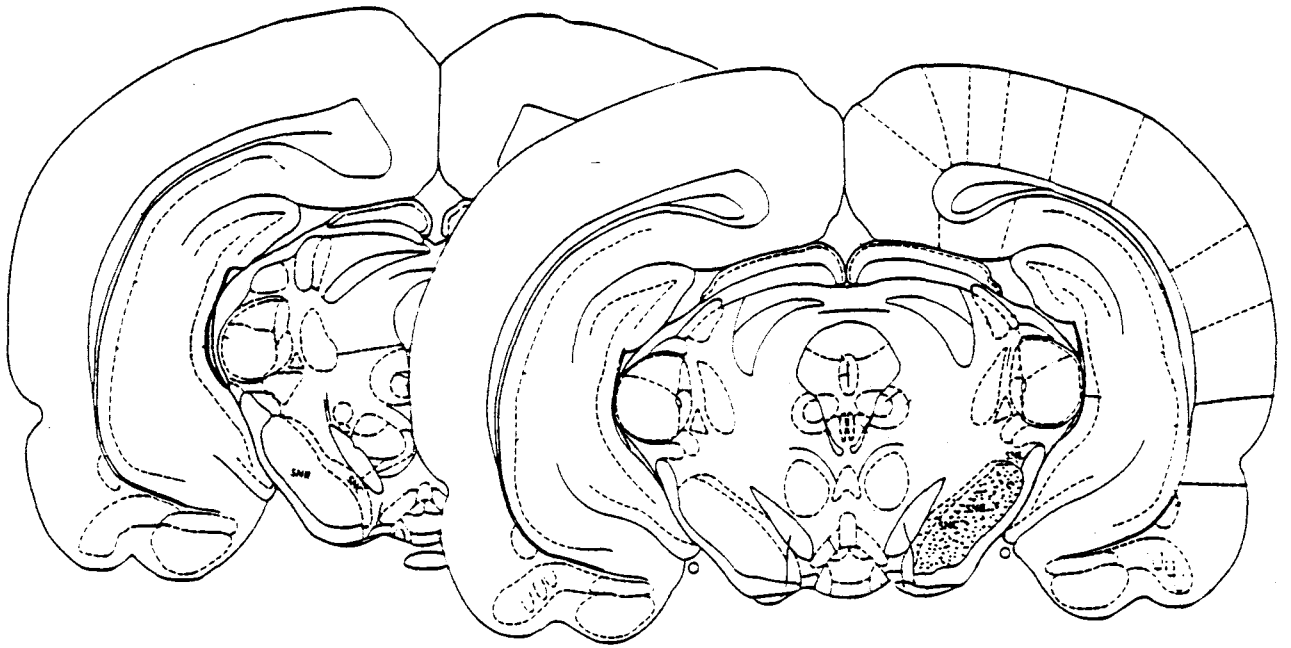


Figura 7. Representación esquemática de dos secciones coronales del cerebro de la rata, donde se muestran las distintas áreas de la sustancia negra: **SNC** (parte compacta de la sustancia negra); **SNR** (parte reticulada de la sustancia negra); **SNL** (parte lateral de la sustancia negra). La zona diseccionada se muestra en la figura de forma punteada.

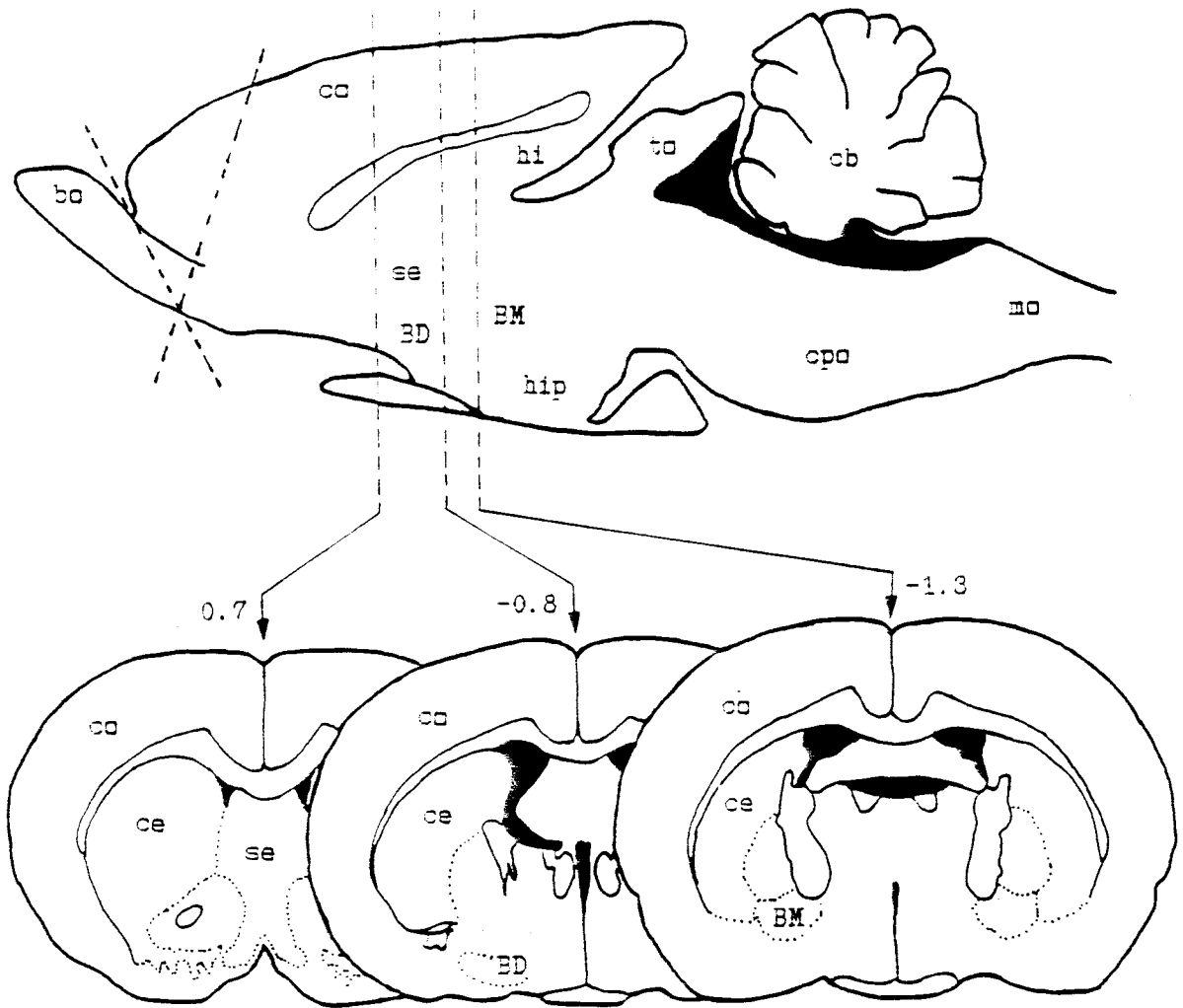


Figura 8. Representación esquemática del cerebro de rata en el que podemos observar el núcleo caudado putamen (**cp**). Los espacios ventriculares se muestran en negro. Las líneas discontinuas en la sección transversa indican la distancia en milímetros desde el punto bregma. Abreviaturas: **BM** (núcleo basal de Meynert); **cb** (cerebelo); **co** (neocortex); **BD** (banda diagonal de Broca); **cpo** (cerebelo posterior); **hi** (hipocampo); **hip** (hipotálamo); **mo** (médula oblonga); **bo** (bulbo olfatorio); **se** (esptum); **s e** (septum); **ce** (cuerpo estriado); **to** (tecto óptico).

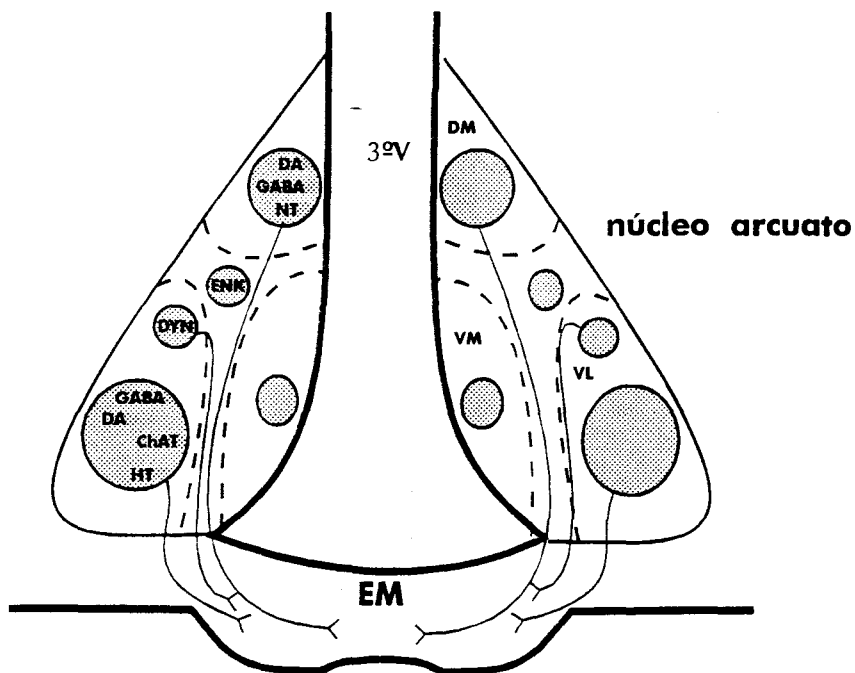


Figura 9. Representación esquemática de la distribución de los compuestos neuroactivos de distintas partes del núcleo arcuato y eferencias a la eminencia media (**EM**). Abreviaturas anatómicas: **DM** (dorso medial); **VM** (ventro medial); **VL** (ventro lateral); **3ºV** (tercer ventrículo). Abreviaturas de los neurotransmisores y péptidos: **ChAT** (acetil colina); **DA** (dopamina); **DYN** (dinorfina); **ENK** (encefalina); **GABA** (ácido γ -amino butírico); **TH**(tirosina hidroxilasa).

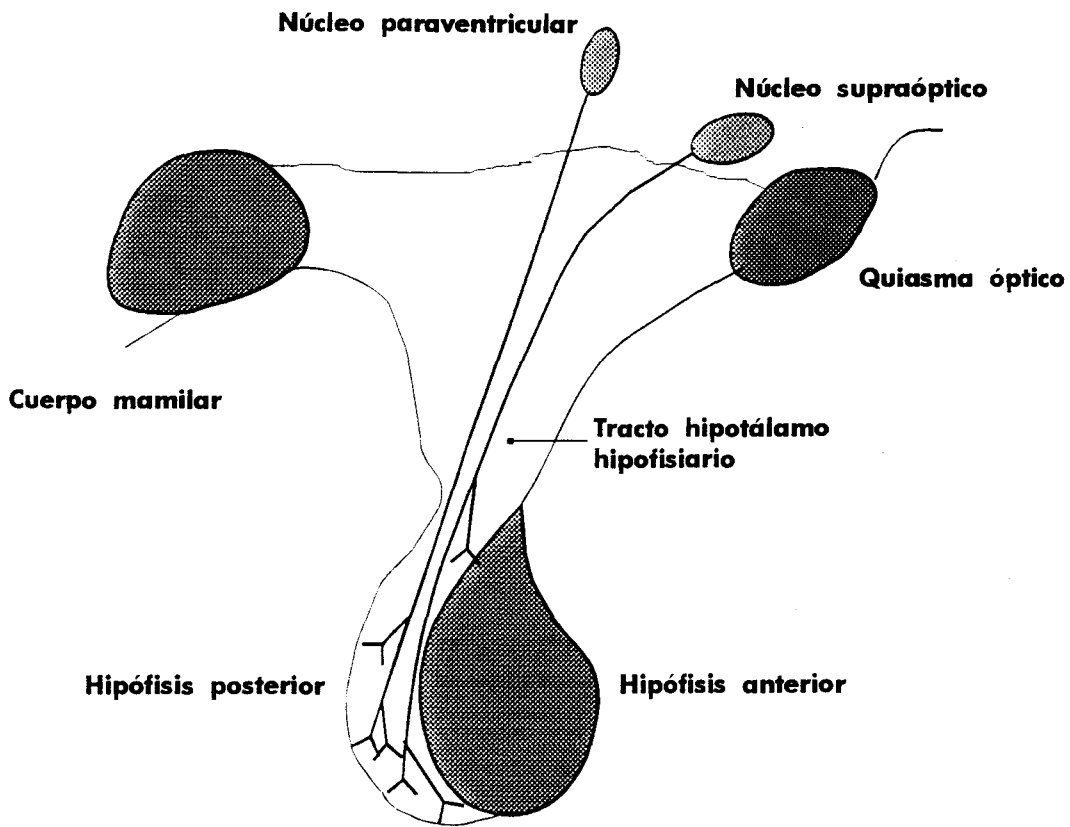


Figura 10. Representación esquemática de la situación de la hipófisis en relación con los núcleos hipotalámicos.

3.3 PRODUCTOS Y REACTIVOS

Para los análisis en HPLC se utilizaron los siguientes patrones: Triptófano (TRP), 5-hidroxitriptamina (5-HT o serotonina), ácido 5-hidroxiindol-3-acético (5-HIAA), L-β-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), dopamina (DA), 3-metoxitiramina (3-MT), ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), ácido homovanílico (HVA), L-noradrenalina (NA), todos ellos de Sigma Chemical Co. (USA). También se utilizaron: ácido etilendiamino-tetraacético (EDTA) de Sigma Chemical Co; ácido cítrico, ácido fórmico, ácido perclórico, dietilamina y acetonitrilo de Merck; ácido octanosulfónico de Scharlau. El agua utilizada fue desionizada (Milli Q-Millipore).

Como patrones de aminoácidos se utilizó una mezcla de PIERCE que contenía por cada mililitro (en 0,1 N HCl y $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$) 1,25 μmoles de L-cystina y 2,5 μmoles de cada uno de los siguientes aminoácidos L-alanina, L-arginina, L-aspartico, L-glutámico, glicina, L-histidina, L-iso-leucina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-serina, L-treonina, L-tirosina y L-valina. A la mezcla añadíamos 2,5 μmoles de ácido γ -aminobutirico (GABA) de Sigma, y 2.5 μmoles de L-norleucina de Pierce, como patrón interno.

Para la derivatización de los aminoácidos fueron utilizados los siguientes productos y reactivos: Fenil isotiocianato (PITC) y Trietilamina (TEA) de Sigma; metanol de Merck.

En las medidas de actividad Glutación peroxidasa (GSH-Px) se utilizaron los siguientes productos y reactivos: nicotín-adenín-dinucleótido fosfato reducido (NADPH) y glutación reductasa (GR) de Boehringer Mannheim; glutación reducido (GSH), EDTA, DL-ditiotreitól (DTT) y Tris-[hidroximetil]-amino-metano (Tris) de Sigma Chemical Co.; sacarosa y peróxido de hidrógeno de Merck.

En las medidas de las actividades enzimáticas, superóxido dismutasa y catalasa se utilizaron los siguientes productos y reactivos: citocromo C y xantina oxidasa de Boehringer Mannheim; fosfato potásico

(K₂HPO₄), cianuro potásico (KCN) y peróxido de hidrógeno 35% de Merck; EDTA y catalasa de Sigma Chemical Co.

En los cortes de estriado se utilizaron los siguientes productos y reactivos: cloruro sódico (NaCl), bicarbonato sódico (NaHCO₃), cloruro potásico (KCl), dihidrógeno fosfato de potasio (KH₂PO₄), cloruro cálcico (CaCl₂), sulfato magnésico (MgSO₄) y D-glucosa de Merck, 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP⁺) de RBI; carbógeno (95% O₂-5% CO₂) de Carburos Metálicos y agar (Bacto-agar) de Difco.

En los tratamientos se utilizaron las siguientes drogas: deprenilo de RBI y acetil-L-carnitina de Sigma Chemical Co.

Para la medida de proteínas se utilizó albúmina de Sigma Chemical Co. Otros solventes y reactivos fueron de alta pureza y se obtuvieron de proveedores habituales.

Para las medidas de grupos carbonilos se utilizó borohidruro tritiado sódico de Amershan, columnas Dowex 50w-x8 de Bio-Rad, y solución de hidrólisis (HCL) de Pierce.

Para la determinación de la cantidad de TH, Neurofilamentos y Glia todos los anticuerpos fueron suministrados por Boehringer Mannheim y el ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfónico), (ABTS) por Sigma Chemical Co.

3.4 APARATOS

El equipo de HPLC utilizado en la valoración de las aminas biógenas y sus metabolitos en las diferentes estructuras cerebrales consistió en una bomba Perkin Elmer Series 4, un detector electroquímico (amperiométrico LC 4B de Bioanalytical System, Inc.) y columnas LiChroCART 125-4 (LiChrospher 100 RP-18 de 5 μm de diámetro de partícula) de Merck. La integración de los cromatogramas se hizo en ordenador con un Software Inject de Bioanalytical System, Inc.

El equipo de HPLC utilizado en la valoración de los aminoácidos en las distintas estructuras cerebrales consistió en una bomba Perkin Elmer Series 4, un detector ultravioleta de Shimadzu, ajustado a 254 nm y 0.04 a.u.f.s. Las muestras fueran inyectadas por una válvula de alta presión (Rheodine) con un bucle de llenado de 20 μl .

Las centrifugaciones se llevaron a cabo en una centrífuga Centrikon H-401 de Kontron y en una ultracentrífuga L7-55 de Beckman.

La homogenización de las estructuras estudiadas se hizo en un equipo Labsonic 1510 de Braun.

Las medidas espectrofotométricas se realizaron en un espectrofotómetro UV-160 A de Shimadzu.

Los contajes de material radioactivo se realizaron en un equipo de centelleo líquido LS 1800 de Beckman.

Los cortes de estriado se realizaron en un vibrotomo serie 1000 de Vibratome.

Las muestras se secaron en una centrífuga de vacío, Speed Vac svc100 de Savant.

Para el E.L.I.S.A. se utilizó un lector Tirtertek Multiskan Plus MK II (tipo 314).

3.5 MEDIDAS DE AMINAS BIOGENAS Y SUS METABOLITOS EN CEREBRO

Las diferentes estructuras cerebrales estudiadas se homogeneizaron mediante sonicación en perclórico 0,1 M y bisulfito sódico 1 mM. Las muestras se centrifugaron a 12000xg durante 20 minutos a 4°C y los sobrenadantes se filtraron mediante rotación a baja velocidad (1000xg) a través de filtros de 0,2 μm de diámetro de poro. Los filtrados resultantes (pH 1,0) se neutralizaron hasta alcanzar un pH de aproximadamente 3,0 mediante la adición de un 10% (v/v) de una mezcla del tampón de la fase móvil con NaOH 5N en una proporción 3:1. Las muestras neutralizadas se inyectaron mediante un inyector de alta presión (Rheodine 7125-075) con un bucle de llenado de 20 μl . Los análisis de las muestras se realizaron isocráticamente a temperatura ambiente y a un flujo de 0.8 ml/min. El potencial del detector se mantuvo a +0,8 V. La fase móvil se preparó de acuerdo con DiBussolo y col. (1983), con algunas modificaciones (disolución acuosa de ácido fórmico 100 mM, ácido cítrico 1mM, EDTA 0,1 mM, ácido octanosulfónico 0,35 mM, dietilamina 0,25% v/v y acetonitrilo 4,0 % v/v, pH 3,1). La mezcla de solventes se filtró a través de filtros de 0,45 μm de diámetro de poro mediante vacío, con lo que se eliminan pequeñas burbujas de aire que puedan interferir en el análisis.

Las concentraciones de las aminas biógenas en el cerebro se calcularon con el uso de curvas de calibración obtenidas mediante la inyección de patrones puros. Estos patrones se prepararon en perclórico 0,1 M y bisulfito sódico 1 mM (1mg patrón/ml) y se conservaron a +4° C hasta el momento de su utilización (máximo 30 días). La correcta identificación de los compuestos encontrados en los cromatogramas se llevó a cabo mediante el estudio de muestras cerebrales y soluciones de patrones a diferentes potenciales de oxidación. Muestras y patrones mostraron un comportamiento electroquímico similar, lo que permitió apoyar la especificidad del método.

3.6. DETERMINACION DE AMINOACIDOS POR HPLC EN FASE REVERSA

Las diferentes estructuras cerebrales estudiadas (sustancia negra, estriado, hipocampo) se homogeneizaron 1:10 peso/volumen mediante sonicación en perclórico 0.1 M. Las muestras se centrifugaron a 12.000xg durante 20 minutos a 4 °C, y los sobrenadantes se filtraron mediante rotación a baja velocidad (1000xg) a través de filtros de 0,2 μm de diámetro de poro. La derivatización se hizo por la técnica desarrollada por el sistema Pico-Tag de Waters (Milipore corporation M.A. USA). De los filtrados resultantes se cogieron 25 μl que se secaron en una centrífuga de vacío a 70 mtorr durante 20 minutos. El precipitado fue resuspendido con 10 μl de una solución compuesta por metanol-agua-TEA (2: 2: 1), dando comienzo a un nuevo secado a 70 mtorr. Acabado este paso se procedió a la derivatización propiamente dicha, usando para ello 20 μl de agente derivatizante, compuesto por metanol-agua-PITC-TEA (7:1:1:1). Tras veinte minutos de reacción a temperatura ambiente, el exceso de reactivo se eliminó por secado a vacío, en esta ocasión a una presión por debajo de 65 mtorr, hecho en el que se invirtió aproximadamente una hora. Los derivados así obtenidos, secos y congelados, tienen una estabilidad de 5-7 días. Para su análisis se resuspendieron en 200 μl de solución diluyente compuesta de 710 mg/l de Na_2HPO_4 , tamponada con H_3PO_4 al 10% hasta pH 7,4. Las muestras resuspendidas se inyectaron en un bucle de llenado de 20 μl . Los aminoácidos fueron separados en una columna Waters Pico-Tag de 30 cm de longitud y relleno de octadecil-sílica C-18, de 4 micras de diámetro de partícula, lo que conlleva que el análisis sea del tipo fase reversa. La columna se mantuvo a una temperatura de 46 °C, en un sistema de gradientes de dos fases móviles (A y B). La fase móvil A fue una dilución de acetato sódico trihidratado 70 mM ajustado con ácido acético 10%, a pH 6.5 a la que se añadió 2,5% en volumen de acetonitrilo. La mezcla fue filtrada por un filtro de 0,45 micras y desgasificada por ultrasonido. La fase móvil B estuvo compuesta por 45% de acetonitrilo, 40% de agua y 15% de metanol. En todas las preparaciones se usó agua de grado Milli-Q de 18,2 megaohmios.cm de resistividad y las fases móviles fueron estabilizadas por burbujeo continuo de Helio. Los aminoácidos fueron

estabilizadas por burbujeo continuo de Helio. Los aminoácidos fueron detectados por un espectrofotómetro UV Shimadzu, calibrado a 254 nm y 0,04 a.u. siendo enviada la señal eléctrica al integrador para el procesamiento de datos.

