

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA,
BROMATOLOGIA Y TOXICOLOGIA.

**INACTIVACION POR OXIDACION DE LA ENZIMA
TIROSINA HIDROXILASA DE SUSTANCIA NEGRA DE
RATA DURANTE EL PROCESO DE ENVEJECIMIENTO:
EFECTO PROTECTOR DEL TRATAMIENTO CON
DEPRENILO.**

Tesis que presenta la Lda.
M^a Cristina Pérez de la Cruz
para optar al grado de Doctora
en Farmacia.

Sevilla 1 de Marzo de 1995

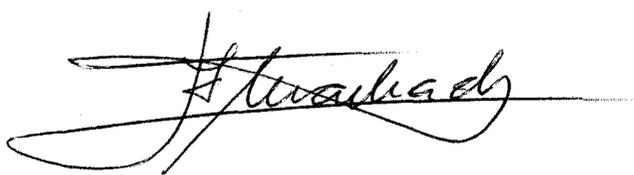
R.10762

T-879

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

CERTIFICA: Que la tesis doctoral titulada **"Inactivación por oxidación de la enzima Tirosina Hidroxilasa de sustancia negra de rata durante el proceso de envejecimiento: efecto protector del tratamiento con deprenilo"**, presentada por la Lda. M^a CRISTINA PEREZ DE LA CRUZ para optar al grado de Doctora 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 1 de Marzo de 1995.



Fdo. Alberto Machado de la Quintana

Queda registrado esta Tesis Doctoral
en el folio 182 número 129 del libro
correspondiente.
Sevilla, 12 MAR 1985

El Jefe del Negociado de Tesis,



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

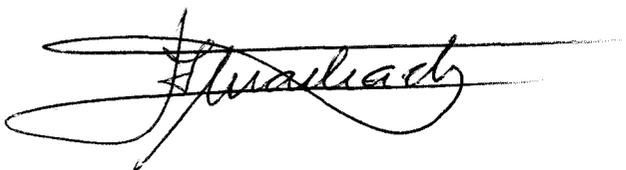
**DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA,
BROMATOLOGIA Y TOXICOLOGIA**

Tesis que presenta la Lda. M^a Cristina Pérez de la Cruz para
optar el grado de Doctora en Farmacia.



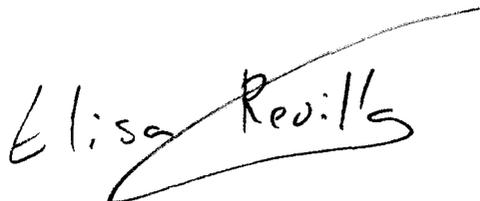
Fdo. M^a Cristina Pérez de la Cruz

Director



Fdo. Dr. Alberto Machado

Director



Fdo. Dra. Elisa Revilla

INDICE

1. INTRODUCCION	1
1.1. Radicales libres y envejecimiento	2
1.2. Oxidación de proteínas y envejecimiento	6
1.3. Formación de grupos carbonilos en las proteínas	9
1.4. Metabolismo de catecolaminas	14
1.5. Tirosina hidroxilasa	20
1.6. Tirosina hidroxilasa y envejecimiento	25
1.7. Degeneración neuronal	27
1.8. Enfermedad de Parkinson	29
1.9. Deprenilo	32
1.10. Hormona de crecimiento, IGF-I y envejecimiento	36
1.11. Aspectos estructurales	40
1.11.1. Ganglios basales: vía nigro-estriada	40
1.11.2. Corteza prefrontal e hipocampo	44
1.11.3. Bulbo olfatorio	46
1.11.4. Colículo superior	46
1.11.5. Eje hipotalámico-hipofisario	46
2. OBJETIVOS	48
3. MATERIAL Y METODOS	50
3.1. Animales	51
3.2. Reactivos	58

3.3. Aparatos	59
3.4. Medida de la actividad Tirosina hidroxilasa "in vivo"	60
3.5. Cuantificación de Tirosina hidroxilasa	61
3.6. Cuantificación de neurofilamentos y glía	62
3.7. Determinación de grupos carbonilos en homogenados de proteínas	64
3.8. Determinación de grupos carbonilos de la enzima Tirosina hidroxilasa	64
3.9. Inmunoprecipitación de Tirosina hidroxilasa radiomarcada	65
3.10. Oxidación