La cuantificación se llevó a cabo comparando cada muestra con un cromatograma patrón, usando en el cálculo el área relativa de cada pico y la recuperación de patrón interno obtenido. Como patrones de aminoácidos se utilizó una mezcla de PIERCE que contenía por cada mililitro (en 0,1 N HCl y $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$) 1,25 μmoles de L-cystina y 2,5 μmoles de cada uno de los siguientes aminoácidos L-alanina, L-arginina, L-aspartico, L-glutámico, glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-serina, L-treonina, L-tirosina y L-valina. A la mezcla añadimos 2,5 μmoles ácido γ -aminobutirico (GABA), y 2,5 μmoles de L-norleucina como patrón interno. Los patrones fueron procesados siguiendo el mismo protocolo que las muestras.

El gradiente optimizado para la separación de aminoácidos fue el siguiente:

Tiempo min	Flujo ml/min	% A	% B	Variación de gradiente	
18,0	1,0	100	0	—	
13,5	1,0	97	3	instantánea	0
10,5	1,0	94	6	convexa	0,2
6,0	1,0	91	9	convexa	0,2
20,0	1,0	66	34	lineal	1,0
15,0	1,0	64	36	lineal	1,0
1,0	1,0	0	100	lineal	1,0
5,0	1,0	0	100	lineal	1,0
1,0	1,0	100	0	lineal	1,0

3.6.1.DETERMINACION DEL TRIPTOFANO

Los análisis fueran realizadas en HPLC, con un detector electroquímico (amperiométrico LC 4B de Bioanalytical System, Inc.) y una bomba Kontron 420 con columna Merck LiChroCART (125 x 4 mm) LiChrospher 100 RP-18 5 μ m de diámetro de partícula. El potencial fue de 0.9 V. (versus Ag/AgCl electrodo de referencia).

3.7 MEDIDAS DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS

3.7.1 ACTIVIDAD GLUTATION PEROXIDASA

La actividad GSH-Px se determinó por el método descrito por Paglia y Valentine (1967), modificado por Lawrence y Burk (1976). Las muestras de cerebro fueron homogeneizadas por ultrasonido en 10 volúmenes de tampón Tris pH 7,4, sacarosa 0,25 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 1 mM, y se centrifugaron a 100.000xg a 4 °C durante 60 minutos. El sobrenadante se utilizó para la determinación de la actividad. La mezcla de ensayo contenía tampón fosfato 50 mM (pH 7,0), EDTA 1 mM, NaN₃ 1 mM NADPH 0,2 mM, GSH 1 mM, peróxido de hidrógeno 0,25 mM y Glutación reductasa 1 U/ml, en un volumen total de 1 ml. Tras agregar la muestra (0,1 ml), la mezcla se dejó incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente antes de añadir peróxido de hidrógeno para disparar la reacción. La medida de absorbancia a 340 nm se realizó durante 5 minutos. Los blancos se prepararon sustituyendo la muestra por agua destilada. La actividad se expresó como μ moles de NADPH oxidado por minuto.

3.7.2 ACTIVIDAD SUPEROXIDO DISMUTASA

La actividad de la superóxido dismutasa (SOD) se determinó en homogeneizado de estriado de acuerdo con el método de McCord y Fridovich (1969). Las muestras de cerebro fueron homogeneizadas por ultrasonido en 9 volúmenes de tampón fosfato potásico 50 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,8, y se centrifugaron a 800xg a 4 °C durante 10 minutos.

El sobrenadante se utilizó para la determinación de la actividad. La mezcla de ensayo contenía tampón fosfato 50 mM, pH 7,8, EDTA 0.1 mM, citocromo c 0,1 mM, xantina 0,5 mM, cianuro potásico 0,5 mM, catalasa 1 U/ml, en un volumen total de 1 ml. Tras agregar la muestra (10 μ l), se inició la reacción con xantina oxidasa y se registró la absorbancia a 550 nm, durante 5 minutos a 25 °C. Los blancos se prepararon sustituyendo la xantina oxidasa por agua destilada. La actividad se expresó en U/mg de proteína.

3.7.3 ACTIVIDAD CATALASA

La actividad catalasa se determinó de acuerdo con el método de Beers y Sizer (1952). Las muestras de cerebro fueron homogeneizadas por ultrasonido en 9 volúmenes de tampón fosfato potásico 0,5 M, pH 7,0, y se centrifugaron a 800xg a 4 °C durante 10 minutos. El sobrenadante se utilizó para la determinación de la actividad. La mezcla de ensayo contenía tampón fosfato potásico 0,5 M, pH 7,0, peróxido de hidrógeno 100 mM, en un volumen total de 1 ml. La medida de absorbancia se realizó a 240 nm, a 25 °C, añadiendo 50 μ l de muestra. Los blancos se prepararon sustituyendo la muestra por agua destilada. La actividad se expresó en U/mg de proteína.

3.8 MEDIDA DE LA CANTIDAD DE PROTEINA

La medida de la cantidad de proteínas en los distintos extractos analizados se hizo por el método descrito por Lowry y col. (1951).

3.9 TRATAMIENTO CON DEPRENILO

Para el estudio del efecto del deprenilo "in vitro" fueron utilizadas 24 ratas macho de la raza Wistar, de 4 meses de edad, doce tratadas con solución salina y doce tratadas con deprenilo (2 mg/kg/día, inyección subcutánea) durante 3 semanas. Doce ratas fueron utilizadas para medir las concentraciones de DA y sus metabolitos DOPAC, 3-MT, HVA. Las otras doce fueron utilizadas para medidas enzimáticas.

3.10 CORTES EN ESTRIADO

Después de decapitar la rata, el cerebro se extrajo rápidamente y se introdujo en un tampón Krebs-bicarbonato frío (NaCl 117 mM, NaHCO₃ 25 mM, KCl 1,5 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, CaCl₂ 2,5 mM, D-Glucosa 11,5 mM) y oxigenado (95% O₂-5% CO₂), a pH 7,4 durante 3 minutos. La región del tronco cerebral que contiene el estriado se montó en el vibrotomo y se mantuvo en un medio de Krebs frío y oxigenado mientras se hacían los cortes (500 μ m de grosor). Una vez diseccionado, el estriado fue introducido en un vial de reacción que contenía 10 ml de tampón Krebs oxigenado (95%O₂ y 5%CO₂) a 37 °C. En cada vial se ponen cuatro cortes de un estriado de cada rata. El estriado izquierdo fue usado como control y el derecho para incubación con 25 μ M de MPP⁺. Después de 60 minutos de incubación, la reacción se paró lavando los cortes en tampón Krebs bicarbonato frío. Estos se pasaron a papel de aluminio, se eliminó el exceso de líquido con papel de filtro alrededor y fueron almacenados a -80 °C hasta su análisis. Los cortes se homogeneizaron mediante sonicación en perclórico 0,1 M y fueron centrifugados a 12.000xg durante 20 min. El precipitado fue utilizado para la cuantificación de grupos carbonilos y el sobrenadante para la medida de las concentraciones de DA y sus metabolitos.

3.11 MEDIDAS DE GRUPOS CARBONILOS

Los grupos carbonilos, en proteínas totales, se medieron siguiendo el método descrito por Lenz y col. (1989). El precipitado obtenido en la homogenización de los cortes de estriado fue disuelto en 50 mM de tampón carbonato, pH 9,6. Las muestras, conteniendo 50 μ g de proteína, fueron secadas en centrífuga de vacío. Las muestras secas fueron redisueltas en 50 μ l de H₂O, 6 μ l de tampón Tris/HCl 1 M, EDTA 10 mM, pH 8,5 y 14 μ l NaB³H₄ 100 mM en 0,1 M NaOH (actividad específica 100 mCi/mmol) incubadas durante 30 minutos a 37 °C en campana. Las proteínas fueron precipitadas con 1 ml de ácido tricloroacético al 10% y dejadas 5 minutos, y centrifugadas durante 3 minutos en microcentrífuga (12.000xg). El sobrenadante fue desechado y

el precipitado se lavó 3 veces con ácido tricloroacético al 10%. Los precipitados fueron disueltos en 70% (v/v) de ácido fórmico e incubados como mínimo durante 30 minutos a 37 °C. Las muestras fueron transferidas a viales de hidrólisis y el ácido fórmico fue eliminado por centrifugación a vacío hasta sequedad. Las proteínas fueron hidrolizadas a 145 °C durante 4 horas con 250 μ l de HCl 6 M. Los hidrolizados secos fueron redisueltos en HCl 0,01 M. El hidrolizado fue pasado por una columna Dowex 50w-x8, la columna lavada con 10 ml de agua y seguidamente con NH₄OH 2 M, y la radiactividad determinada en 4 ml del eluyente.

3.12 TRATAMIENTO CON ACETIL-L-CARNITINA

Para el estudio del efecto de la acetil-L-carnitina "in vitro" fueron utilizadas 18 ratas macho de la raza Wistar de 4 meses de edad (350g), 6 de las cuales fueron tratadas con solución salina, otras 6 ratas con acetil-L-carnitina (75 mg/kg) 3 horas antes de su decapitación y las 6 restantes fueron tratadas durante 7 días con acetil-L-carnitina (75 mg /kg/día, inyección intraperitoneal).

3.13 ESTUDIO DEL EFECTO DE LA ACETIL-L-CARNITINA "IN VIVO".

Para el estudio del efecto de la acetil-L-carnitina "in vivo" fueron utilizadas ratas machos de la raza Wistar de 4 meses de edad (350-400g). Un primer grupo de ratas fue tratado con acetil-L-carnitina durante 8 días (100 mg/kg/día intraperitoneal); un segundo grupo de ratas fue tratado con acetil-L-carnitina de la misma manera que el grupo anterior y al tercer día de iniciar el tratamiento se inyectó en el ventrículo lateral izquierdo 1 μ l de MPP⁺ (62,5 μ g) por rata, con las siguientes coordenadas (A/P -0.8 mm y L/M 1.4 mm, de Bregma). En un tercer grupo se inyectó el MPP⁺ como se describió anteriormente y se

decapitaron después de 5 días, y lo mismo se hizo con un grupo control inyectando solución salina. Las ratas tratadas con acetil-L-carnitina fueron decapitadas en el noveno día después de iniciado el tratamiento. Los cerebros se extrajeron rápidamente y se diseccionaron sobre hielo. Todas las estructuras cerebrales se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su utilización. En las estructuras como caudado, sustancia negra, bulbo olfatorio, se utilizó el lado derecho como control, comparándolo con el izquierdo donde fue inyectado el MPP⁺.

3.14 INYECCION DEL MPP⁺ EN VENTRICULO LATERAL

Procedimiento quirúrgico

Para la operación se usaran ratas adultas macho de la raza Wistar. Una vez anestesiadas las ratas con hidrato de cloral (400 mg/Kg i.p.) fueron colocadas en un estereotáxico Kopf. Se utilizaron barras de oído con punta roma, quedando el cráneo en posición horizontal (Paxinos and Watson, 1986). Antes de comenzar la operación, se puso lidocaina como anestésico local (10% p/v). Una vez que se cortó la piel y el cráneo quedó descubierto, se hizo un pequeño agujero horadando sobre este en la región que queda sobre el ventrículo cerebral lateral (A/P -0.8 mm y L/M 1.4 mm, de bregma). Una aguja inoxidable de 30-gauge de punta roma conectada a una microjeringa Hamilton de 5 μ l fue introducida lentamente en el agujero hasta alcanzar 3,6 mm de profundidad ventral a la superficie del cerebro usando el manipulador estereotáxico. Después de 5 minutos fue inyectada la neurotoxina MPP⁺ yoduro (R.B.I, Natick, MA, USA) con una dosis de 62,5 μ g/rata en 1 μ l/min. La aguja fue dejada en el lugar durante otros 15 minutos después de finalizada la perfusión, para prevenir la filtración o difusión de la toxina desde el sitio de inyección, siendo después retirada lentamente. La piel fue cosida usando grapas y la rata colocada en una caja bajo una lámpara de calor, hasta que se recuperó de la operación y se devolvió a su caja habitual. Los controles fueron manipulados de la misma manera inyectándose 1 μ l de solución salina.

3.15 CUANTIFICACION DE TIROSINA HIDROXILASA

La determinación de la cantidad de Tirosina hidroxilasa (TH) se llevó a cabo mediante la técnica E.L.I.S.A. (enzyme-linked immunoabsorbent assay). Previamente se realizaron curvas de saturación para determinar la cantidad de proteína en pocillo.

Las curvas de saturación se realizaron colocando en los pocillos cantidades crecientes de proteína total del extracto desde 0 a 50 μg y completando cada una de ellas con BSA disuelta en tampón carbonato-bicarbonato hasta una cantidad fija para todos los pocillos de 50 μg de proteína total (extracto y BSA).

Una vez fijada la concentración de proteína de los extractos en pocillo se realizaron curvas para fijar la concentración óptima de los diferentes anticuerpos utilizados.

Los antígenos fueron diluidos a la concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en tampón carbonato-bicarbonato, pH 9. De cada una de estas soluciones se añadieron por triplicado, 100 μl a los pocillos de una placa NUNC, la cual se incubó toda la noche a 4 °C. El exceso de antígeno fue eliminado por inversión de la placa que se lavó tres veces con PBS-Tween 20. Los sitios de unión no ocupados fueron bloqueados con una solución de BSA al 3% en PBS, de la cual se añadieron 200 μl a cada pocillo. Tras una hora de incubación a temperatura ambiente la placa se lavó cinco veces con PBS-Tween. Seguidamente, los pocillos fueron incubados con una solución del anti-TH monoclonal diluido 100 veces en PBS-Tween durante una hora a temperatura ambiente, después de la cual se lavó la placa como anteriormente y se incubó con un segundo anticuerpo biotinilado (diluido 500 veces en PBS-Tween) durante una hora a temperatura ambiente. Tras los lavados, se añadieron a cada pocillo 100 μl de una solución de avidina marcada con peroxidasa diluida 100 veces en PBS-Tween y se incubaron una hora a temperatura ambiente. De nuevo se procedió al lavado como en pasos anteriores y a continuación se añadieron a cada pocillo 100 μl de la solución sustrato (10 mg de ABTS disueltos en 100 ml de tampón citrato pH 5,5 y agua oxigenada al 0,02%).

La reacción se desarrolló hasta los 60 minutos a temperatura ambiente y oscuridad, procediéndose a la lectura de la absorbancia a 405 nm.

3.16 CUANTIFICACION DE NEUROFILAMENTOS Y GLIA.

Se realizó como se describe anteriormente para la TH. Los antígenos fueron diluidos a la concentración de 250 $\mu\text{g/ml}$. Los anticuerpos utilizados fueron monoclonales frente a neurofilamentos de 68 Kd, 160 Kd y proteína ácida de glía y se diluyeron 40 veces en PBS-Tween.

3.17 ANALISIS ESTADISTICO

En los experimentos con el tratamiento de Deprenilo fue aplicado un análisis de varianza Kruskal-Wallis. Cuando el nivel de confianza fue mayor del 95% las medias fueron comparadas con el test de Wilcoxon. En los experimentos con dietas deficientes en Vitamina E y selenio fue aplicado un análisis de varianza Kruskal-Wallis. Cuando el nivel de confianza fue mayor del 95% las medias fueron comparadas con el test de Mann-Whitney. En los tratamientos con acetil-L-carnitina fue aplicado un análisis de varianza (ANOVA). Cuando se observaran diferencias las medias fueron comparadas con el test de Scheffe (test paramétrico).

4. RESULTADOS

4. 1 EFECTOS DE LA DISMINUCION EN LA DIETA DE LA VITAMINA E O EL SELENIO.

Con el fin de obtener animales con una menor capacidad de protección frente a los daños oxidativos, se alimentó a las ratas, durante distintos periodos de tiempo, con una dieta deficiente en vitamina E o selenio.

4.1.1 Dieta deficiente en Vitamina E

4.1.1.1 Peso corporal y cantidad de dieta ingerida.

Los animales fueron sometidos a una dieta deficiente en vitamina E por un periodo de 15 ó 30 días. Durante este tiempo se estudio la cantidad de alimento ingerido asi como el incremento de peso producido en dichos animales. No hubo diferencias, ni en el incremento del peso corporal ni en la cantidad de alimento ingerido, en los animales alimentados con dieta deficiente en Vitamina E con respecto a los alimentados con dieta control.

	<u>Alimento ingerido</u>		<u>Increment. de Peso corporal</u>	
	<u>Controles</u>	<u>Def. Vit.E</u>	<u>Controles</u>	<u>Def. Vit.E</u>
15 días	16,1 ± 2,7	16,8 ± 0,3	30,0 ± 4,8	33,4 ± 7,8
30 días	19,1 ± 2,7	20,9 ± 3,1	90,0 ± 6,8	93,4 ± 7,6

Los resultados son la media ± DE de 6 y 8 animales, para los periodos de 15 y 30 días respectivamente. El alimento ingerido viene expresado como g/animal/día . El incremento del peso corporal viene dado como g/animal durante el periodo de la dieta.

4.1.1.2 Estudio de diferentes mecanismos de protección frente a las oxidaciones: Actividades de las enzimas glutatión peroxidasa, SOD y catalasa.

Las enzimas glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa (SOD) y catalasa forman parte de los principales mecanismos de protección celular frente a las oxidaciones. Su estudio esta representado en la Tabla 1. Como puede verse, no hubo cambios significativos en las actividades de estas tres enzimas comparando el estriado de ratas alimentadas con dieta deficiente en vitamina E con el de ratas controles.

Tabla 1. Actividades enzimáticas en estriado de ratas controles y tratadas con dieta deficiente en Vitamina E.

	<u>Controles</u>	<u>Defic. Vit.E</u>
GPx	42,1 ± 2,1	41,4 ± 1,3
SOD	14,8 ± 2,1	12,9 ± 2,2
Catalasa	3,5 ± 0,6	3,6 ± 0,4

Los valores son la media ± DE de 5 animales expresados en mU/mg de proteína para glutatión peroxidasa, y U/mg de proteína para SOD y catalasa.

Estos resultados parecen indicar que la alimentación con una dieta deficiente en vitamina E no afecta a los otros mecanismos de protección frente a las oxidaciones. En este caso por lo tanto la disminución de la capacidad protectora frente a las oxidaciones es producida por la disminución de la concentración de vitamina E en diferentes tejidos (Vatassari, 1987).

4.1.1.3 Estudio de los niveles de aminoácidos en sustancia negra, estriado e hipocampo de ratas tratadas con dieta deficiente en Vitamina E durante 15 días.

El estudio de los niveles de aminoácidos tiene como función la cuantificación de los aminoácidos, principalmente de aquellos que se sabe tienen además funciones de neurotransmisores, GABA, glutamato, glicina, taurina, aspártico, etc. Esto nos puede dar una idea de modificaciones producidas por esta experimentación.

Los niveles de aminoácidos en sustancia negra, estriado e hipocampo muestran distintos perfiles en estas tres regiones cerebrales. Los mayores constituyentes del "pool" de aminoácidos en las tres áreas ensayadas fueron los neurotransmisores aspartato, glutamato, GABA, glicina y taurina.

La sustancia negra contiene mayores niveles de aspartato, glicina, GABA, treonina y triptófano que el estriado (91,0%, 66,6%, 317,7%, 27,0% y 25,7%; $p < 0,01$ para aspartato, glicina y GABA, y $p < 0,05$ para treonina y triptófano). Sin embargo, el estriado, tiene mayores niveles de glutamato (51,2%), taurina (46,7%) y tirosina (106,5%) que sustancia negra ($p < 0,01$).

Cuando se compararan las ratas alimentadas con dieta control con las sometidas a un déficit en vitamina E, se encontró un aumento de glutamato (38,2%), GABA (42,9%) y una disminución del triptófano (37,6%) en sustancia negra, en tanto que en estriado sólo hubo una disminución del aspartato (28,6%) y glicina (35,2%) ($p < 0,01$).

Al contrario que la sustancia negra y el estriado, el hipocampo no mostró cambios en los niveles de aminoácidos después de 15 días de dieta deficiente en vitamina E.

Tabla2. Efecto de 15 días de dieta en vitamina E en la concentración de aminoácidos en estriado, sustancia negra e hipocampo de rata.

	SUS. NEGRA		ESTRIADO		HIPOCAMPO	
	Cont	Defic vit E	Cont	Defic vit E	Cont	Defic vit E
Aspartato	3723 ±542	4095 ±476	1949 ±236 ##	1392 ±187 *	2324 ±204	2025 ±193
Glutamato	4984 ±721	6892 ±857 **	7536 ±351 ##	6779 ±197	6753 ±549	6094 ±702
Glicina	2247 ±465	2116 ±50	1349 ±137 ##	874 ±152 **	1245 ±163	1020 ±98
GABA	8345 ±962	11925 ±147 **	1998 ±189 ##	1826 ±105	1358 ±139	1465 ±219
Taurina	5137 ±434	5326 ±386	735 ±608 ##	6625 ±386	4034 ±129	3706 ±396
Treonina	730 ±132	743 ±154	574 ±49 #	560 ±152	602 ±84	582 ±67
Serina	1073 ±238	181 ±205	1147 ±96	987 ±93	1072 ±121	1207 ±152
Alanina	534 ±48	592 ±45	629 ±40	518 ±62	802 ±91	731 ±65
Fenilalanina	110 ±10	121 ±8	105 ±7	97 ±11	66 ±7	62 ±6
Prolina	113 ±24	129 ±19	93 ±8	121 ±14	72 ±9	85 ±10
Tirosina	154 ±23	122 ±17	318 ±41 ##	259 ±19	202 ±25	223 ±16
Triptófano	14 ±1	9 ±1 **	11 ±1 #	11 ±1	9 ±1	8 ±1

Los valores son la media ± DE expresados en nmol/g tejido, n=6. Significación estadística: *p<0,05; **p<0,01 comparando controles con el grupo experimental. #p<0,05; ##p<0,01 comparando sustancia negra, estriado e hipocampo. (Kruskal-Wallis seguido por el test de Mann-Whitney).

4.1.1.4 Efecto del MPP⁺ en las concentraciones de DA y sus metabolitos en cortes de estriado de ratas controles y alimentadas con dieta deficiente en vitamina E.

No hubo diferencias significativas en la concentración de DA y sus metabolitos entre los cortes de estriado de ratas controles y tratadas con dieta deficiente en vitamina E .

Cuando los cortes de estriado de animales controles fueron incubados con MPP⁺, las concentraciones de DA, DOPAC y HVA disminuyeron (31,8%, 80,4% y 61,7% respectivamente, $p < 0,01$), mientras que la concentración de 3-MT aumentó (79,8%, $p < 0,01$) al compararlo con los cortes sin incubar con MPP⁺.

En animales tratados con dieta deficiente en vitamina E, los cortes de estriado después de la incubación con MPP⁺ mostraron una mayor disminución en las concentraciones de DA (42,2%) y sus metabolitos DOPAC (84,1%) y HVA (60,7%), y un aumento en la concentración de 3-MT (122,3%) con respecto a los incubados sólo con Krebs (Tabla 5).

Tabla 3. Concentración de DA, DOPAC, 3-MT y HVA en cortes de estriado de ratas controles y deficientes en vitamina E incubadas con y sin MPP⁺ (25μM).

	<u>Control</u>	<u>Cont/MPP⁺</u>	<u>Defic.vit E</u>	<u>Defic.vitE MPP⁺</u>
DA	11476 ± 775	7826 ± 481 **	11404 ± 1022	6589 ± 412 ** ##
DOPAC	1284 ± 171	251 ± 21 **	1355 ± 101	216 ± 26 ** #
3-MT	109 ± 16	196 ± 22 **	94 ± 12	209 ± 22 **
HVA	290 ± 42	111 ± 12 **	275 ± 37	108 ± 7 **

Los valores son la media ± DE expresados en ng/g de tejido, n= 8. Significación estadística: **p<0,01 comparando control con control/MPP⁺ y dieta deficiente en vit. E con dieta deficiente en vit. E/MPP⁺; # p<0,05 y ## p<0,01 comparando control/MPP⁺ y deficiente en vit. E/MPP⁺ (Kruskal-Wallis seguido del test de Mann-Whitney).

4.1.2 DIETA DEFICIENTE EN SELENIO

4.1.2.1 Peso corporal y cantidad de dieta ingerida.

Los animales fueron sometidos a una dieta deficiente en selenio por un periodo de 30 días. Durante este tiempo dichos animales no presentaron diferencias, ni en el incremento del peso corporal ni en la cantidad de alimento ingerido, con respecto a los alimentados con dieta control.

La cantidad de alimento (en gramos) ingerido por animal y día fue $19,1 \pm 2,7$ para el grupo control y $19,8 \pm 0,3$ para los animales con dieta deficiente en selenio. En cuanto al incremento de peso fue (en g/animal/mes) de $90,0 \pm 6,8$ para los controles y $85,2 \pm 9,6$ para los animales con dieta deficiente en selenio.

4.1.2.2 Estudio de diferentes mecanismos de protección frente a las oxidaciones: Actividades de las enzimas Glutación peroxidasa, SOD y catalasa.

La actividad glutación peroxidasa, disminuyó un 34,8% ($p < 0,01$) comparando los animales controles, con los animales alimentados con una dieta deficiente en selenio, con unos valores de $47,53 \pm 3,1$ mU/mg prot y $29,26 \pm 1,5$ mU/mg prot respectivamente. Las actividades de las enzimas superóxido dismutasa y catalasa no se modificaron. Estos datos indican que la alimentación con una dieta pobre en selenio disminuye la capacidad de protección frente a las oxidaciones mediante el descenso de la actividad glutación peroxidasa, disminuyendo por tanto la actividad del sistema glutation-glutación peroxidasa.

4.1.2.3 Efecto de la disminución de la capacidad protectora frente a las oxidaciones producidas por la alimentación deficiente en selenio sobre la acción tóxica del MPP⁺.

Los experimentos se llevaron a cabo de forma semejante a los efectuados con animales alimentados con una dieta deficiente en vitamina E. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Los cortes de estriado no presentaron diferencias significativas en las concentraciones de DA y sus metabolitos cuando se compararon ratas controles y ratas alimentadas con dieta deficiente en selenio.

En los animales alimentados con dieta control, la incubación de los cortes con MPP⁺ produjo una disminución significativa en las concentraciones de DA, DOPAC, y HVA (35,7%, 79,9% y 62,3% respectivamente, $p < 0,01$), y un aumento en la concentración de 3-MT (84,3%, $p < 0,01$) con respecto a los incubados sólo con krebs (Tabla 4).

En los alimentados con dieta deficiente en selenio, la incubación de los cortes con MPP⁺ también produjo una disminución significativa en las concentraciones de DA (55,9%) y sus metabolitos DOPAC (88,0%) y HVA (77,1%), y un aumento en la concentración de 3-MT (105,2%) con respecto a los incubados sólo con krebs (Tabla 4).

Como puede observarse, los cambios producidos por la incubación con MPP⁺ fueron mayores en los animales alimentados con selenio en los alimentados con dieta control.

La concentración de DA, DOPAC y HVA después de la incubación con MPP⁺ fue significativamente mayor en ratas tratadas con dieta deficiente en vitamina E que en ratas tratadas con dieta deficiente en selenio (30,5%, $p < 0,01$ para DA; 41,2%, $p < 0,05$ para DOPAC y 56,5%, $p < 0,01$ para HVA) indicando un mayor efecto neurotóxico del MPP⁺ en ratas tratadas con dieta deficiente en selenio.

Table 4. Concentración de - DA, DOPAC, 3-MT y HVA en cortes de estriado de ratas controles y deficientes en selenio incubadas con y sin MPP⁺ (25μM).

	<u>Control</u>	<u>Control/ MPP⁺</u>	<u>Defic. selenio</u>	<u>Defic. selenio MPP⁺</u>
DA	11966 ± 411	7690 ± 183 **	11458 ± 503	5048 ± 735 ** #
DOPAC	1300 ± 88	261 ± 23 **	1279 ± 121	153 ± 29 ** #
3-MT	121 ± 16	223 ± 15 **	116 ± 14	238 ± 30 **
HVA	313 ± 31	118 ± 14 **	302 ± 52	69 ± 10 ** #

Los valores son la media ± DE expresados en ng/g de tejido, n= 8. Significación estadística **p<0,01 comparando control y control/MPP⁺, y deficiente en selenio con deficiente en selenio/MPP⁺; #p<0,05 y ##p<0,01 comparando control/MPP⁺ y deficiente en selenio/MPP⁺ (Kruskal-Wallis seguido de test de Mann-Whitney).

4.2 EFECTO DEL TRATAMIENTO CON DEPRENILO, INHIBIDOR DE LA ENZIMA MONOAMINA OXIDASA, SOBRE LA ACCION TOXICA DEL MPP⁺.

4.2.1 Efecto del MPP⁺ en la concentración de DA y sus metabolitos.

Para el estudio del efecto del deprenilo se trató a las ratas con deprenilo (2 mg/kg/día, inyección subcutánea) durante 3 semanas.

Después del tratamiento con deprenilo el estriado mostró un incremento en la concentración de DA (25%) y 3-MT (60%), así como una disminución en la concentración de DOPAC (60%) y HVA (75%) comparado con los controles. Estos resultados demuestran la inhibición producida por el deprenilo sobre la actividad de la MAO.

Para el estudio del posible efecto protector del deprenilo frente a la toxicidad del MPP⁺, comparamos el efecto del MPP⁺ en cortes de estriado en animales tratados y no tratados con deprenilo. Cuando los cortes de animales controles fueron incubados con MPP⁺, se produjo una disminución de las concentraciones de DA (39%), DOPAC (81%) y HVA (64%), y un incremento en la concentración del 3-MT (83%) comparado con los controles.

Sin embargo, en animales previamente tratados con deprenilo, el efecto del MPP⁺ fue menor. Hubo una disminución en las concentraciones de DA (22%) y sus metabolitos DOPAC (58%) y HVA (18%), y un incremento en la concentración del 3-MT (30%), comparado con los controles (Tabla 5).

Tabla 5. Concentración de DA, DOPAC, 3-MT y HVA en cortes de estriado de ratas controles y tratadas con Deprenilo incubadas con y sin MPP⁺ (25 μ M).

	<u>Control</u>	<u>Cont/MPP⁺</u>	<u>Deprenilo</u>	<u>Deprenilo MPP⁺</u>
DA	13372 \pm 751	8111 \pm 638 **	16726 \pm 611 ##	12912 \pm 715 **
DOPAC	1398 \pm 95	254 \pm 23 **	582 \pm 48 ##	241 \pm 13 **
3-MT	121 \pm 15	221 \pm 17 **	197 \pm 11 ##	257 \pm 9 **
HVA	303 \pm 30	108 \pm 7 **	107 \pm 8 ##	88 \pm 13 *

Los valores son la media \pm DE expresados en ng/g de tejido, n=6. Significación estadística *p<0,05 **p<0,01 comparando control con MPP⁺ y deprenilo con deprenilo-MPP⁺ ##p<0,01 comparando control con deprenilo. (Kruskal-Wallis seguido del test de Wilcoxon).

4.2.2 Estudio de diferentes mecanismos de protección frente a las oxidaciones: Actividades de las enzimas glutatión peroxidasa, SOD y catalasa.

Nuestros resultados muestran un aumento en la actividad de SOD (48%, $p < 0,01$) y catalasa (46% $p < 0,05$) en el estriado de las ratas tratadas con deprenilo comparadas con los estriados de las ratas controles.

La actividad de la SOD fue de $5,23 \pm 0,88$ U/mg prot en el estriado de las ratas tratadas con solución salina y $7,74 \pm 1,42$ U/mg de prot en el estriado de las ratas tratadas con deprenilo.

La actividad de la catalasa fue de $3,84 \pm 0,85$ U/mg de prot en el estriado de las ratas tratadas con solución salina y $5,60 \pm 0,51$ U/mg de prot en el estriado de las ratas tratadas con deprenilo (los resultados son media \pm DE de 6 animales) (Tabla 6).

4.2.3 Grupos Carbonilos

La medida de grupos carbonilos es un buen método de medida de los daños oxidativos producidos en las proteínas. Nuestros resultados no mostraron cambios estadísticamente significativos entre los cuatro grupos en los que se determinaron los niveles de grupos carbonilos.

Los niveles de los grupos carbonilos fueron: $62,18 \pm 18,9$ cpm/ μ g de prot en cortes de estriado de ratas tratadas con solución salina; $64,95 \pm 10,63$ cpm/ μ g prot en cortes de estriados de ratas tratadas con solución salina e incubados con MPP⁺; $58,75 \pm 9,83$ cpm/ μ g de proteína en cortes de estriado de ratas tratadas con deprenilo y $62,65 \pm 14,97$ cpm/ μ g de prot en cortes de estriado de ratas tratadas con deprenilo e incubados con MPP⁺ (los valores son la media \pm DE de 6 determinaciones).

Tabla 6. Actividades enzimáticas en estriado de ratas controles y tratadas con Deprenilo.

	<u>Controles</u> <u>Solución salina</u>	<u>Deprenilo</u>
SOD	5,23 ± 0,88	7,74 ± 1,42 **
CATALASA	3,84 ± 0,35	5,60 ± 0,51 *

Los valores son la media ± DE expresados en U/mg de proteína, n=6. Significación estadística *p<0,05; **p<0,01, comparando control con deprenilo. (Kruskal-Wallis seguido del test de Wilcoxon).

4.4 TRATAMIENTO CON ACETIL-L-CARNITINA

4.4.1 Estudio "in vitro":

Efecto del MPP⁺ en la concentración de DA y sus metabolitos en cortes de estriado.

No hubo diferencias significativas en las concentraciones de DA y sus metabolitos cuando se compararon cortes de estriado de ratas controles con los procedentes de los dos tratamientos con acetil-L-carnitina (una inyección i.p. 3 h antes de la decapitación, o una inyección i.p. diaria durante 1 semana antes de la decapitación).

Para el estudio del mecanismo protector de la ALC frente a la toxicidad del MPP⁺, comparamos el efecto del MPP⁺ en cortes de estriado en animales tratados y no tratados con ALC. Cuando los cortes fueron incubados solamente con MPP⁺, se produjo una disminución de las concentraciones de DA (28 %), DOPAC (83%) y HVA (42%), y un incremento en la concentración de 3-MT (85%) comparado con los controles (Tabla 7).

En los animales tratados con ALC 3 horas o durante 7 días antes de la decapitación, la toxicidad del MPP⁺ fue similar a los animales no tratados. Por lo tanto la ALC en el experimento "in vitro" no mostró protección frente al neurotóxico MPP⁺.

Table 7. Concentración de DA, DOPAC, 3-MT y HVA en cortes de estriado de ratas controles y tratadas con acetil-L-carnitina incubados con y sin MPP⁺ (25 μ M).

	<u>Control</u>	<u>Control</u> <u>MPP⁺</u>	<u>ALC/3h</u>	<u>ALC/3h</u> <u>MPP⁺</u>	<u>ALC/7d</u>	<u>ALC/7d</u> <u>MPP⁺</u>
DA	8405 ± 485	6090* ± 527	7676 ± 648	5851* ± 945	8706 ± 480	6629* ± 391
DOPAC	1124 ± 221	186* ± 62	941 ± 186	189* ± 19	1071 ± 311	140* ± 22
3-MT	20 ± 5	91 ± 33	98 ± 15	123 ± 38	31 ± 12	68 ± 17
HVA	33 ± 12	19 ± 8	55 ± 9	34 ± 12	32 ± 14	17 ± 3

Los valores son la media \pm DE expresados en ng/g de tejido, n= 8. Significación estadística: *p<0,05 comparando control con control/MPP⁺, y ALC/3h con ALC/MPP⁺3h y ALC/7d. con ALC/MPP⁺7d. (Test de Scheffe).

4.4. 2 Estudio "in vivo"

4.4.2.1 Mortalidad

Dos días después de una inyección intraventricular única de MPP⁺ (62,5 µg/rata) la mortalidad fue de 50 %. En contraste, en el grupo tratado con ALC durante los tres días anteriores y los 5 días posteriores a una inyección i.v. única de MPP⁺ (62.5 µg/rata), no se produjeron muertes.

4.4.2.2 Efecto del tratamiento con ALC en la neurotoxicidad del MPP⁺ en sustancia negra y estriado.

La inyección intraventricular de MPP⁺ produjo un gran efecto en el sistema dopaminérgico del estriado. Después de la inyección del MPP⁺ hubo una disminución en las concentraciones de DA (83%) y sus metabolitos DOPAC (69%), 3-MT (47%) y HVA (35%) con respecto a los animales controles. El sistema serotoninérgico también fue afectado aunque en menor proporción, observándose una disminución de las concentraciones de 5-HT (51%) y su metabolito 5-HIAA (53%) Tabla 8.

En los animales tratados con ALC, la toxicidad del MPP⁺ fue similar a los no tratados. Las concentraciones de DA disminuyeron cerca del 92% en los tratados con ALC frente al 83% de los animales no tratados con ALC. El estudio de sus metabolitos mostró resultados similares. En el sistema serotoninérgico, la concentración de 5-HT disminuyó un 53% en los no tratados frente a 68% de los tratados con ALC. Cuando se estudian los valores individuales hallados en ambos grupos es interesante tener en cuenta que: a) hubo una considerable variabilidad individual entre los animales; b) las concentraciones de DA en animales no tratados estaban en un rango de 200 a 2000 ng/g, en tanto que en los animales tratados con ALC estaban en un rango de 10 a 3000 ng/g, con un 50% de los animales de este grupo mostrando una concentración de DA inferior a 200 ng/g valor este que coincide con el más bajo encontrado en animales no tratados. **Fig. 11.**

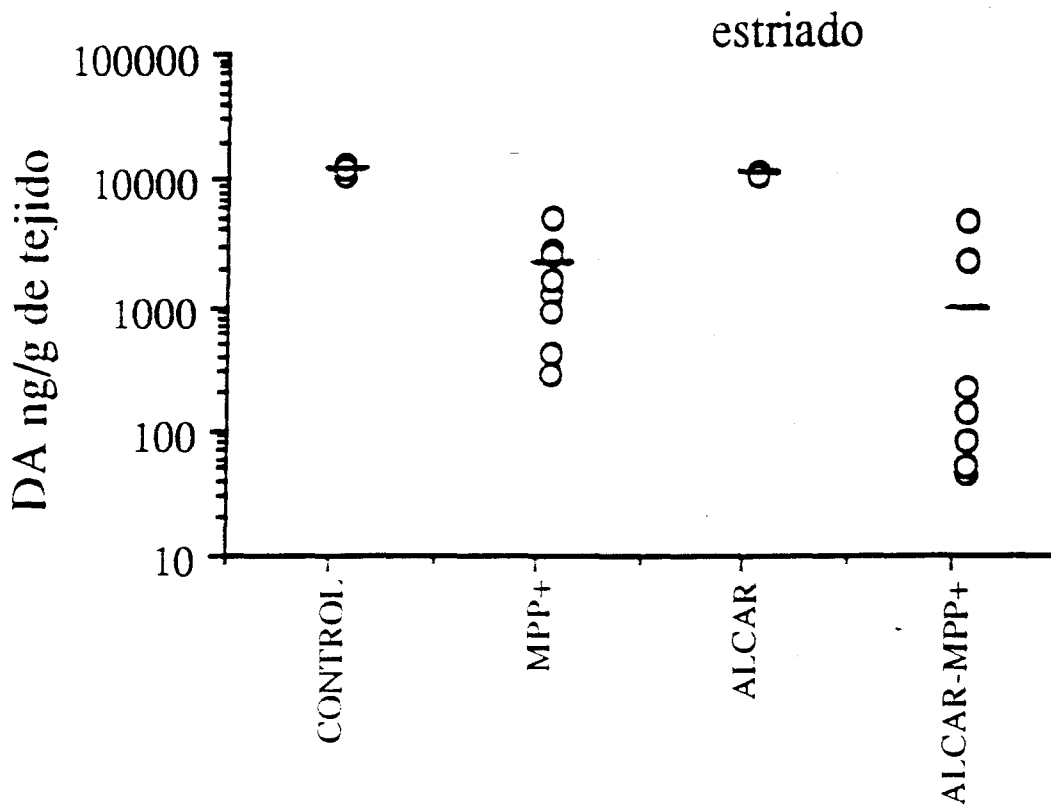


Figura 11. Efecto de una inyección intraventricular de MPP⁺ sobre la concentración de DA en estradiado de ratas controles y tratadas 8 días con acetil-L-carnitina. Los círculos representan los valores individuales de concentración de DA representados en una escala semilogarítmica. La línea horizontal representa la media. n= 5 para controles y ALC; n=8 para MPP⁺ y ALC/MPP⁺.

La sustancia negra no mostró cambios en las concentraciones de DA y sus metabolitos tras la inyección (i.v.) del MPP⁺ y lo mismo ocurrió con el sistema serotoninérgico. Tabla 9.

4.4.2.3 Efecto del tratamiento con ALC en la neurotoxicidad del MPP⁺ en bulbo olfatorio, eminencia media e hipófisis.

La inyección intraventricular de MPP⁺ no afecta la concentración de DA y sus metabolitos en el bulbo olfatorio (Tabla 10), pero produce un gran efecto en eminencia media e hipófisis (Tablas 11 y 12), efecto similar al encontrado en el estriado, principalmente en lo que respecta a las concentraciones de DA. La disminución de DA fue mayor en hipófisis (95%) que en eminencia media (70%). Con respecto a las concentraciones de los metabolitos hubo una disminución en ambas estructuras, aunque de menor extensión que en las concentraciones de DA. Estas disminuciones fueron también menores que en el estriado. Al contrario del estriado, el sistema serotoninérgico no fue afectado en eminencia media e hipófisis. El tratamiento con ALC no posee acción protectora en ninguna de estas dos estructuras frente a la toxicidad del MPP⁺. Sin embargo, como en el estriado, también en la hipófisis hubo una considerable variabilidad individual entre los animales.

Tabla 8. Concentración de DA, DOPAC, 3-MT, HVA, 5-HT y 5-HIAA en estriado de ratas controles y tratadas 8 días con acetil-L-carnitina, con y sin MPP⁺.

	<u>Control</u>	<u>Cont/MP⁺</u>	<u>ALC</u>	<u>ALC/MP⁺</u>
DA	9509 ± 422	1690 ± 915*	8670 ± 363	727 ± 922*
DOPAC	1191 ± 99	369 ± 62*	1087 ± 63	241 ± 140*
3-MT	367 ± 88	193 ± 42*	332 ± 28	184 ± 33*
HVA	470 ± 40	307 ± 44**	400 ± 17	241±116**
5-HT	401 ± 94	195 ± 69**	285 ± 33	92 ± 68**
5-HIAA	203 ± 26	96 ± 24*	166 ± 14	99 ± 15*

Los valores son la media ± DE expresados en ng/g de tejido, n= 8. Significación estadística: *p>0,01; **p<0,05, comparando control con control/MPP⁺ y ALC con ALC/MPP⁺ (Test de Scheffe).

Tabla 9. Concentración de DA, DOPAC, 3-MT, HVA, 5-HT y 5-HIAA en sustancia negra de ratas controles y tratadas 8 días con acetil-L-carnitina con y sin MPP⁺.

	<u>Control</u>	<u>Cont/MPP⁺</u>	<u>ALC</u>	<u>ALC/ MPP⁺</u>
DA	472 ± 23	424 ± 79	438 ± 79	331 ± 67
DOPAC	79 ± 9	72 ± 14	81 ± 5	77 ± 10
3-MT	28 ± 5	26 ± 9	33 ± 7	31 ± 9
HVA	37 ± 2	37 ± 4	40 ± 3	45 ± 5
5-HT	806 ± 141	759 ± 114	915 ± 119	662 ± 56
5-HIAA	165 ± 58	163 ± 36	177 ± 36	120 ± 20

Los valores son la media ± DE expresados en ng/g de tejido, n= 8. No se encontraron diferencias significativas en los distintos grupos (Test de Scheffe).

Tabla 10. Concentración de DA, DOPAC, 3-MT, HVA, 5-HT y 5-HIAA en bulbo olfatorio de ratas controles y tratadas 8 días con acetil-L-carnitina, con y sin MPP⁺.

	<u>Control</u>	<u>Cont/MPP⁺</u>	<u>ALC</u>	<u>ALC/MPP⁺</u>
DA	676 ± 64	790 ± 204	724 ± 80	721 ± 164
DOPAC	261 ± 9	213 ± 33	223 ± 24	185 ± 80
3-MT	137 ± 30	168 ± 92	182 ± 65	218 ± 61
HVA	125 ± 13	86 ± 16	116 ± 28	86 ± 24
5-HT	397 ± 92	380 ± 104	373 ± 40	394 ± 51
5-HIAA	55 ± 5	45 ± 12	38 ± 5	53 ± 6

Los valores son la media ± DE expresados en ng/g de tejido, n= 8. No se encontraron diferencias significativas en los distintos grupos (Test de Scheffe).

Tabla 11. Concentración de DA, DOPAC, 3-MT, HVA y 5-HT en hipófisis de ratas controles y tratadas 8 días con acetil-L-carnitina, con y sin MPP+.

	<u>Control</u>	<u>Cont/MPP+</u>	<u>ALC</u>	<u>ALC/MPP+</u>
DA	195 ± 44	10 ± 1*	180 ± 64	18 ± 5*
DOPAC	146 ± 37	75 ± 44	119 ± 12	87 ± 34
3-MT	23 ± 8	21 ± 3	13 ± 10	10 ± 0.6
HVA	15 ± 5	17 ± 3	12 ± 7	17 ± 7
5-HT	90 ± 19	92 ± 29	136 ± 25	137 ± 25

Los valores son la media ± DE expresados en ng/g de tejido, n= 8. Significación estadística: *p>0,01; **p<0,05, comparando control con control/MPP+ y ALC con ALC/MPP+ (Test de Scheffe).

Tabla 12. Concentración de DA, DOPAC, HVA, 5-HT y 5-HIAA en eminencia media de ratas controles y tratadas 8 días con acetil-L-carnitina, con y sin MPP⁺.

	<u>Control</u>	<u>Cont/MPP⁺</u>	<u>ALC</u>	<u>ALC/MPP⁺</u>
DA	269 ± 50	83 ± 25*	276 ± 51	77 ± 17*
DOPAC	119 ± 17	44 ± 8*	102 ± 15	36 ± 7*
HVA	20 ± 5	22 ± 7	13 ± 4	20 ± 6
5-HT	124 ± 9	210 ± 77	117 ± 8	117 ± 10
5-HIAA	38 ± 6	37 ± 5	42 ± 7	41 ± 19

Los valores son la media ± DE expresados en ng/g de tejido, n= 8. Significación estadística: *p>0,01; **p<0,05, comparando control con control/MPP⁺ y ALC con ALC/MPP⁺ (Test de Scheffe).

4.4.2.4 Efecto del tratamiento de la ALC frente al neurotóxico MPP⁺ en relación a la cantidad de Tirosina Hidroxilasa, Neurofilamentos y Glía en estriado y sustancia negra.

En estriado, la estructura mas afectada por el MPP⁺, hemos estudiado la cantidad de la enzima Tirosina Hidroxilasa (TH), neurofilamentos y glía. Nuestros resultados muestran una disminución significativa en la cantidad de Tirosina hidroxilasa en estriado de ratas tratadas con MPP⁺ en relación a los controles (40%), y lo mismo ocurrió con la ALC.

Encontramos una disminución significativa en los neurofilamentos. La GFAP muestra un ligero aumento como corresponde al daño neuronal, aunque no hubo diferencias con o sin el tratamiento de ALC.

Tabla 13. Cantidad de Tirosina Hidroxilasa, Neurofilamentos y Proteína ácida de Glía en estriado de ratas controles y tratadas con ALC con y sin MPP⁺.

	<u>Control</u>	<u>Cont/MPP⁺</u>	<u>ALC</u>	<u>ALC/MPP⁺</u>
TH	0,476 ± 0,038	0,309 ± 0,037 *	0,475 ± 0,043	0,264 ± 0,107 **
Neurof. 68 KD	0,446 ± 0,058	0,294 ± 0,012	0,416 ± 0,088	0,258 ± 0,109
GFAP	0,777 ± 0,013	0,791 ± 0,088	0,722 ± 0,010	0,869 ± 0,156

Los resultados fueron obtenidos a una absorbancia de 405 nm, utilizando anticuerpos monoclonales para TH, Neurofilamentos de 68 KD y proteína ácida de glía como se describe en Material y Métodos. Significación estadística: #p<0,05, ##p<0,01, comparando control con control/MPP⁺; *p<0,05 comparando ALC con ALC/MPP⁺. Análisis de varianza seguido del test de Scheffe.

Tabla 14. Cantidad de Tirosina Hidroxilasa, Neurofilamentos y Proteína ácida de Glía en sustancia negra de controles y ratas tratadas con ALC con y sin MPP⁺.

	<u>Control</u>	<u>Cont/MPP⁺</u>	<u>ALC</u>	<u>ALC/MPP⁺</u>
TH	0,398± 0,042	0,381 ± 0,020	0,416 ± 0,064	0,442 ± 0,079
Neurof 68 KD	0,611 ± 0,024	0,610 ± 0,055	0,654 ± 0,178	0,626 ± 0,048
GFAP	0,766 ± 0,024	0,770 ± 0,032	0,836 ± 0,032	0,826 ± 0,050

Los resultados fueron obtenidos a una absorbancia de 405 nm, utilizando anticuerpos monoclonales para TH, Neurofilamentos de 68 KD y proteína ácida de glía como se describe en Material y Métodos. Significación estadística: #p<0,05, ##p<0,01, comparando control con control/MPP⁺; *p<0,05 comparando ALC con ALC/MPP⁺. Análisis de varianza seguido del test de Scheffe.

5. DISCUSSION

5.1 Efecto de la disminución de la capacidad de protección celular frente a las oxidaciones.

Hemos obtenido animales con una disminución en su capacidad de protección celular frente a las oxidaciones alimentándolos con dietas pobres en vitamina E o selenio. Hemos medido las actividades SOD, glutatión peroxidasa y catalasa, implicadas en esta función de protección frente a las oxidaciones.

La alimentación con una dieta deficiente en selenio produjo una pérdida significativa de actividad glutatión peroxidasa (38.4%). Estos resultados están de acuerdo con los publicados previamente por Sutphin y Buckman (1991). La pérdida de actividad glutatión peroxidasa es debida al requerimiento de Selenio, para su actividad, que forma parte del centro activo de la enzima (Rotruck y col., 1973). La enzima glutatión peroxidasa forma parte del sistema de protección glutatión-glutatión peroxidasa, de modo que estos dos factores no actúan independientemente. La administración de glutatión exógeno no protege a las ratas deficientes en selenio de la hiperoxia hiperbárica, sugiriendo que es necesaria una actividad normal de la enzima glutatión peroxidasa en los tejidos para que el glutatión induzca la acción protectora (Jenkinson y col., 1989). Los animales alimentados con una dieta deficiente en vitamina E no presentaron cambios en estas actividades, por lo que en este caso la disminución de la capacidad protectora frente a las oxidaciones es producida por pérdida de vitamina E en distintos tejidos, incluido el SNC (Vatassery y col., 1984).

5.1.1 Efecto de la disminución de la capacidad protectora frente a las oxidaciones producida por una dieta deficiente en vitamina E en los niveles de aminoácidos en la sustancia negra, estriado e hipocampo de la rata.

Algunos aminoácidos neurotransmisores parecen estar implicados en el proceso degenerativo del estriado y ganglios basales en diferentes enfermedades neurodegenerativas (Coyle, 1987). Recientemente, se ha propuesto que antago-nistas de aminoácidos excitadores podrían tener efecto en el tratamiento del Parkinson (Klockgether y Turski, 1989).

Estos autores sugieren que los antagonistas del subtipo NMDA del receptor de glutamato ejercen una acción antiparkinsoniana mediante el bloqueo de la transmisión glutamatérgica en la parte reticulada de la sustancia negra. Por otra parte, los radicales libres derivados del oxígeno son especies químicas altamente reactivas que han sido también relacionados con secuelas neurológicas, en algunos casos, asociadas con la deficiencia en vitamina E (Halliwell y Gutteridge, 1985). La vitamina E tiene diferentes acciones, entre ellas de "scavenger" de radicales peróxidos en la peroxidación lipídica (Doba y col. 1985), teniendo un importante papel en la función neurológica normal (Muller y col. 1983; Harding, 1987). La administración de tocoferol retrasa el inicio de la necesidad de la terapia con L-dopa en pacientes que están en el estadio inicial de la enfermedad de Parkinson, (DATATOP, 1989). Por todo ello, parece interesante estudiar la concentración de los aminoácidos en las principales estructuras implicadas en la enfermedad de Parkinson, así como el efecto que sobre ellos tiene la deficiencia en vitamina E.

Nuestros resultados muestran que una dieta deficiente en vitamina E afecta selectivamente a los niveles de algunos aminoácidos, principalmente glutamato, aspartato, GABA y glicina, los cuales actúan como neurotransmisores. Sin embargo, algunos de ellos tienen otra función específica. Una parte significativa del contenido de glutamato en sustancia negra sirve como precursor de la síntesis de GABA (Fahn, 1976) y el triptófano lo es a su vez de la serotonina. La sustancia negra y el estriado muestran cambios en algunos aminoácidos. Sin embargo, no hemos encontrado cambios significativos en la concentración de los aminoácidos en hipocampo. Esto parece indicar que la sustancia negra y el estriado son más sensibles a la deficiencia de vitamina E que el hipocampo.

En nuestras condiciones de estudio, la deficiencia en vitamina E produjo un aumento significativo de la concentración de glutamato y GABA en sustancia negra produciéndose, por el contrario, una disminución en triptófano. Debido a la estrecha conexión entre las terminales catecolaminérgicas y gabaérgicas encontrada en varias regiones cerebrales, la modulación de la liberación de GABA por el sistema catecolaminérgico ha sido muy estudiada (Saransaari y Oja, 1992). En las mismas condiciones de dieta, se encontró en sustancia negra

un aumento en la concentración y turnover de DA (Castaño y col., 1993). La relación entre DA y GABA en esta estructura ha sido descrita con resultados contradictorios. Por ejemplo, ha sido descrito en cortes de sustancia negra de rata que la DA libera directamente GABA recién adquirido (Reubi y col., 1977). Sin embargo, estos resultados han sido refutados por Kelly y colaboradores (1985). El aumento de GABA podría también ser explicado por una interacción entre los sistemas neurotransmisores de Glutamato y de GABA, como lo sugiere el aumento en la captación de GABA-clorhidrato producido por el glutamato (Schatzki y col., 1990) y la posibilidad de una modulación sináptica de liberación de GABA por glutamato (Docherty y col., 1987). En el estriado, la disminución de aspartato podría ser debida a cambios en los niveles de DA. La relación entre catecolaminas y aspartato ha sido recientemente estudiada por Yamoto y colaboradores (1992) mostrando que la liberación de aspartato es inhibida por los agonistas de los receptores D1 y D2. Nuestro laboratorio encontró con anterioridad que una dieta deficiente en vitamina E produce un aumento en el turnover de DA en estriado (Castaño y col. 1993). La disminución de glicina en el estriado después de una dieta deficiente en vitamina E podría ser explicada por la relación entre glutamato y glicina en esta estructura. Evidencias experimentales indican que además de ser neurotransmisor inhibitorio, la glicina puede tener otra función en el cerebro de mamíferos. Estudios recientes demuestran que la glicina potencia la respuesta del receptor NMDA (Kleckner y Dingledine, 1988). La disminución o mantenimiento del triptófano en la sustancia negra y estriado después de una dieta deficiente en vit. E parece ser independiente de los cambios del 5-HT en esta estructura. Después de una dieta deficiente en vitamina E, los niveles de 5-HT disminuyen en ambas estructuras y en el estriado van en paralelo con la disminución en el turnover del 5-HT, lo cual no ocurre en sustancia negra (Castaño y col. 1993).

Estas diferencias regionales apoyan la hipótesis de que la sustancia negra y el estriado son influenciadas de forma opuesta por la manipulación experimental. Esto mismo ha sido descrito para otros compuestos; por ejemplo, para el glutatión como una consecuencia del estrés tóxico. Después de 2 horas de la administración del MPTP hay un aumento significativo en los niveles de glutatión en la sustancia negra y una disminución en el estriado (Adams y col. 1989). El MPTP induce

estrés oxidativo en el tronco cerebral con mayor efecto en la sustancia negra que en el estriado. Este efecto es debido a la conversión del MPTP en su metabolito MPP⁺ por la MAO B, el cual aparentemente es captado por las terminales DA a través del sistema de captación de DA, y transportado a las células en la sustancia negra.

En el cerebro, los aminoácidos glutamato y GABA son considerados respectivamente los mayores neurotransmisores excitadores e inhibidores (Krnjevic, 1970; Fonnum, 1984). El aumento del glutamato encontrado en sustancia negra es de gran interés, ya que esta estructura está relacionada con la enfermedad de Parkinson (Calne y col., 1986). Este cambio podría ser importante teniendo en cuenta que existe la hipótesis de que la neurotoxicidad mediada por aminoácidos puede estar implicada en la patogénesis del Parkinson (Calne y col., 1986). La disminución de la protección frente a los radicales libres podría iniciar una degeneración neuronal la cual podría ser incrementada si ésta produce a su vez un aumento del aminoácido excitotóxico glutamato. Esta hipótesis concuerda con distintos estudios que demuestran que las neuronas de la sustancia negra son altamente sensibles a una inyección local de aminoácidos excitatorios (Pycock y Dawbarn, 1980) y que antagonistas de estos inyectados en sustancia negra evitan el daño inducido por diferentes compuestos químicos (Desarro y col., 1985).

En conclusión, un dato interesante e importante encontrado en este estudio es el aumento de glutamato en la sustancia negra comparada con otras regiones cerebrales. Es posible que la sustancia negra sea más susceptible a las oxidaciones ambientales. Se acepta que la vitamina E tiene una función fisiológica de "scavenger" de radicales libres (Tappel, 1962). La sustancia negra contiene concentraciones relativamente bajas de antioxidantes tales como glutatión y ubiquinona Q10 (Argentiero y Tavolato, 1980), de modo que el daño oxidativo y/o excitotóxico puede ser responsable de la degeneración de esta estructura en condiciones patológicas. El estrés oxidativo y la toxicidad de los aminoácidos no deben de ser considerados mutuamente exclusivos, y el presente hallazgo aporta un interesante punto de unión entre los dos mecanismos.

5.1.2 Efecto de la disminución de la capacidad protectora frente a las oxidaciones sobre la acción neurotóxica del MPP⁺. Estudio en cortes de estriado de ratas alimentadas con dieta deficiente en vitamina E y selenio.

La adición de MPP⁺ al medio de incubación produjo una fuerte disminución en las concentraciones de DA y sus metabolitos en todas las condiciones ensayadas (controles, ratas deficientes en selenio y deficientes en vitamina E), lo que confirma la acción tóxica del MPP⁺ sobre el sistema dopaminérgico del estriado. La disminución de DA y sus metabolitos fue mayor en los animales que tenían disminuida su capacidad protectora frente a las oxidaciones (ratas deficientes en selenio y deficientes en vitamina E), comparados con los controles. Por lo tanto los resultados indican que la disminución de la capacidad protectora frente a las oxidaciones hace que el MPP⁺ produzca un mayor efecto neurotóxico, por lo que la vulnerabilidad del sistema dopaminérgico a diferentes tóxicos podría estar influenciada por la capacidad de protección frente a las oxidaciones. Estos resultados están de acuerdo con el aumento del efecto neurotóxico del MPTP cuando se produce una disminución de glutatión descrito por Adams y colaboradores (1989) y con los de Odunze y colaboradores (1990) que describen que los ratones con deficiencia de vitamina E son más susceptibles al efecto neurotóxico del MPTP que los controles.

Por otra parte, de las condiciones ensayadas, la pérdida de actividad glutatión peroxidasa por disminución en la dieta de Selenio, produjo una mayor vulnerabilidad al MPP⁺ que la disminución en vitamina E. La disminución de DA, DOPAC y HVA fue significativamente mayor en el estriado de los animales que habían sido alimentados con una dieta deficiente en Selenio que aquellos alimentados con una dieta deficiente en vitamina E. Esta mayor toxicidad producida por el MPP⁺, en el caso de los animales alimentados con la dieta deficiente en selenio, puede ser debida a distintas causas:

- 1) Un mecanismo protector específico. a) Como hemos dicho anteriormente los componentes del sistema glutatión-glutatión reductasa no actúan separadamente. El glutatión actúa como protector de los grupos sulfidrilos de las proteínas. Algunas proteínas con grupos tioles son esenciales para diferentes actividades de las membranas, como por ejemplo, los sistemas de transporte. El transporte de Ca²⁺ en

mitocondria y microsomas (Chavez y col., 1985), puede verse afectado por la disminución de grupos tioles en estas proteínas, lo que puede alterar la homeostasis del calcio celular. b) Su función como "scavenger" de radicales libres o antioxidante. De acuerdo con algunos autores (Bast y Goris, 1989), el sistema glutatión-glutatión peroxidasa-glutatión reductasa está directamente relacionado con el sistema "radical tocoferil reductasa", el cual reduce la forma oxidada del tocoferol. Otros autores (Packer y col., 1979), describen que en el sistema regenerador de tocoferol está implicado el ácido ascórbico (vitamina C), el cual es transformado en radical ácido semidehidroascórbico, que posteriormente sería regenerado a ácido dehidro-ascórbico. En este caso, el glutatión podría estar implicado en la reducción de las formas oxidadas del ácido ascórbico (radical ácido semihidroascórbico y ácido dehidroascórbico) (McKay, 1985). En ambas circunstancias, el glutatión estaría implicado no solamente con su efecto protector específico sino también con la protección producida por la vitamina E, ya que este compuesto es necesario para su regeneración.

2) Turnover de la glutatión peroxidasa. El turnover de la proteína glutatión peroxidasa podría ser mayor que el de la vitamina E. Esto conllevaría que para un mismo tiempo de alimentación con una dieta deficiente en vitamina E o selenio, el efecto de éste último fuera mayor. La disminución en la actividad de la glutatión peroxidasa es de un 38,4%. Sin embargo, la disminución de la vitamina E para el mismo periodo es baja, especialmente en el cerebro (Vatassery y col., 1984).

Todo esto podría justificar el mayor efecto del MPP⁺ en ratas deficientes en selenio, comparadas con la deficiencia en vitamina E. Al mismo tiempo, estos hallazgos "in vitro" sugieren que la disminución en la protección oxidativa debido a modificaciones en la dieta u otras causas, podría producir un aumento de la vulnerabilidad a compuestos tóxicos "in vivo". Esto podría afectar a la velocidad del daño descrito en el sistema dopaminérgico, por ejemplo en el proceso del envejecimiento. Esto mismo se produciría en el caso de cualquier otro mecanismo responsable del daño dopaminérgico que puede estar implicado en la aparición de la enfermedad de Parkinson, fundamentalmente teniendo en cuenta que el daño por radicales de oxígeno se ha sugerido como una de las causas posibles. Además, el mayor efecto del déficit en selenio en relación al de la vitamina E parece indicar un mayor impacto del sistema protector glutatión-glutatión peroxidasa. Este hecho podría ser

importante, teniendo en cuenta que ha sido descrita una disminución del glutatión en el sistema dopaminérgico en la sustancia negra en enfermos de Parkinson (Perry y Yong, 1986; Riederer y col., 1989). Así mismo y debido a que, como hemos ya mencionado, los daños oxidativos podrían ser una posible causa del Parkinson, se han realizados estudios del posible efecto beneficioso de la suplementación con vitamina E en enfermos de Parkinson. Recientemente se han publicado estos estudios, en los que se trataba a los pacientes de Parkinson sólo con deprenilo o bien con deprenilo asociado a la vitamina E (The Parkinson Study Grup, 1993). La suplementación con vitamina E no pareció tener ningún efecto beneficioso adicional al del deprenilo. Teniendo en cuenta nuestros resultados, la suplementación con selenio y/o un precursor del glutatión podría ser más efectivo en la protección del sistema dopaminérgico.

5.2 Efecto del tratamiento con deprenilo, inhibidor de la actividad monoamino oxidasa B, sobre la neurotoxicidad del MPP⁺ en estriado de rata.

El deprenilo retrasa la progresión de los síntomas típicos de la enfermedad de Parkinson por un mecanismo aún desconocido. El deprenilo bloquea la acción del MPTP que induce parkinsonismo evitando la conversión del MPTP en su metabolito tóxico, el ión MPP⁺, mediante la inhibición de la MAO B (Heikkila y col., 1984; Langston y col., 1984) en astrogliá (Ramson y col., 1987; Takada y col., 1990). Por otra parte, se ha descrito que el tratamiento con deprenilo puede aumentar la supervivencia neuronal de la parte compacta de la sustancia negra (SNc) en ratas (Tatton y Greenwood, 1991), y evitar daños del MPTP en neuronas dopaminérgicas del estriado por un mecanismo que es independiente del bloqueo de la conversión del MPTP en MPP⁺ (Tatton y col., 1992).

Después del tratamiento con deprenilo el estriado mostró un incremento en la concentración de DA (25%) y una disminución en la concentración de DOPAC (60%) y HVA (75%) comparado con los controles. Estos cambios podrían ser debidos a una disminución en el catabolismo de la DA, producido por la acción del deprenilo como inhibidor de la MAO B. Sin embargo, este aumento de la concentración de DA también puede tener otras causas, ya que el deprenilo incrementa la concentración de 3-MT (60%), que se utiliza como indicador de la cantidad de DA liberada al espacio sináptico (Altar y col., 1987). Así, el aumento de la concentración de DA podría ser debido a un aumento de su liberación inducido por deprenilo.

Para el estudio del mecanismo protector del deprenilo frente a la toxicidad del MPP⁺, comparamos el efecto del MPP⁺ en cortes de estriado en animales tratados y no tratados con deprenilo. Cuando los cortes fueron tratados solamente con MPP⁺, encontramos una disminución de DA (39%), DOPAC (81%) y HVA (64%), y un incremento del 3-MT (83%) comparado con los controles. Sin embargo, en animales previamente tratados con deprenilo, el efecto del MPP⁺ fue

menor, con una disminución en la concentración de DA (22%), y sus metabolitos DOPAC (58%) y HVA (18%) junto a un incremento del 3-MT (30%) comparado con los controles. Los resultados obtenidos demuestran que el deprenilo protege frente a los efectos tóxicos del MPP⁺. El efecto protector del deprenilo frente al MPTP ha sido atribuido a la inhibición de la MAO B, que es necesaria para la conversión del MPTP en su metabolito activo, MPP⁺ (Birkmayer y col., 1975). Sin embargo, como hemos usado el MPP⁺ directamente, nuestros resultados demuestran que el deprenilo puede proteger por un mecanismo independiente del bloqueo de la conversión MPTP a MPP⁺. La cuestión es cuál sería el mecanismo responsable de tal acción protectora. Está descrito que una de las posibles acciones tóxicas del MPP⁺ es el aumento de la producción de radicales libres. Al mismo tiempo, se ha descrito que el tratamiento con deprenilo produce la inducción de algunas enzimas implicadas en la protección frente a las oxidaciones, SOD y/o catalasa (Carrillo y col., 1991). Nuestros resultados corroboran estas observaciones ya que hemos encontrado un aumento en las actividades SOD (47%, $p < 0,01$) y catalasa (45% $p < 0,05$) en ratas tratadas con deprenilo comparadas con ratas controles. El aumento en las actividades de ambas enzimas produce un aumento de la capacidad de protección frente al estrés oxidativo producido por radicales libres, lo que podría ser la causa del efecto protector encontrado en el tratamiento con deprenilo. Con el fin de estudiar esta posibilidad, medimos los grupos carbonilos contenidos en las proteínas de estriado usando las mismas condiciones que en el estudio de la acción tóxica del MPP⁺. La cantidad de grupos carbonilos se usa como medida de oxidación de proteínas normalmente causada por un aumento de radicales libres (Kim y col., 1985). Nuestros resultados muestran que el MPP⁺ no afecta la cantidad de grupos carbonilos ni en animales controles ni en los tratados con deprenilo. Estos resultados podrían ser debidos a que, bajo nuestras condiciones, no hay aumento de radicales libres, o a que la producción de éstos no es suficiente para superar la capacidad protectora del tejido. Esto sugiere que la oxidación puede no tener una función importante en la toxicidad del MPP⁺ "in vitro", lo que estaría de acuerdo con Frank y colaboradores (1987) que sugieren que el MPP⁺ es incapaz de sufrir reacciones redox en sistemas biológicos. Por otra parte, podría ocurrir que el aumento simultáneo de la actividad SOD y catalasa inducida por deprenilo fuese capaz de proteger de la acción oxidante. Cuando

solamente se produce el aumento de la actividad SOD tiene lugar un aumento de oxidaciones debido a la producción de peróxido de hidrógeno, el cual no puede ser eliminado por la catalasa (Elroy-Stein y col., 1986). En nuestro experimento, ambas actividades están aumentadas, lo cual justificaría la escasa variación encontrada en los grupos carbonilos.

El deprenilo también podría actuar como protector de la acción tóxica del MPP⁺ por otras causas. El MPP⁺ es acumulado selectivamente en las neuronas dopaminérgicas mediante su transporte por el sistema de captación de DA. Se conoce que algunas drogas inhiben selectivamente la captación de catecolaminas. Varias feniletilaminas, tales como anfetaminas, se unen al transportador de catecolaminas, compitiendo con las catecolaminas por el sistema de transporte, y de este modo son concentradas dentro de las neuronas dopaminérgicas. Esta competición podría ser extendida a otros compuestos que utilizan el transportador de la catecolaminas. Esto haría posible que una acción protectora del deprenilo pueda ser debida a una disminución de la captación del MPP⁺ por la saturación de la proteína transportadora de DA producida por el metabolito del deprenilo, una anfetamina.

Estos resultados demuestran que el efecto protector del deprenilo es independiente del bloqueo que ejerce en la conversión del MPTP a MPP⁺. Este efecto podría ser producido, al menos, por el aumento de la capacidad protectora frente las oxidaciones producido por la inducción de la SOD y Catalasa, así como por la posible saturación del sistema de "uptake" de DA por el metabolito del deprenilo, anfetamina.

5.3 Efecto del tratamiento con acetil-L-carnitina, compuesto implicado en el metabolismo energético, sobre la acción tóxica del MPP⁺.

Hemos estudiado la acción de diferentes tratamientos con ALC sobre la acción tóxica del MPP⁺. En los estudios "in vitro" ninguno de los tratamientos ensayados produjo ningún efecto, ni positivo, ni negativo, sobre la acción tóxica del MPP⁺. Sin embargo, teniendo en cuenta que la ALC está implicada en el metabolismo energético aumentando la respiración, creímos que debería tener un efecto protector sobre el

MPP⁺, ya que éste es un inhibidor del complejo I de la cadena respiratoria, por lo que estudiamos el posible efecto protector de la ALC "in vivo" frente a una inyección intraventricular (i.v.) directa de MPP⁺.

Los resultados de este trabajo aportan evidencias concluyentes de que la ALC protege contra la mortalidad producida por la inyección i.v. de MPP⁺. La mortalidad fue del 50% en ratas tratadas mediante inyección i. v. de 62,5 µg de MPP⁺, estando totalmente ausente en ratas tratadas con ALC (100mg/Kg), durante los tres días previos a la inyección de MPP⁺.

La eliminación del efecto letal del MPP⁺ podría deberse a una acción protectora sobre el sistema dopaminérgico, ya que el MPP⁺ es un tóxico específico de este tipo de neuronas. La administración i.v. de MPP⁺ en ratas produjo una disminución en la concentración de DA en las distintas regiones cerebrales estudiadas: un 83 % en el estriado, un 95 % en la hipófisis y un 70 % en la eminencia media. Esta disminución está de acuerdo con el mecanismo tóxico del MPP⁺, que es transportado intraneuronalmente por el sistema de captación de DA de alta afinidad (Javitch y col. 1985) y acumulado en la mitocondria (Ramsay y col., 1986) inhibiendo la respiración mitocondrial (Nicklas y col., 1985). Así, el MPP⁺ podría ser tóxico en todas las estructuras que tienen sistema de captación de DA. Nosotros no encontramos efecto tóxico del MPP⁺ en sustancia negra ni en el bulbo olfatorio, donde, por el contrario, se ha descrito una disminución en la concentración de DA producida por inyección i. p. de MPTP (Dluzen, 1992).

Entre las estructuras estudiadas, el estriado fue el más afectado por la toxicidad del MPP⁺, ya que no solamente se afectó el sistema dopaminérgico sino también el sistema serotoninérgico. Sin embargo, en hipófisis y eminencia media la disminución de DA fue alta, semejante a la encontrada en estriado, pero no hubo cambios o fueron mínimos en sus metabolitos y en el sistema serotoninérgico.

La toxicidad del MPP⁺ en el sistema serotoninérgico también ha sido descrita en experimentos con MPTP en estriado (Mihatsch, y col., 1991). Nuestros resultados parecen indicar que la toxicidad del sistema serotoninérgico es independiente del sistema dopaminérgico. Así, cuando la DA de algunas de las estructuras fue muy afectada, la serotonina

mostró cambios en distintos grados. Por lo tanto, el daño en el sistema serotoninérgico por el MPP⁺ podría ser debido a las características particulares de cada estructura.

El efecto protector de la ALC frente a la mortalidad producida por el MPP⁺ no estuvo acompañado por un efecto protector paralelo en el sistema dopaminérgico. Resultados similares han sido descritos por Harik y Hrit (1993) en ratones para el MPTP. Al contrario, el MPP⁺ parece tener un efecto tóxico mayor en el sistema dopaminérgico de ratas tratadas con ALC. Se observa una alta variabilidad si tenemos en cuenta los valores individuales. Además el 50% de los animales tratados con ALC mostraron valores de DA menores que el menor valor encontrado en los animales no tratados (Fig. 1). Esto sugiere que este 50% de los animales tratados con ALC, con concentraciones de DA menores que las de los animales controles, podrían corresponder al 50% de mortalidad encontrada en los animales no tratados con ALC. Esto parece indicar que el tratamiento con ALC mantiene, de alguna manera, la supervivencia de las ratas con muy bajos niveles de DA, lo cual no sería posible en circunstancias normales.

En estriado, la estructura más afectada por el MPP⁺, hemos estudiado otros parámetros, como la cantidad de la enzima Tirosina hidroxilasa (TH), neurofilamentos y glía, para profundizar en el posible mecanismo por el cual la ALC protege frente a la toxicidad del MPP⁺. Sin embargo, estos resultados no mostraron diferencias con los obtenidos en el estudio de la DA. Nuestros resultados muestran que después del tratamiento con el MPP⁺ se produjo una reducción similar en la cantidad de la enzima TH en ambos experimentos (40%). Esto parece indicar que parte de esta enzima podría estar inactivada, ya que las diferencias encontradas en la concentración de DA fueron significativamente mayores. No se encontró una disminución significativa en los neurofilamentos. Estos resultados podrían estar de acuerdo con que la proteína de neurofilamentos no es una proteína específicamente dopaminérgica, por lo que los efectos sobre ella pueden ser menores. La GFAP mostró un ligero aumento lo que está de acuerdo con lo que se conoce del aumento, de glía cuando se produce un daño neuronal, aunque no hubo diferencias con o sin el tratamiento de ALC.

La interpretación de este estudio es complicada. Sin embargo, datos previos encontrados en la literatura sugieren que la ALC podría proteger de varias maneras, por lo que se podrían dar explicaciones alternativas que justifiquen la acción de protección sobre la supervivencia.

1. La importancia de la relación DA/Acetilcolina (ACh) en el estriado. La relación entre los sistemas colinérgico y dopaminérgico en el estriado está bien caracterizada. Esta es mediada por los receptores muscarínicos y nicotínicos localizados en las terminales dopaminérgicas (Kito y col., 1986; Carter y col., 1988; Xu y col., 1989; Damsma y col., 1988). La ALC muestra un parecido estructural con la acetilcolina. Se ha descrito que la ALC puede tener funciones de agonista colinérgico (Onorfrj y col., 1983). Sin embargo, su efecto muscarínico es débil (Blum y col., 1971). La ALC facilita la respuesta neuronal de ACh en el tronco cerebral (Tempesta y col., 1985), y puede servir como precursor en la síntesis de ACh en neuronas colinérgicas (Dolezal y Tucek, 1981; Bresolin y col., 1982; White y Scates, 1990). Después de su administración i. c. v. se produce un aumento en la actividad acetil colin transferasa en cerebro de rata (Simone y col., 1991). También aumenta la liberación de ACh de estriado e hipocampo de rata (Imperato y col., 1989, 1991). Por otro lado, la administración de ALC disminuye la bajada de los receptores D1 de DA en estriado de ratas y ratones viejos (Sershen y col., 1991). Concentraciones relativamente altas de ALC producen un aumento de la liberación de DA en estriado (Harsing y col., 1992). Este hecho permite cuestionarse si los acontecimientos mediados por receptor están relacionados con el modo de acción de esta droga.

Debido a todas estas razones, sugerimos la posibilidad de que el aumento del tono colinérgico provocado por la ALC puede afectar indirectamente la neurotransmisión dopaminérgica en esta área cerebral con un consiguiente efecto protector.

2. Síntesis del factor de crecimiento nervioso. El tratamiento con ALC estimula la síntesis de receptores del factor de crecimiento nervioso y aumenta el crecimiento de las células de feocromocitoma (Angelucci y col., 1988; Pérez-Polo y col., 1988). La ALC también aumenta la unión del factor de crecimiento nervioso en el SNC de ratas viejas (Angelucci y col., 1988). El factor de crecimiento nervioso (NGF) tiene un efecto trófico en neuronas colinérgicas del cerebro basal anterior (septum medial y banda diagonal de broca) (Hefti y col., 1988). En este caso, el

efecto trófico del factor de crecimiento nervioso podría estar relacionado con el aumento de la supervivencia producido en las ratas por el tratamiento con la ALC.

3. Metabolismo energético. Un punto a ser considerado es el posible efecto de la ALC en el metabolismo energético. Así, si tenemos en cuenta que el efecto tóxico del MPP⁺ es principalmente una alteración del metabolismo energético, la acción protectora de la ALC podría ser debida a la capacidad de la ALC de estimular el metabolismo energético. La ALC produce cambios en la utilización de la glucosa (Thomitzek, 1963), alteración en el turnover de fosfolípidos de membranas neuronales (Rizza y col., 1986), y facilita el transporte de ácidos grasos y grupos acetilo a través de membranas mitocondriales (Fritz y col., 1963; Bremer, 1983; White y Scates, 1990). Durante la recuperación posthipoglucémica seguida de hipoglucemia severa con EEG isoelectrico (Benzi y col., 1983; 1984), la ALC aumenta la reducción de fosfolípidos y ácidos grasos, concomitantemente con la reducción del flujo glucolítico debido a la actividad carnitina acetiltransferasa de la mitocondria y el funcionamiento del sistema translocacional (Pande y Parvin, 1976). Podría ser importante tener en cuenta que hay un gran número de evidencias de la interrelación entre la condición fisiológica y transcripción del ADN mitocondrial (Gadaleta y col., 1991). Además, se ha descrito un efecto protector similar producido por la carnitina y sus derivados, ALC, O'Connor y col., (1984) han descrito que el tratamiento previo con ALC reduce la mortalidad en ratones tratados con dosis letales de acetato de amonio. También se han descritos otros efectos similares (Kloiber y col., 1988; O'Connor y col., 1988; Hearn y col., 1989). La ALC parece ser más eficiente en esta acción protectora (Matsuoka y col., 1993). En este caso, la ALC preserva más la concentración del ATP en el cerebro, mientras que disminuye menos marcadamente la concentración del amonio en sangre y cerebro.

A pesar de la inseguridad con respecto a la causa del efecto protector de la ALC, estos resultados sugieren que la acción protectora de la ALC podría estar más relacionada con el metabolismo energético que con alguna otra clase de efectos ya descritos, aunque no pueden ser excluidos otros mecanismos.

6. CONCLUSIONES

1. Mediante alimentación con dietas deficientes en vitamina E o selenio hemos obtenido ratas con una menor capacidad de protección celular frente a las oxidaciones. La disminución de la capacidad protectora en las ratas deficientes en vitamina E es producida por la disminución de su concentración, en tanto que en las deficientes en Se es producida por la pérdida del 38% de la actividad glutatión peroxidasa. Las demás enzimas estudiadas implicadas en la protección frente a las oxidaciones no sufren variación.

2. La sustancia negra de las ratas deficientes en vitamina E presenta un aumento significativo de la concentración de glutamato. Este aumento debe estar relacionado con la disminución de la capacidad protectora frente a las oxidaciones. Este resultado sugiere un mecanismo de conexión entre el daño oxidativo producido por radicales libres de oxígeno y la toxicidad producida por el glutamato, aminoácido excitotóxico. Estos dos factores han sido implicados en los procesos de neurodegeneración dopaminérgica de la sustancia negra en la enfermedad de Parkinson.

3. La disminución de la capacidad protectora frente a las oxidaciones que se produce con la deficiencia en vitamina E o Se produce un aumento de la vulnerabilidad del estriado a la acción tóxica del MPP⁺, metabolito activo del MPTP.

4. La deficiencia en Se produce un mayor efecto sobre el aumento de la toxicidad del MPP⁺ en estriado que la deficiencia en vitamina E. Esto podría deberse a la importancia del sistema glutatión-glutatión peroxidasa en la protección frente a las oxidaciones.

5. El tratamiento previo con deprenilo disminuye la acción tóxica del MPP⁺ en el estriado de las ratas. Esta acción es independiente de su acción como inhibidor de la enzima monoamino oxidasa, y puede ser debida al aumento de la capacidad protectora celular frente a las oxidaciones, ya que el deprenilo induce las enzimas SOD y catalasa y sus

metabolitos pueden ejercer una acción inhibitoria sobre el transporte de DA.

6. El tratamiento con ALC bloquea completamente el efecto letal de la inyección intraventricular de MPP⁺. Las ratas no tratadas muestran un 50% de supervivencia, mientras que en las tratadas la supervivencia fue del 100%. Esta acción protectora no es paralela a una protección del sistema dopaminérgico.

7. BIBLIOGRAFIA

- Adams, J.D. Jr. and Odunze I.N. Biochemical mechanism of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity. Could oxidative stress be involved in the brain? *Biochem. Pharmacol.* **41**: 1099-1105, 1991.
- Adams, J.D., Kalivas, P.W. and Miller, C.V. The acute histopathology of MPTP in the Mouse CNS. *Brain Res. Bull* **23**: 1-17, 1989.
- Adams, J.D., Klaidman, L.K. and Odunze, I.N. Oxidative effects of MPTP in the midbrain. *Res. Commun. Subst. Abuse* **10**: 169-180, 1989.
- Agnoll, A., Baldessare, M., Ruggieri, S., Falaschi, P., Urso, R.D. and Rocco, A. Prolactin response as an index of dopaminergic receptor function in Parkinson's disease. Correlation with clinical findings and therapeutic response. *J. Neural. Transm.* **51**: 123-134, 1981.
- Altar, C.A., Marien, M.R. and Marshall, J.F., Time course of adaptations in dopamine synthesis, metabolism and release following nigro-striatal lesions: implications for behavioural recovery from brain injury. *J. Neurochem.*, **48**: 390-399, 1987.
- Ambani, L.A., Van Woert, M.H. and Murphy, S. Brain peroxidase and catalase in Parkinson's disease. *Arch. Neurol.* **32**: 114-116, 1975.
- Angelucci, L., Ramacci, M.T., Tagliatela, G., Hulsebosch, C., Morgan, B. Werrbach-Perez, K. and Perez-Polo, R. Nerve growth factor binding in age rat central nervous system: effect of acetyl-L-carnitine. *J. Neurosci. Res.* **20**: 491-496, 1988.
- Argentiero, V. and Tavalato, B. Dopamine (DA) and serotonin metabolic levels in the cerebrospinal fluid (CSF) in Alzheimer's presenile dementia under basic conditions and after stimulation with cerebral cortex phospholipids (BC-PL). *J. Neurol.* **224**: 53-58, 1980.
- Ariens, E.J. Stereochemistry: A source of problems in medicinal chemistry. *Med. Res. Rev.* **6**: 451-466, 1986.

- Baker, J.K., Borne, R.F., Davis, W.M. and Waters, I.W. Metabolism of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mouse liver preparations *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **125**: 484-490, 1984.
- Barbeau, A. Lecture at 8th International Symposium on Parkinson's Disease. New York, June 1985.
- Bast, A. and Goris, R.J.A. Oxidative stress. Biochemistry and human disease, *Parasit. Weekbl. Sci. Edn.* **11**: 199, 1989.
- Bathory, G., Szüts, T. and Magyar, K. Studies on the melanin affinity of selegiline (deprenyl) and other amphetamine derivatives. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.* **39**: 195-201, 1987.
- Beers, R.F. and Sizer, I.W., A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* **195**: 133-140, 1952.
- Bendich A., Diapolito P., Gabriel E. and Machlin L.J. Interaction of vitamin C and vitamin E in guinea pigs immune response to mitogens. *J. Nutr.* **114**: 1588-1593, 1984.
- Bendich, A., Machlin L.J., Scandurra, O., Burton, G. and Wayner, D.N. The antioxidant role of vitamin C. *Adv. Free. Radic. Biol. Med.* **2**: 419-444, 1986.
- Benzi, G., Gorini, A., Dossena, M., Vercini, Taglietti, M., Fulle, D. and Pastori, O. Recovery after hypoglycemic brain injury. Action of some biological substances on the cerebral metabolism. *Biochem. Pharmacol.* **32**: 1083-1091, 1983.
- Benzi, G., Villa, R.F., Dossena, M., Vercini, L., Gorini, A. and Pastori, O. Cerebral endogenous substrate utilization during the recovery period after profound hypoglycemia. *J. Neurosc. Res.* **11**: 437-450, 1984.
- Birkmayer, W., Knoll, J., Riederer, P., Youdin, M.B.H., Hars, V. and Marton, J. Increase life expectancy resulting from addition of L-deprenyl to Madopar R treatment in Parkinson's disease: a long term study. *J. Neural. Transm.* **64**: 113-127, 1985.

- Birkmayer, W., Riederer, P., Linauer, W. and Knoll, J. L-Deprenyl plus L-phenylalanine in treatment of depression. *J. Neural. Transm.* **59**: 81-87, 1984.
- Birkmayer, W., Riederer, P., Youdim, m.B.H. and Linauer, W., The potentiation of the anti-kinetic effect of l-dopa treatment by an inhibitor of MAO-B, L-deprenyl. *J. Neural. Transm.* **36**: 303-336, 1975.
- Blomstrand, R. and Forsgren, L. Labeled tocopherols in man. *Int. J. Vitamin Res.* **38**: 328-344, 1968.
- Blum, K., Seifter, E. and Seifer, J. The pharmacology of and L-carnitine and D and L-acetylcarnitine: comparison with choline and acetylcholine. *J. Pharmacol. Exp. Ther* **178**: 331- , 1971.
- Boden, R., Botting, R. Coulson, P. and Spanswick, G. Effect of nonselective and selective inhibitors of monoamine oxidases A and B on pethidine toxicity in mice. *Br. J. Pharmacol.* **82**: 151-154, 1984.
- Bonavita, E. Study of the efficacy and tolerability of L-acetyl-carnitine in the senile brain. *Int. J. Clin. Pharm. Ther Toxicol.* **24**: 511-516, 1986.
- Boulton, A.A., Vuorio, A.V. and Paterson I.A. Phenylethylamine in the CNS: effects of monoamine oxidase inhibiting drugs, deuterium substitution and lesions and its role in the neuromodulation of catecholaminergic neurotransmission. *J. Neural. Transm.* (suppl.**29**): 119-129, 1990.
- Brastrop, C., Andersen, H. and Brandrup, A. The monoamine oxidase B inhibitor deprenyl potentiates phenylethylamine behaviour in rats without inhibition of catecholamine metabolite formation. *Eur. J. Pharmacol.* **34**: 181-187, 1975.
- Bremer, J. Carnitine in intermediary metabolism: reversible acetylation of carnitine by mitochondria. *J. Biol. Chem.* **237**: 3628-3632, 1962.

- Bremer, J. Carnitine-metabolism and functions. *Physiol. Rev.* **63**: 1420-1480, 1983.
- Bresolin, N., Fredo, L., Vergani, L. and Angeline, C. Carnitine, carnitine acetyltransferase, and rat brain function. *Exp. Neurol.* **78**: 285- , 1982.
- Brooksbank, B.W.L. and Balazs, R. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase and lipoperoxidation in Down's syndrome fetal brain. *Dev. Brain. Res.* **16**: 37-44, 1984.
- Bunney, B. and Aghajanian, G.K. The precise localization of nigral afferents in the rat as determined by a retrograde tracing technique. *Brain Res.* **117**: 423-435, 1976.
- Burck, U., Goebel, H.H., Kuhlendahl, H.D., Meier, C. and Goebel, K.M. Neuro-myopathy and vitamin E deficiency in man. *Neuropediatrics.* **12**: 267-278, 1981.
- Burns, R.S., Chiueh, C.C., Markey, S.P., Ebert, M.H., Jacobwitz, D.M. and Kopin, I.J. A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by MPTP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 4545-4550, 1983.
- Butler, J.A., Whanger, P.D. and Tripp, M.J. Blood selenium and glutathione peroxidase activity in pregnant women: comparative assays in primates and other animals. *Am. J. Clin. Nutr.* **36**: 15-23, 1982.
- Calne, D.B., McGeer, E. G., Eisen, A. and Spencer, P. Parkinson's disease, and motoneurone disease: abiotropic interaction between ageing and environment? *Lancet* **2**: 1067-1070, 1986.
- Calvani, M., Iannuccelli, M., Colasimone, D., Orfalian, Z. Chronicle of the Development of an Endogenous Substance for Dementia: Acetyl-L-carnitine. In Bès A. Cahn J. Cahn R, Hoyer S, Marc-Vergnes JP. Wisniewski HM (eds): "Senile Dementias: Early Detection. Current Problems in Senile Dementias Vol. 1." London, Paris: John Libbey Eurotex. pp 394-400, 1986.

- Carrillo, M.C., Kanai, S., Nokubo, M and Kitani, K., Deprenyl induces activities of both superoxide dismutase and catalase but not of glutathione peroxidase in the striatum of young male rats. *Life. Sci* **48**: 517-521, 1991.
- Carter, C.J., L'Heureux, R. and Scatton, B. Differential control by N-methyl-D-aspartate and kainate of striatal dopamine release in vivo: a trans-striatal dialysis. *J. Neurochem.* **51**: 462- , 1988.
- Castaño, A., Herrera, A. J., Cano, J. and Machado A. Effects of a short period of vitamin E deficient diet in the turnover of different neurotransmitters in the substantia nigra and striatum of the rat. *Neuroscience* 1993.
- Castignani, G.L. Role in nucleic acid and protein metabolism. In: Vitamin E-a comprehensive treatise. L.J. Machlin (Ed.), New York: Marcel-Dekker, pp. 318-332, 1980.
- Chavez, E., Briones R., Michel, B., Bravo, C. and Jay, D. Evidence for the involvement of dithiol groups in mitochondrial calcium transport: studies with cadmium. *Arch. Biochem. Biophys.* **242**: 493-497, 1985.
- Cheramy, A., Leviel V. and Glowinski, J. Dendritic release of dopamine in the substantia nigra. *Nature.* **289**: 537-542, 1981.
- Chiba, K., Peterson, L.A., Castagnoli, K.P., Trevor, A.J. and Castagnoli, N. Studies on the molecular mechanism of bioactivation of the selective nigrostriatal toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Drug Metb. Disps.* **13**: 342-347, 1985.
- Chrisp, P., Mammen, G.J. and Sorkin, E.M. Selegiline. A review of its pharmacology, symptomatic benefits and protective potential in Parkinson's disease. *Drug & Agein .* **1**: 228-248, 1991.
- Clark, J.B. and Nicklas, W.J. The metabolism of rat brain mitochondria. *J. Biol. Chem.* **245**: 4727-4731, 1970.
- Clausen, J. Uptake and distribution in rat brain of organic and inorganic selenium. *Biol. Trace Elem. Res.* **28** (1): 39-45, 1991.

- Cohen, G. Oxidative stress in the nervous system, In: *Oxidative stress*. (Ed. Sies H), 383-402. Academic Press, New York, 1985.
- Cohen, G., Oxygen radicals and Parkinson's disease: In Upjohn Symposium/Oxygen Radicals. 1987.
- Cohen, G., Pasik, P., Cohen, B. Leist, A., Mytilineuo, C. and Yahr, M.D. Pargyline and deprenyl prevent the neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6.-tetrahydropyridine (MPTP) in monkeys. *Eur. J. Pharmacol.* **106**: 209-210, 1985.
- Corsini, G.U., Pintus, S., Chiueh C.C., Weiss J.F. and Kopin I.J. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity in mice is enhanced by pretreatment with dietylditiocarbamate. *Eur. J. Pharmacol.* **119**: 127-128, 1985.
- Corsini, G.U., Zuddas, A., Bonuccelli, U., Scinelli, S. and Kopin, I.J. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity in mice is enhanced by ethanol or acetaldehyde. *Life Sci.* **40**: 827-832, 1987.
- Cotzias, G.C., Van, Weert M.H. and Schiffer, L.M. Aromatic amino acids and modification of parkinsonism. *N. Engl. J. Med.* **276**: 374-379, 1967.
- Coyle, J. Excitotoxins. In: Meltzer, H. Y., ed. *Psychopharmacology: the third generation of progress*. New York: Raven Press. 1987: 333-340.
- Dahlström, A. and Fuxe, K. Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol. Scand. Supp.* **232** (62): 1-55, 1964.
- Damsma, G., Westering, B.H.C., DE Vries, J.B. and Horn, A.S. The effect of systematically applied cholinergic drugs on the striatal release of dopamine and its metabolites, as determined by automated brain dialysis in conscious rats. *Neurosc. Lett.* **89**: 349- , 1988.

- Danielczyk, W., Streifler, M., Konradi, C., Riederer, P. and Moll, G. Platelet MAO B activity and the psychopathology of Parkinson's disease, senile dementia and multi-infarct dementia. *Acta. Psychiatr.* **78**: 730-736, 1988.
- Davies, J. and Tongroach, P. Neuropharmacological studies on the nigro-striatal and raphe-striatal system in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* **51**: 91-100, 1978.
- Davis, G. C., Williams, A. C., Markey, S. P., Ebert, M. H., Caine, E. D., Reichert, C. M. and Kopin, I. J. Chronic parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiat. Res.* **1**: 649-654, 1979.
- Deagen, J.T., Beilstein, M.A. and Whanger, P.D. Chemical forms of selenium in selenium containing proteins from human plasma. *J. Inorg. Biochem.* **41**: 261-268, 1991.
- Desarro, G., Meldrum, B.S. and Reavill, C. Anticovulsivant action of 2-amino-7-phosphonoheptanoic acid in substantia nigra. *Eur. J. Pharmacol.* **106**: 175-179, 1985.
- Dexter, D. T., Carayon, A., Javoy-Agid, F., Agid, Y., Wells, F.R., Daniel, S.E., Lees, A.J., Jenner, P. and Marsden, C.D. Alterations in the levels of iron and ferritin and other trace metal in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia. *Brain* **114**: 1953-1975, 1991a.
- Dexter, D. T., Ward, R.J., Wells, F.R., Daniel, S.E., Lees, A.J., Peters, T.J., Jenner, P. and Marsden, C.D. α -Tocopherol levels in the brain are not altered in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 1991c
- Dexter, D.T., Carter C.J., Wells F.R., Javoy-Agid Y., Lees A., Jenner P. and Marsden C.D. Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* **52**: 381-389, 1989a.
- Dexter, D.T., Wells, F.R. Lees, A.J., Agid, F., Y., Jenner, P. and Marsden, C. D. Increased nigral iron content and alterations in other metal ions occurring in brain in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* **52**: 1830-1836, 1989b.

- Dexter, D.T., Wels, F.R., Agid, F., Agid, Y., Lees, A. J., Jenner, P. and Marsden, C.D. Increased nigral iron content in post-mortem parkinsonian brain. *Lancet* **ii**, 249-220, 1987.
- Di Monte, D., Jewell, S.A., Ekstrom, G., Sandy, M.S. and Smith, M.T. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and 1-methyl-4-phenyl-pyridine (MPP+) cause rapid ATP depletion in isolated hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **137**: 310-315, 1986.
- DiBussolo, J.M., Gant, J.R. and Kerber, J.D. Instrumental considerations in catecholamine analysis using liquid chromatography with electrochemical detection. *Chromatog. Newslett.* **11**: 27-29, 1983.
- Dluzen, D.E. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) reduces norepinephrine concentrations in the olfactory bulbs of male mice. *Brain Res.* **586**: 144-147, 1992.
- Doba, T., Burton, G. W. and Ingold, K.U., Antioxidant and co-antioxidant activity of vitamin C. The effect of vitamin C, either alone or in the presence of vitamin E or a water-soluble vitamin E analogue, upon the peroxidation of aqueous multilamellar phospholipid liposomes. *Biochem. Biophys Acta*, **835**: 298-303. 1985.
- Docherty, M., Bradford, H. F. and Wu, S. Y., Co-release of glutamate and aspartate from cholinergic and GABAergic synaptosomes. *Nature*, **330**: 64-66, 1987.
- Dolezal, V. and Tucek, S. Utilization of citrate, acetylcarnitine, acetate pyruvate and glucosa for the syntesis of acetylcholine in rat brain slices. *J. Neurochem.* **36**: 1323-1330, 1981.
- Dray, A., Davies, J., Oakley, N.R., Tongroach, P. and Vellucci, S. The dorsal and medial raphe projections to the substantia nigra in the rat. Electrophysiological, biochemical and behavioural observations. *Brain Res.* **151**: 431-442, 1978.
- Dray, A., Gonye, T.J. and Oakley, N.R. Effects of a-flupenthixol on dopamine and 5-hydroxytryptamine responses of substantia nigra neurons. *Neuropharmacology.* **15**: 793-796, 1976.

- Duvoisin, R. Genetics of Parkinson's disease. *Adv. Neurol.* **27**: 307-312, 1986.
- Ekstedt, B., Magyar, K. and Knoll, J. Does the B form selective monoamine oxidase inhibitor lose selectivity by long term treatment. *Biochem. Pharmac.* **28**: 919-923, 1979.
- Elroy-Stein, O., Bernstein, Y. and Groner, Y. Overproduction of human Cu/Zn-superoxide dismutase in transfected cells: extenuation of paraquat-mediated cytotoxicity and enhancement of lipid peroxidation. *EMBO J.* **5**: 615-622, 1986.
- Elsworth, J.D. Sandler, M., Lees, A.J., Ward, C., Stern, G.M. The contribution of amphetamine metabolites of (-)-deprenyl to its natiparkinsonian properties. *J. Neural Transm.* **54**: 105-110, 1982.
- Elsworth, J.D., Glober, V., Reynolds, G.P. et al. Deprenyl administration in man: a selective monoamine oxidase B inhibition without the "cheese effect". *Psychopharmacology.* **57**: 33-38, 1978.
- Fahn, S. Regional distribution studies of GABA and other putative neurotransmitters and their enzymes. 169-186, in E. Roberts, T. N. Chase and D. B. Tower (eds), Raven Press, New York. 1976
- Falcheto, S., Kato, G., Provine, L. The action of carnitines on cortical neurona. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **49**: 1-7, 1971.
- Fariello, R.G., Ferraro, T.N., Golden, G.T., DeMattei, M. Systemic acetyl-L-carnitine elevates nigral levels of glutathione and GABA. *Life Sci.* **43**: 289-292, 1988.
- Fearnley, J.M. and Lees, A.J. Agin and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain* **114**: 2283-2302, 1991.
- Ferraro, T.N., Golden, G.T., DeMattei, M., Hare, T.A. and Fariello, R.G. Effect of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on levels of glutathione in the extrapyramidal system of the mouse. *Neuropharmacology.* **25**: 1071-1074, 1986.

- Fonnum, F. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J. Neurochem*, **42**: 1-11, 1984.
- Fonnum, F., Gottesfeld, Z. and Grofova, I. Distribution of glutamate decarboxylase, choline acetyl-transferase and aromatic amino acid decarboxylase in the basal ganglia of normal and operated rats. Evidence for striatonigral GABAergic fibres. *Brain Res.***143**: 125-138, 1978.
- Forstrom, J.W., Zakowki, J. and Tappel, A.L. Identification of the catalytic site of rat liver glutathione peroxidase as selenocysteine. *Biochemistry*. **17**: 2639-2644, 1978.
- Fowler, C.J., Wiberg, A., Orelan,L., Marcuson, J. and Winblad, B. The effect of age on the activity and Molecular Properties of Human Brain Monoamine Oxidase. *J. Neural. Transm.* **49**: 1-20, 1980.
- Frank, D.M., Arora, P.k., Bloomer, J.L. and Sayre, L.M., Model study on the bioreduction of paraquat, MPP+, and analogues. Evidence against a redox cycling mechanism in MPTP neurotoxicity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **147** :1095-1104, 1987.
- Fritz, I.B. Carnitine and its role in fatty acid metabolism. *Adv. Lipid Res.* **I**: 285-334, 1963.
- Fritz, I.B., Schultz, S. and Srere, P.A. Properties of partially purified carnitine acetyltransferase. *J. Biol. Chem.* **228**: 2509-2517, 1963.
- Fuxe, K., Grobecker, H. and Jonsson, J. Effect of beta-phenylethylamine on central and peripheral monoamine-containing neurons. *Eur. J. Pharmacol.* **2**: 203-207. 1967.
- Gadaleta, M.N., Petruzzella. V., Renis, M., Fracasso, F. and Cantatore, P. Reduced transcription of mitochondrial DNA in the senescent rat. Tissue dependent and effect of acettil-L-carnitine.*Eur. J. Biochem.* **187**: 501-506, 1990.
- Geffen, L.B., Jessell, T.M., Cuello, A.C. and Iversen, L.L. Release of dopamine from dendrites in rat substantia nigra. *Nature*. **260**: 258-260, 1976.

- Gibb, W.R.G. and Lees, A.J. The neuroleptic malignant syndrome-a review. *Q. J. Med.* **220**: 421-429, 1985.
- Glover, V. and Sandler, M. Clinical Chemistry of Monoamine Oxidase. *Cell Biochem. Funct.* **4**: 89-97, 1986.
- Glover, V., Eisworth, J.D. and Sander, M. Dopamine oxidation and its inhibition by (-) Deprenyl in man. *J. Neural Transm.* **16**: 163-172, 1980.
- Glowinski, J., Cheramy, A. and Giourguieff-Chesselet, M.F. Presynaptic control of dopamine release from terminals and dendrites of nigrostriatal dopaminergic neurons. In: Psychopharmacology and Biochemistry of Neurotransmitter Receptors. H.I. Yamamura, R.W. Olsen and E. Usdin (Eds.). *Developments in Neuroscience.* **II**: 483-498, 1981.
- Golbe, L.I. Deprenyl as symptomatic therapy in Parkinson's disease. *Clinical Neuropharmacology.* **11**: 387-400, 1988.
- Golbe, L.I., Di Iorio, G., Bonavita, V., Miller, D.C. and Duvosin, R.C. A large kindred with autosomal dominant Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* **27**: 276-282, 1990.
- Graham, D.G. Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones. *Mol. Pharmacol.* **14**: 633-643, 1978.
- Graybiel, A.M. Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. A review. *TINS.* **13**(7): 244-254, 1990.
- Gromadzinska, J., Sklodowska, M. and Wasowiaz, W. Glutathione peroxidase activity, lipid peroxides and selenium concentration in various rat organs. *Biomed. Biochim. Acta.* **47** (1): 19-24, 1988.
- Groves, P.M., Wilson, C.J., Young, S.J. and Rebec, G.V. Self-inhibition by dopaminergic neurons. *Science.* **190**: 522-529, 1975.
- Guggenheim, M.A., Ringel, S.P., Silverman, A. and Grabert, B.E. Progressive neuromuscular disease in children with chronic cholestasis and vitamin E deficiency: diagnosis and treatment with alpha-

- tocopherol. *J. Pediatr.* **100**: 51-58, 1982.
- Gyarmati, S., Timar, J. Knoll, B. and Knoll, J. Serotonin-mediated behavior in rats chronically treated with (-) deprenyl. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.* **40**: 667-671, 1988.
- Haber, S.N. and Elde, R.P. The distribution of enkephalin immunoreactive fibers and terminals in the monkey central nervous system: an immunohistochemical study. *Neuroscience.* **7**: 1049-1095, 1982.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C., Free radicals in the biology and medicine. Oxford: Clarendon Press. 1985.
- Harding, A. E., Vitamin E and the nervous system. *Crit. Rev. Neurol.* **3**: 89-103, 1987.
- Harding, A.E., Muller, D.P.R., Thomas, P.K. and Willison, H.J. Spinocerebellar degeneration secondary to chronic intestinal malabsorption: a vitamin E deficiency syndrome. *Ann. Neurol.* **12**: 419-424, 1982.
- Harik, S.I., Hritz, M. A. Effect of acetyl-L-carnitine on 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6- tetrahydropyridine (MPTP) neurotoxicity. *Biochemical Pharmacol* **45**: 2170-2172, 1993.
- Harsing, L.G., Sershen, H., Toth, E., Hashim, A., ramacci, M.T. and Lajha, A. Acetyl-L-carnitine releases dopamine in rats corpus striatum: an in vivo microdialysis study. *E. J. Pharmacol.* **218**: 117-121, 1992.
- Hayes, K.C., Nelson S.W. and Rousseau J.E. Vitamin E deficiency and fat stress in the dog. *J. Nutr.* **99**: 196-209, 1969.
- Hearn, T. J., Coleman, A.E., Lai, J.C.K., Griffith, O.W., Cooper, A.J.L. Effect of orally administered L-carnitine on blood ammonia and L-carnitine concentration in porta caval-shunted rats. *Hepatology* **10**: 822-828, 1989.
- Heffron, J.J., Chan, A.C., Gronert, G.A. and Hegarty, P.V. Decreased phosphorylative capacity and respiratory rate of rabbit skeletal muscle

- mitochondria in vitamin E dystrophy. *Int. J. Biochem.* **9**: 539-543, 1978.
- Hefti, F., Hartikka, J.A., Montero, C.N., Junard, E.O. In: Ferrendelli, J.A., Collins, R.C., Johnson, E.M. (eds) *Neurobiology of Amino Acids, Peptides and Trophic Factors*. Kluwer, Utrecht, pp 128-138, 1988.
- Heikkilä R.E., Nicklas, W.J., Vays, I. and Duvoisin, R.C. Dopaminergic toxicity of rotenone and the MPTP ion after their stereotaxic administration to rats: implication for the mechanism of MPTP toxicity. *Neurosci. Lett.* **62**: 389-394, 1985.
- Heikkilä, R.E., Manzino, L., Cabbat, F.S. and Duvoisin, R.C. Protection against the dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydro-pyridine by monoamine oxidase inhibitors. *Nature* **311**: 467-469, 1984.
- Hoekstra, W.G. Glutathioneperoxidase activity of animal tissues as an index of selenium status. In: *Trace Substances and Environmental Health IX*. D.D. Hemphill (Ed.), University of Missouri Press, Columbia, 1975.
- Hornsby, P.J. The role of vitamin E in cellular energy metabolism in cultured adrenocortical cells. *J. Cell. Physiol.* **112**: 207-216, 1982.
- Humfrey, C.D.N., Steventon, G.B., Sturman, S.G., Waring, R.H., Griffiths, B. and Williams, A.C. Monoamine oxidase substrates in Parkinson's disease. *Biochem. Pharmacol.* **40**: 2562-2564, 1990.
- Imperato, A., Ramacci, M.T., Angelucci, L. Acetyl-L-carnitine enhances acetylcholine release in the striatum and hippocampus of awake freely moving rats. *Neurosci. Lett.* **107**: 251-255, 1989.
- Imperato, A., Scrocco, M.G., Giardi, O., Ramacci, M.T. and Angelucci, L. In vivo probing of the brain cholinergic system in aged rat. Effects of long-term treatment with acetyl-L-carnitine. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **621**: 90- 1991.
- Janghorbani, M., Christensen, M.J., Nahapetian, A. and Young, V.R. Selenium metabolism in healthy adults: quantitative aspects using the

- stable isotope $^{75}\text{SeO}_3^{2-}$. *Am. J. Clin. Nutr.* **35**: 373-379, 1982.
- Janiri, L., Tempesta, E. A pharmacological profile of the effects of carnitine and acetyl carnitine on the cerebral nervous system. *In. J. Clin. Pharmacol. Res.* **3**: 259-306, 1983.
- Javitch, J.A., D'Amato, R.J., S.M. and Snyder, S.H. Parkinsonism-inducing MPTP: uptake of the metabolite MPP⁺ by dopamine neurones explains selective toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 2173-2177, 1985.
- Jenkinson S.G., Jordan J.M., and Duncan C.A. (1989) Effects of selenium on glutathione-induced protection from hyperbaric hyperoxia in rat. *J. Physiol* ,**257**, L393-L398.
- Jenner, P., Dexter, D.T., Sian, J., Shapira, A.H.V., and Marsden, C.D. Oxidative stress as a cause of nigral cell death in Parkinson's disease and incidental Lewi body disease. *Ann .Neurol.* **32**, S82-S87, 1992.
- Johannessen, J.N., Adams, J.D., Schuller, H.M., Bacon, J.P. and Markey, S.P. 1-Methyl-4-phenylpyridine induces oxidative stress in the rodent. *Life Sci.* **38**: 743-749, 1986.
- Johanssen, P., Velandar, G., Mai, J., Thorling, E.B. and Dupont, E. Glutathione peroxidase in early and advanced Parkinson's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* **54**: 679-682, 1991.
- Johnson, W.G., Hodge, S.E. and Duvoisin, R. Twin studies and the genetics of Parkinson's disease - a reappraisal. *Movement Disorders..* **5**:187-194, 1990.
- Jossan, S.S., Gilberto, P.G., Karlson, I., Gottfries, C.G. and Oreland, L. Visualisation of brain monoamine oxidase B (MAO-B) in dementia of Alzheimer's type by means of large cryosection autoradiography: a pilot study. *J. Neural. Transm. (Suppl.* **32**), 1990.
- Jounela, A.J., Mattila, M.J. and Knoll, J. Interaction of selective inhibitors of monoamine oxidase with pethidine in rabbits. *Biochem. Pharmacol.* **26**: 806-808, 1977.
- Kalasz, H., Kerecsen, L., Knoll, j. and Pucsok, J. Chromatographie

- studies on the binding, action and metabolism of (-)-deprenyl. *J. Chromatogr.* **499**: 598-599, 1990.
- Kapitulnik, J., Gelboin, H.V., Guengerich, F.P. and Jacobowitz, D.M. Immunohistochemical localization of cytochrome P-450 in rat brain. *Neuroscience* **20**: 829-833, 1987.
- Kass, G.E.N., Wright, J.M., Nicotera, P.K., and Orrenius, S. The mechanism of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity. Role of intra-cellular calcium. *Arch. Biochem. Biophys.* **260**: 789-797, 1988.
- Kelly, E., Jenner, P. and Marsden, C. D. The effects of dopamine agonist on the release of ^3H -GABA and ^3H -5HT from rat nigral slices. *Biochem. Pharmac.* **43**: 2655-2662, 1985.
- Keshan Disease Research Group. Epidemiologic studies on the etiologic relationship of selenium and Keshan disease. *Chinese Medical Journal.* **92**: 477-497, 1979.
- Kim , K., Rhee, S.G. and Stadtman , E.R, Nonenzymatic cleavage of proteins by reactive oxigen species generated by dithiothreitol and iron. *J. Biol. Chem.*, **260**: 15394-15397, 1985.
- Kish, S.J., Morito, C. and Hornykiewiaz, D. Glutathione peroxidase activity in Parkinson's disease brain. *Neurosci. Lett.* **58**: 343-346, 1985.
- Kito, S., Shimoyama, M.,and Arakawa, R. Effects of neurotransmitters or drugs on the in vivo release of dopamine and its metabolites. *Jap. J. Pharmacol.* **40**: 57, 1986.
- Kleckern, W., and Dingledine, R. Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science.* **241**: 835-837, 1988.
- Klockgether, T., and Turski, L. Excitatory amino acids and the basal ganglia: implications for the therapy of Parkinson's disease. *Trends Neurosc.* **12**: 286-287. 1989.
- Kloiber, O., Banjac, B., Drewes, L.R. Protection against acute

- hyperammonemia: The role of quaternary amines. *Toxicology* **49**: 83-90, 1988.
- Knoll, J. (-) deprenyl (selegeline, Movergan R) facilitates the activity of the nigrostriatal dopaminergic neuron. *J. Neural. Transm.* **25**: 45-66, 1987.
- Knoll, J. Deprenyl (selegeline): the history of its development and pharmacological action. *Acta Neurol. Scand.* **95**: 57-80, 1983.
- Knoll, J. The possible mechanism of action of (-) deprenyl in Parkinson's disease. *J. Neural. Transm.* **43**: 177-198, 1978.
- Knoll, J. The striatal dopamine dependency of life span in male rats. Longevity with (-)deprenyl. *Mech. Ageing Dev.* **46**: 237-262, 1988.
- Knoll, J., Ecseri, Z., Kelemen, K., Nievel, J. and Knoll, B. Phenyliisopropylmethylpropynylamine (E250), a new spectrum psychic energizer. *Arch. int Pharmacodyn.* **155**(1): 289-285, 1965.
- knoll, J., Vizi Es and Somogyi, G. Phenyliisopropylmethylpropynylamine (E-250), a monoamino oxidase inhibitor antagonising the effect of tiramine. *Arzneim- Forsch* **18**: 409-412, 1968.
- Knoll. J., Dallo, J. and Yen, T.T. Striatal dopamine, sexual activity and lifespan. Longevity of rats treated with (-)deprenyl. *Life Sci.* **45**: 525-531, 1989.
- Korf, J., Zielemann, M. and Westerink, B.H.C. Dopamine release in substantia nigra?. *Nature.* **260**: 257-258, 1976.
- Korytowski, W., Felix, C.C. and Kalyanaraman, B. Oxygen activation during the interation between MPTP metabolites and syntetic neuromelanin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **154**: 781-788, 1988.
- Koulu, M. Lamminntausta, R. Human growth hormone and dopaminergic drugs, with special reference to deprenyl (selegeline): a summary of estudies on volunteers. *Acta Neurol. Scand* (suppl) **95**: 91-94, 1983.
- Krnjevic, K., Glutamate and G-aminobutyric acid in the brain. *Nature* **228**: 119-124, 1970.

- Lambert, C.E. and Bondy, C. Effects of MPTP, MPP+ and paraquat on mitochondrial potential and oxidative stress. *Life Sci.* **44**: 1277-1284, 1989.
- Landrieu, P., Selva J., Alvarez, F., Ropert, A. and Metral, S. Peripheral nerve involvement in children with chronic cholestasis and vitamin E deficiency. A clinical, electrophysiological and morphological study. *Neuropediatrics.* **16**: 194-201, 1985.
- Langston, J.W., Ballard, P. and Tetrad, J.W. and Irwin, I. Chronic parkinsonism in humans due to a product of mepertedine-analogue synthesis. *Science* **219**: 979-980. 1983.
- Langston, J.W., Forno, L.S., Rebert, C.S. and Irwin, I. MPTP causes selective damage to the zona compacta of the substantia nigra in the squirrel monkey. *Brain Res.* **298**: 390-394, 1984.
- Langston, J.W., Irwin, I., Langston, E.B. and Forno, L.S., Pargyline prevents 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonism in primates, *Science.*, **225** :1480-1482.1984.
- Lauber, J. and Waldmeier, P.C. Determination of 2-Phenylethylamine in rat brain after MAO inhibitor, and in human CSF and urine by capillary GC and chemical ionization MS. *J. Neural. Transm.* **60**: 247-264, 1984.
- Lawrence, R.A. and Burk, R.F. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **71**(4): 952-958, 1976.
- Lenz, A.G. , Costabel, U., Shaltiel, S. and Levine, R.L., Determination of carbonyl groups in oxidatively modified proteins by reduction with tritiated sodium borohydride. *Anal. Biochem.* **177**: 419-425, 1989.
- Levander, O.A. and Morris, V.C. Dietary selenium levels needed to maintain balance in North American adults consuming self selected diets. *Am. J. Clin. Nutr.* **39**: 809-815, 1984.
- Loeb, C., Iannuccelli, M., Traverro, F., Albano, C. Evaluation of the activity of acetyl-L-carnitine in the senile dementia Alzheimer Type.

IVth World Congress Biol. Psychiat-Philadelphia. Sept. 8-13 1985.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275, 1951.

Lucy, J.A. Functional and structural aspects of biological membranes: A suggested structural role for vitamin E in the control of membrane permeability and stability, Part I. Cellular biochemistry of vitamin E. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **203**: 4-11, 1972

Machlin, L.J., Keating, J., Nelson, J., Brin, M., Filipski, R. and Miller, O.N. Availability of adipose tissue tocopherol in the guinea pig. *J. Nutr.* **109**: 105-109, 1979.

Madson, L.L., McCay, C.M. and Maynard, L.A. Synthetic diets for herbivora, with special reference to the toxicity of cod-liver oil. *Cornell Univ. Agr. Exp. Sta. Mem.* **178**: 3-53, 1935.

Magyar, K. and Tothfalusi, L. Pharmacokinetic aspect of deprenyl effects. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.* **36**: 373-384, 1984.

Mann, J.J., Aarons, S.F., Wilner, P.J. et al. A controlled study of the antidepressant efficacy and side effects of (-)-deprenyl. *Arch Gen Psychiatry.* **46**: 45-50, 1989.

Maraganore, D.M., Harding, A.E. and Marsden, C.D. A clinical genetic study of familial Parkinson's disease. *Movement Disorders* **6**: 205-211, 1991.

Marsden, C.D. Parkinson's disease. *Lancet* **1**: 948-952, 1990.

Marttila, R.J., R oytt , M., Lorentz, H. and Rinne, U.K. Oxygen toxicity protecting enzymes in Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci.* **86**: 321-331, 1988.

Matsuoka, M. and Igisu, H. Comparison of the effects of L-carnitine, D-carnitine and acetyl-L-carnitine on the neurotoxicity of ammonia. *Biochemical Pharmacol.* **46**: 159-164.

McCamen, R., McCamen, M., and Stanfford, M. Carnitine

- acetyltransferase in nervous tissue. *J. Biol. Chem.* **241**: 930-934, 1966.
- McCay, P.B. Vitamin E: Interactions with free radicals and ascorbate. *Annual Review of Nutrition* **5**: 323-340, 1985.
- McConell, K.P. and Cho, G.J. Active transporte of L-selenomethionine in the intestine. *Am. J. Physiol.* **213**: 150-156, 1967.
- McConell, K.P. and Cho, G.J. Transmucosal movement of selenium. *Am.J. Physiol.* **208**: 1191-, 1965.
- McCord, J.M. and Fridovich, I., Superoxide dismutase, an enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein), *J. Biol. Chem.*, **244**: 6049-6055, 1969.
- McGee, C.D., Ostro, M.J., Kurian, R. and Jeejeebhoy, K.N. Vitamin E and selenium status of patients receiving short-term parenteral nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* **42**: 432-438, 1985.
- McGeer, P.L., Itagatki, S., Akiyama, H. and McGeer, E.G. Comparison of neuronal loss in Parkinson's disease and aging. *In Parkinsonism and Aging.* (D.B. Calne et al., eds): Raven Press, New York, pp. 25-34, 1989.
- McQuade, P.S. Analysis and the effect of some drugs on the metabolism of phenylethylamine and phenylacetic acid. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* **8**: 607-614, 1984.
- Meeker, J.E., Reynolds, P.C. Postmortem tissue methamphetamine concentrations following selegiline administration. *J. Anal. Toxicol.* **14**: 330-331, 1990.
- Mello-Filho, A.C., Maneghini, R. In vivo formation of single-strand breaks in DNA by hydrogen peroxide is mediated by Haber-Weiss reaction. *Biochem. Biophys. Acta.* **781**: 56-73, 1984.
- Mendlewicz, J. and Youdin, M.B.H. Monoamine-oxidase inhibitors and prolactin secretion. *Lancet.* **11**: 507, 1977.
- Meydani, M., Meydani, S.N., Macauley, S.B. and Blumberg, J.R. Influence of dietary vitamin E and selenium in the ex vivo synthesis of

- prostaglandin E2 in brain regions of young and old rats. *Prostagland. Leukotri. Med.* **19**: 337-346, 1985.
- Michelot, R., Leviel, V., Giorgianni-Chesselet, M.F. Cheramy, A. and Glowinski. Effect of the unilateral nigral modulation of substance-P transmission on the activity of the nigro-striatal dopaminergic pathways. *J. Life Sci.* **24**: 715-724, 1979.
- Mihatssch, W., Russ, H., Gerlach, M. Riedere, P., Przuntek, H., Treatment with antioxidants does not prevent loss of dopamine in the striatum of MPTP-treated common marmosets: preliminary observations. *J. Neural. Transm . Parkinson disease and Dementia section 3*: 73-78, 1991.
- Milson, J.A. and Pycock, C.J. Effects of drugs on cerebral 5-dihydroxytryptamine mechanism on dopamine-dependent turning behaviour in mice. *Br. J. Pharmacol.* **56**: 77-85, 1976.
- Morris, A.J. and Carey, E.M. Postnatal changes in the concentration of carnitine and acetylcarnitines in the rat brain. *Brain Res.* **284**: 383-384, 1983.
- Muller, D. P. R., Lloyd, J. K. and Wolff, O. H., Vitamin e and neurological function. *Lancet*, i: 225-228, 1983.
- Muller, D.P.R., Manning, J.A., Mathias, P.M. and Harris, J.T. Studies on the intestinal hydrolysis of tocopherol esters. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **46**: 207-210, 1976.
- Müller, P. and Seaman, P. Brain neurotransmitter receptors after long-term haloperidol: dopamine, acetylcholine, serotonin, a-noradrenergic and naloxone receptors. *Life Sci.* **21**: 1751-1758, 1977.
- Myllyla, V.V., Sotaniemi, K.A., Vuoriene, J.A. and Heinonen, H.E. Selegiline as primary treatment in de novo parkinsonian patients. *Neurology* . 1991.
- Nève, J. and Carpentier, Y.A. Laboratory methods for assesment of selenium status . In: Nutrition in Clinical Practise. W. Hartig, G. Dietze and R. Weiner (Eds.), Karger, Basel, pp. 273-286, 1989.

- Nève, J. Biological parameters for assessing selenium status. In: *Selenium in Medicine and Biology*. J. Nève and A. Favier (Eds.), W. de Gruyter, Berlin, pp. 137-148, 1988.
- Nicklas, W.J., Vyas, I. and Heikkila, R.E. Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by MPP+, a metabolite of the neurotoxin MPTP. *Life Sci.* **36**: 2503-2508, 1985.
- Nieoullon, A., Cheramy, A. and Glowinski, J. Release of dopamine in both caudate nuclei and substantia nigrae in response to unilateral stimulation of cerebellar nuclei in the cat. *Brain Res.* **148**: 143-152, 1978.
- O'Regan, D., Kwok R.P.S., Yu, P.H., Baylei, B.A., Greenshaw, A.J. and Boulton, A.A. A behavioural and neurochemical analysis of chronic and selective monoamine oxidase inhibition. *Psychopharmacology.* **92**: 42-47, 1987.
- Odunze, I.N., Klaidman, L.K., Adams, J.D. Jr. MPTP toxicity in the mouse brain vitamin E. *Neurosci. Lett.* **108**: 346-349, 1990.
- Ohen, G. and Spina, M.B. Deprenyl suppresses the oxidant stress associated with increased dopamine turnover. *Ann. Neurol.* **26**: 689-690, 1989.
- Olanow, C.W. Oxidation reactions in Parkinson's disease. *Neurology* **40** (suppl 3): 32-37, 1990.
- Ono, H., Ito, H. and Fukuda, H. 2-Phenylethylamine and methamphetamine enhance the spinal monosynaptic reflex by releasing noradrenaline from the terminals of descending fibers. *Japan J. Pharmacol.* **55**: 359-366, 1991.
- Onofrj, M., Bodis-Wollner, I., Pola, P., Calvani, M. Central cholinergic effects of levo-acetylcarnitine. *Drugs Exp. Clin. Res.* **9**: 161-169, 1983.
- Oreland, L. Arau, Y. and Stenstrom, A. The effect of deprenyl (selegiline) on intra- and extraneuronal dopamine oxidation. *Acta Neurol Scand* (suppl **95**): 81-85, 1983.

- Oreland, L., Fowler, C.J., Carlson, A. and Magnusson, T. Monoamine oxidase -A and -B activity in the rat brain after hemitransection. *Life Sci.* **26**: 139-146, 1980.
- O'Connor, J.E., Costell, M., Grisolia, S. Protective effect of L-carnitine on hyperammonemia. *FEBS Lett.* **166**: 331-334, 1984.
- O'Connor, J.E., Costel, M., Grisolia, S. *Neurochem. Res.* **9**: 563-570, 1988b.
- Packer, J.E., Slater, T.F. and Willson, R.L. Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature* **278**, 737-738., 1979.
- Paglia, D.E. and Valentine, W.N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* **70**: 158-169, 1970.
- Pande, S.V. and Parvin, R. Characterization of carnitine translocase system of heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* **251**: 6683-6691, 1976.
- Paradies, G., Ruggiero, F.M., Gadaleta, M.N., Quingliariello, E. The effect of aging and acetyl-L-carnitine on the activity of the phosphate carrier and on the phospholipid composition in rat heart mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* **1103**: 324-326, 1992.
- Pare, C.M.D., Mousawi, M.A., Sandler, M. and Glover, V. Attempts to attenuate the "cheese effect". *J. Affective Disord.* **9**: 137-141, 1985.
- Parent A. Extrinsic connections of the basal ganglia. A review. *TINS.* **13**(7): 254-258, 1990.
- Parent A. Extrinsic connections of the basal ganglia. A review. *TINS.* **13**(7): 254-258, 1990.
- Parent A., Mackey A., Smith Y. and Boucher R. The output organization of the substantia nigra in primate as revealed by a retrograde double labeling method. *Brain. Res. Bull.* **10**: 529-537, 1983.
- Parson P.G. Modification of dopa toxicity in human tumor cells.

Biochemical Pharmacology. **35**: 1801-1807, 1985.

- Parvin, R. and Pande, S. V. Enhancement of mitochondrial carnitine acylcarnitine translocase-mediated transport of fatty acids into liver mitochondria under ketogenic conditions. *J. Biol. Chem.* **254**: 5423-5429, 1979.
- Patacchioli, F.R., Amenta, F., Ramacci, M.T., Tagliatela, G., Maccari, S., Angelucci, L. Acetyl-L-carnitine reduce the age-dependent loss of glucocorticoid receptors in the rat hippocampus: An autoradiographic study. *J. Neurosc. Res.* **23**: 462-466, 1989.
- Paxinos, G. and Watson, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press. Sydney. 1982.
- Perez-Polo, J.R., Werrbach-Perez, K., Ramacci, M.T., Tagliatela, G., Morgan, B., Angelucci, L. Role of nerve growth factors in neuroglial disease. In Agnoli A, Cahn J, Lassen n, Mayeux R (eds): "Senile Dementias Second Int Symp. Current Problems in Senile Dementias Vol. 2. " Paris: John Libbey Eurotext. pp 15-25, 1988.
- Perona, C., Guidi, G.C., Piga, A., Cellerino, R., Menna, R. and Zatti, M. In vivo and in vitro variations of human erythrocyte glutathione peroxidase activity as a result of cells ageing, selenium availability and peroxide activation. *Br. J. Haemat.* **39**: 399-408, 1978.
- Perry, R.H. Recent advances in neuropathology. *Brit. Med. Bull.* **42**: 34-41, 1986.
- Perry, R.L. and Yong, V.W. Idiopathic Parkinson's disease, progressive supranuclear palsy and glutathione metabolism in the substantia nigra of patients. *Neurosc. Lett.* **67**: 269- 1986.
- Perry, T.L., Godin, D. V. and Hasen, S. Parkinson's disease: A disorder due to nigral glutathione deficiency?. *Neurosc. Lett.* **33**: 305-310, 1982.
- Pfenninger, K.H. Of nerve growth cones, leukocytes and memory: secondary messenger systems and growth-related proteins. *Trends in Neurosci.* **9**: 562-565, 1986.
- Philips, S.R. Amphetamine, p-hydroxyamphetamine and b-

- Phenylethylamine in mouse brain and urine after (-) and (+) deprenyl administration. *J. Pharmacol.* **33**: 739-741, 1981.
- Pikarski, E., Melamed, E., Rosenthal, H., Uzzan, A. and Michowiz, S.D. The neurotoxin MPTP does not affect striatal superoxide dismutase activity in mice. *Neurosc. Lett* **82**: 127-128, 1987.
- Poirier, J. and Barbeau, A. MPTP potentiates iron induced lipid peroxidation without the involvement of free radicals derived from oxigen. *Res Comm Chem. Pathol. Pharmacol.* **56**: 387-399, 1987.
- Pryor, W.A. The free radical theory of aging revisited: A critique and a suggested disease specific theory. In: *Modern Biological Theories of Aging*. H.R. Warner et al. (Eds.), Raven Press, New York, pp. 89-112, 1987.
- Pycock and Dawbarn. Acute motor effects of N-methyl-D-aspartic acid and Kainic applied focally to mesencephalic dopamine cell body regions in the rat. *Neurosc. Lett.* **18**., 85-90, 1980.
- Quercia, R.A., Korn, S., O'Neill D., Dougherty, J.E., Ludwig, M., Schweizer, R. and Sigman, R. Selenium deficiency and fatal cardiomiopathy in a patient receiving long-term home parenteral nutrition. *Clin. Pharm.* **3**: 351-355 , 1984.
- Quitkin, F.M., Liebowitz, M. R., Stewart, J. W., et al. L-Deprenyl in atypical depressives. *Arch. Gen. Phychiatry.* **41**: 777-781, 1984.
- Ramsay, R.R. and Singer, T.P. Energy-dependent uptake of N-methyl-4-phenylpyridinium, the neurotoxic metabolite of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, by mitochondria. *J. Biol. Chem.* **261**: 7585-7587, 1986.
- Ramsay, R.R., Dadger, J., Trevor, A. and Singer, T.P. Energy driven uptake of MPP+ by brain mitochondria mediates the neurotoxicity of MPTP. *Life Sci.* **39**: 581-588, 1986.
- Ramsay, R.R., Salach, J.I. and Singer, T.P. Uptake of the neurotoxin 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP+) by mitochondria and its relation to the inhibition of the mitochondrial oxidation of NAD+-linked substrates by MPP+. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **134**: 743-

748,1986.

- Ramsay, R.R., Salach, J.I., Dadgar, J., Singer, T.P. Inhibition of mitochondrial NADH dehydrogenase by pyridine derivatives and its possible relation to experimental and idiopathic parkinsonism. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **135**: 269-275, 1986.
- Ransom, B.R., Kunis, D.M., Irwin, I. and Langston, J.W., et al., Astrocytes convert the Parkinsonism inducing neurotoxin MPTP to its active metabolite MPP+. *Neurosci Lett.*, **75**: 323-328, 1987.
- Rausch, W.D., Schallauer, E., Chan, W.W., Riederer, P. and Weiser, M. Effects of L-deprenyl and amantadine in an MPTP- model of parkinsonism. *J. Neural. Transm.* (suppl. **32**): 269-275, 1990.
- Recommended Dietary Allowances, ninth revised edition, National Academy of Sciences, Washington D.C. 1980.
- Reubi, J. C., Emson P.C., Jessell T.M. and Iversen L.L. Effects of GABA, dopamine and substance P on the release of newly synthesized [³H]-5-hydroxytryptamine from rat substantia nigra in vitro. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **304**: 271-275, 1978.
- Reubi, J.C. and Emson P.C. Release and distribution of endogenous 5-HT in rat substantia nigra. *Brain Res.* **139**: 164-168, 1978.
- Reubi, J.C., Iversen, L.L. and Jessel, T.M. Dopamine selectively increases ³H-GABA release from slices of rat substantia nigra in vitro. *Nature London.* **298**: 652-654, 1977.
- Riederer, P. and Wuketich S. Time course of nigrostriatal degeneration in Parkinson's disease. *J. Neural. Transm.* **38**: 277-301, 1976.
- Riederer, P., Konradi, C., Schy, V. et al. Localization of MAO-A and MAO-B in human brain: A step in understanding the therapeutic action of L-Deprenyl. *Adv. Neurol.* **45**: 111-118, 1986.
- Riederer, P., Rausch, W.D., Schmidt, B., Kruzik, P., Konradi, C., Sofic, E., Danielczyk, W., Fischer, M. and Ogris, E. Biochemical fundamentals of Parkinson's disease. *Mt. Sinai J. Med.* **55**: 21-28,

1988.

Riederer, P., Sofic E., Rausch W.D., Schmidt, B., Reynolds G.P., Jellinger K. and Youdim M.B.H. Transition metals, ferritin, glutathione and ascorbic acid in parkinsonian brain. *J. Neurochem.* **52**: 515-520, 1989.

Riederer, P., Youdin, M.B.H., Rausch, W.D., Birkmayer, W. Jellinger, K. and Seemann, D. On the Model of Action of L-Deprenyl in the Human Central Nervous System. *J. Neural. Transm.* **43**: 217-226, 1978.

Rinne, U.K. Combination of a dopamine agonist, MAO-B inhibitor and levodopa - a new strategy in the treatment of early Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand.* **126**: 165-169, 1989.

Rios, C. and Tapia, R. Changes in lipid peroxidation induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and 1-methyl-4-phenylpyridium in mouse brain homogenates. *Neurosc. Lett.* **77**: 321-326, 1987.

Rizza, V., Morale, M.C., Guarcello, V. and Guerrera, F. Effect of L-carnitine and acetyl-L-carnitine on brain metabolism. In: Biological Psychiatric, Development in Psychiatric. Vol 7 (eds) C. Shagas. R.C. Josiassen, W.H. Bridger, K. J. Weis, D, Stoff and G. M. Sipsom Elsevier Science Publishing, pp 1346-1348, 1986.

Robinson, D.S., Nies, A., Davis J.N., et al. Ageing, monoamines, and monoamine-oxidase levels. *Lancet.* **1**: 290-291, 1972.

Robinson, J.R., Robinson, M.F., Levander, O.A. and Thompson, C.D. Urinary excretion of selenium by New Zealand and North American human subjects on differing intakes. *Am. J. Clin. Nutr.* **41**: 1023-1031, 1985.

Rosenblum, J., Keating, J.P., Prensky, A. and Nelson, J.S. A progressive neurologic syndrome in children with chronic liver disease. *N. Engl. J. Med.* **304**: 503-508, 1981.

Rotruck J.T., Pope A.L., Ganther H.E., Swanson A.B., Hofeman D.G. and Hoekstra W.G. Selenium: Biochemical role as a component of

- glutathione peroxidase. *Science*. **179**: 588-589, 1973.
- Saggu, H., Cooksey, J., Dexter, D., Wells, F.R., Lees, A.J., Jenner, P. and Marsden, C.D. A selective increase in particulate superoxide dismutase activity in Parkinsonian substantia nigra. *J. Neurochem.* **53**: 692-697, 1989.
- Salach, J.I., Singer, T.P., Castagnoli, N. and Trevor, A. Oxidation of the neurotoxic amine MPTP by monoamine oxidases A and B and suicide inactivation of the enzymes by MPTP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **125**: 831-835, 1984.
- Sandler, M. Does phenylethylamine cause schizophrenia? *Lancet*. **i**: 70-71, 1976.
- Sandler, M. Glover, V., Ashford, A. and Ster, G.M. Absence of "cheese effect" during deprenyl therapy: some recent studies. *J. Neural. Transm.* **43**: 209-215, 1978.
- Santivuori, P. and Westermack, T. Antioxidant therapy in neuronal ceroid-lipofuscinosis. *Med. Biol.* **62**: 152-153, 1984.
- Santivuori, P. Experience over 17 years with antioxidant treatment in Spielmeier Sjörgen disease. *Am. J. Med. Genet.* **5**: 265-274, 1988.
- Saransaari, P. Oja, S.S. Release of GABA and Taurine from Brain Slices. *Progress in Neurobiology* **38**: 455-482, 1992.
- Sas, M., Godo, G., Koleszar, G. Az extrapuerperalis galactorrhoe Kezel'se MAO-B Gátló Selegilin-net. *Orvosi Hetialp.* **127**: 1507-1511, 1986.
- Scachter, M., Marsden, C.D. Parkes, J.D. Jenner, P., Testa, B. Deprenyl in the management of response fluctuations in patients with Parkinson's disease of levodopa. *J. Neurol. Neurosurg Psych.* **43**: 1016-1021, 1980.
- Scatzki, A. MacMillian, M. and Miller, L.G. Glutamate, Kainate and quisqualate enhance GABA-dependent chloride uptake in cortex. *Brain Research*, **25**: 239-243, 1990.
- Schapira, A.H.V., Cooper, J.M., Dexter, D., Jenner, P., Clark, J.B., and Marsden, C.D. Mitochondria complex I deficiency in Parkinson's

- disease. *J. Neurochem.* **54**: 823-827, 1990a.
- Schapira, A.H.V., Cooper, J.M., Dexter, D., Jenner, P., Clark, J.B., and Marsden, C.D. Mitochondria complex I deficiency in Parkinson's disease. *Lancet* I : 1269, 1989.
- Schoenberg, B.S. Epidemiology of movement disorders, In: *Movement Disorders 2* (eds Fahn S and Marsden CD). Butterworth Scientific, London, pp17-32. 1987.
- Schrauzer, G.N. Selenium and cancer. In: *Selenium in Medicine and Biology*, J. Néve and A. Favier (Eds.), W. de Gruyter, Berlin/New York, pp. 251-261, 1988.
- Sechi, G., Tanda, F. and Mutani, R. Fatal hyperpyrexia after withdrawal of levodopa. *Neurology.* **34**: 249-251, 1984.
- Sershen, H. Harsing, L.G., Banay-Schwartz, M. Hashim, A. Ramacci, M.T. and Lajha, A. Effect of Acetyl-L-Carnitine on the Dopaminergic System in Agin Brain. *J. Neurosc. Res.* **30**: 555-555, 1991.
- Shimizu, N. Matsunami, T. and Onishi, S. Histochemical demonstration of ascorbic acid in the locus coeruleus of the mammalian brain. *Nature.* **186**: 479-480, 1960.
- Simone, R., Ramacci, M.T. and Aloe, L. Effect of acetyl-L-carnitine on forebrain cholinergic neurons of developing rats. *Int. J. Dev. Neurosc.* **9**: 39-46, 1991.
- Sinet ,P.M., Lejeune, J. and Jerome, H. Trisomy 21 (Down's syndrome), glutathione peroxidase, Hexose monophosphate shunt and I.Q. *Life Sci.* **24**: 29-34, 1979.
- Singer, T.P., Castagnoli, N., Ramsay, R.R. and Trevor, A.J. Biochemical events in the development of parkinsonism induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *J. Neurochem.* **49**: 1-8, 1987.
- Smith, A.D. and Bolam, J.P. The neural network of the basal ganglia as revealed by the study of synaptic connections of identified neurons. *TINS.* **13**(7): 259-265, 1990.

- Smith, M.T., Ekström, G., Sandy, M.S. and Di Monte, D. Molecular mechanisms of MPTP-induced toxicity. VI Studies on the mechanism of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine cytotoxicity in isolated hepatocytes. *Life Sci.* **40**: 741-748, 1987.
- Snyder, S.H. and D'Amato, R.J. MPTP: A neurotoxin relevant to the pathophysiology of Parkinson's disease. *Neurology.* **36**: 250-258, 1986.
- Sofic, E., Paulus, W., Jellinger, K., Riederer, P., and Youdim, M.B.H. Selective increase of iron in substantia nigra zona compacta of parkinsonian brains. *J. Neurochem.* **56**: 978-982, 1991.
- Sofic, E., Riederer, P., Heinsen, H., Beckman, H., Reynolds, G.P., Hebenstrett, G. and Youdin, M.B.H. Increased iron (III) and total iron content in post-mortem substantia nigra of parkinsonian brain. *J. Neural Transm.* **74**: 199-205, 1988.
- Sohal R.S. and Allen R.G. Relationship between metabolic rate, free radicals, differentiation and aging: A unified theory. In: *Molecular Biology of Aging*, Brookhaven Symposium, Plenum Press, New York, pp. 75-104, 1985.
- Sohal R.S. and Allen R.G. Relationship between oxygen metabolism, aging and development. *Advances in Free Radicals Biology and Medicine.* **2**: 117-160, 1986.
- Sokol, R.J. Vitamin E and neurologic function in man. A review. *Free radicals Biology and Medicine.* **6**: 189-207, 1989.
- Sokol, R.J., Butler-Simon, N.A., Bettis, D., Smith, D.J. and Silverman, A. Tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate therapy for vitamin E deficiency during chronic childhood cholestasis: Neurologic outcome. *J. Pediatr.* **111**: 830-836, 1987.
- Sokol, R.J., Kayden, H.J., Bettis, D.B., Traber, M.J., Neville H. et al. Isolated vitamin E deficiency in the absence of fat malabsorption-familial and sporadic cases: characterization and investigations of causes. *J. Lab. Clin. Med.* **111**: 548-559, 1988.

- Spina, M. B., Cohen, G. Dopamine turnover and glutathione oxidation. Implications for Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 1398-1400, 1989.
- Steinbusch, H.W.M., Nieuwenhuys, R., Verhofstad, A.A.F. and Van der Kooy, D. The nucleus raphe dorsalis of the rat and its projection upon the caudate-putamen. *J. de Physiologie*. **77**: 157-174, 1981.
- Stevenson, G.B., Heafield, H.T. E., Waring. R. H. and Williams, A.C. Xenobiotic metabolism in Parkinson's disease. *Neurology*. **39**: 883-887, 1989.
- Stumpt, D.A., Sokol, R.J., Bettis, D., Neville, H. and Ringel, S. Friedreich's disease: V. Variant form with vitamin E deficiency and normal fat absorption. *Neurology*. **37**: 68-74, 1987.
- Sutphin, M.S. and Buckman, T.D. Effects of low selenium diets on antioxidant status and MPTP toxicity and mice. *Neurochem. Res.*, **16**: 1257-1263, 1991.
- Szoco, E., Kalasz, H., Kerecsen, L. and Magyar, K. Binding of (-) deprenyl to serum proteins. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.* **36**: 413-421, 1984.
- Takada, M., Li, Z.K. and Hattori, T., Astroglial ablation prevents MPTP-induced nigrostriatal neuronal death. *Brain. Res.* **509**: 55-61, 1990.
- Tanner, C.M. The role of environmental toxins in the etiology of Parkinson's disease. *Tins* **12**: 49-54, 1989.
- Tanner, C.M., Chen, B., Wang, W. et al. Environmental factors and Parkinson's disease: a case-controlled study in China. *Neurology*. **39**: 660-664, 1989.
- Tappel, A.L. Vitamin E as the biological lipid oxidant. *Vitamin Horm.* **20**: 493-510, 1962.
- Tatton, W.G., Greenwood, C.E., Seniuk, N.A. and Salo, P.T. Interactions between MPTP-induced and age-related neuronal death in a murine model of Parkinson's disease. *Can. J. Neurol. Sci.* **19**: 124-133, 1992.

- Tatton, W.G. and Greenwood, C.E., Rescue of dying neurons: A new action for deprenyl in MPTP parkinsonism. *J. Neurosci. Res.* **30**: 666-672, 1991.
- Tempesta, E., Janiri, L., Pirroncelli, C. Stereospecific effects of acetyl-l-carnitine on the spontaneous activity of brainstem neurones and their responses to acetylcholine and serotonin. *Neuropharmacology* **24**: 43-47, 1985.
- Tetrud, J.W. and Langston, J.W. The effect of deprenyl (selegiline) on the natural history of Parkinson's disease. *Science*. **254**: 519-522, 1989.
- The Parkinson's Study Group. DATATOP. *Arch Neurol.* **46**: 1052-1060, 1989.
- The Parkinson Study Group, Effects of tocopherol and deprenyl and the progression of disability in early Parkinson's disease. *New England. J. Med.* **328**: 176, 1993.
- Thomitzek, W.D. Die Wirkung von Derivaten des (-) und (+) Acetylcarnitins auf Bildung von Acetylcholine. *Biochem. Pharmacol. Conference Issue, 2nd Int. Pharmacol. Meeting* S 161, 1963.
- Thorling, E.B., Overvad, K. and Gebeers, J. Selenium status in Europe. Human data. A multicenter study. *Annl. Clin. Res.* **18**: 3-9, 1986.
- Traber M.G. and Kayden H.J. Vitamin E is delivered to cells via the light affinity receptor for low density lipoprotein. *Am. J. Clin. Nutr.* **40**: 747-751, 1984.
- Van der Kooy, D. and Hattori, T. Dorsal raphe cells with collateral projections to the caudate-putamen and substantia nigra: a fluorescence retrograde double labeling study in the rat. *Brain Res.* **186**: 1-7, 1980.
- Van Rij, A.M., Thomson, C.D., McKenzie, J.M. and Robison, M.F. Selenium deficiency in total parenteral nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* **32**: 2086-2095, 1979.
- Vatassery, G.T. Selected aspects of the neurochemistry of vitamin E. In: *Clinical and Nutritional Aspects of Vitamin E*. O. Hayaishi, M. Mino (Eds.), Amsterdam, Elsevier, pp. 147-155, 1987.

- Vatassery, G.T., Angerhofer, C.K. and Knox, C.A. Effect of age on vitamin E concentrations in various regions of the brain and a few selected peripheral tissues of the rat, and on the uptake of radioactive vitamin E by various regions of rat brain. *J. Neurochem.* **43**: 409-412, 1984.
- Veening, J.G., Cornelissen, F.M. and Lieven, P.A.J.M. The topical organization of the afferents to the caudoputamen of the rat. A horseradish peroxidase study. *Neuroscience.* **5**: 1253-1268, 1980.
- Vizuete, M.L. Steffen, V., Machado, A. and Cano, J. Effects of neonatal enucleation on catecholamine and serotonin turnover and amino acid levels in lateral geniculate nucleus and visual cortex of the adult rat. *Brain Res.* **575**: 231-237, 1992.
- Vizuete, M.L., Santiago, M., Herrera, A.J., Machado A. and Cano J., . Neonatal enucleation alters catecholamine and serotonin metabolism in the lateral geniculate and visual cortex in developing rats. *Neurochem. Int.* **17**: 415-424, 1990 b
- Volicer, L. and Crino, P.B. Involvement of free radicals in dementia of the Alzheimer type: A hypothesis. *Neurobiol. Aging.* **11**: 567-571, 1990.
- Waddington, J.L. and Crow, T.J. Rotational responses to serotonergic and dopaminergic agonist after unilateral dihydroxytryptamine lesions of the medial forebrain bundle, co-operative interactions of serotonin and dopamine in neostriatum. *Life Sci.* **25**: 1307-1314, 1979.
- Wajsborcht, J., Kartmazov, K., Oppenheim, B., Barkey, R. and Youdin, M.B.H. The clinical and biochemical investigation of L-deprenyl in Parkinson's disease with special referece to the "on-of" effect. *J. Neural. Transm.* **55**: 201-215, 1982.
- Waring, R. H., Sturman, S. G., Smith, M. C. G., Steventon, G. B., Heafield, M. T. E. and Williams, A. C. S-methylation in motor neuron disease and Parkinson's disease. *Lancet* . **I**: 356-357. 1989.

- Warner, M., Köhler, C., Hansson, T. and Gustafsson, J.A. Regional distribution of cytochrome P-450 in the rat brain: Spectral quantification and contribution of P-450b,e and P-450c,d. *J. Neurochem* **50**: 1057-1065, 1988.
- Weder, B., Meienberg, O., Wildi, E. and Meier, C. Neurologic disorder of vitamin E deficiency in acquired intestinal malabsorption. *Neurol.* **34**: 1561-1565, 1984.
- White, H.L. and Scates, P.W. Acetyl-L-carnitine as a precursor of acetylcholine. *Neurochem. Res.* **15**: 597-603, 1990.
- Witting, L.A. The role of nutritional factors in free-radicals reactions. *Advanc. Nutr. Res.* **1**: 189-225, 1977.
- Wolffram, S., Arduser, F. and Scharrer, E. In vivo intestinal absorption of selenate and selenite by rats. *J. Nutr.* **115**: 454-458, 1985.
- Xu, M., Mizobe, F., Yamamoto, T. and Kato, T. Differential effects of M1- and M2-muscarinic drugs on striatal dopamine release and metabolism in freely moving rats. *Brain Res.* **495**: 232, 1989.
- Yamamoto, B.K. and Davy, S. Dopaminergic Modulation of Glutamate Release in the striatum as Measured by Microdialysis. *J. Neurochem.* **58**: 1736-1742, 1992.
- Yang, G., Chen J., Wen, Z. and Ge, K. The role of selenium in Keshan disease. In: *Advances in Nutritional Research*. H.H. Drapper (Ed.), Plenum Press, New York, pp. 203-231, 1984.
- Yong, V., Perry, T. and Krisman, A. Depletion of glutathione in brainstem of mice caused by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine is pre-vented by antioxidant pretreatment. *Neurosci. Lett.* **63**: 56-60, 1986.
- Yoshida, T., Yamada, Y., Yamamoto, T. and Kuroiwa, Y. Metabolism of deprenyl, a selective monoamine oxidase (MAO) B inhibitor in rat: relationship of metabolism to MAO-B inhibitory potency. *Xenobiotica* **16**: 129-136, 1986.

Youdim, M.B.H., Ben-Shachar, D. and Riederer, P. Is Parkinson's disease and progressive siderosis of substantia nigra resulting in iron and melanin induced neurodegeneration? *Acta Nuerol. Scand.* **126**: 47-57, 1989.

Ziegler, D.M. Role of reversible oxidation-reduction of enzyme thiols-dissulfides in metabolic regulation. *Ann. Rev. Biochem.* **54**: 305-309, 1985.

Zsilla, G., Foldi, P., Held, G., Sz'kely A.M. and Knoll, J. The effect of repeated doses of (-) deprenyl on the dynamics of monoaminergic transmission. Comparison with clorgyline. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.* **38**: 57-67, 1986.

Zsilla, G., Knoll, J. The action of (-)deprenyl on monoamine turnover rate in the brain; in Costa E, Racagni G (eds); Typical and atypical antidepressants; molecular mechanism. New York, Raven Press, pp 211-217, 1982.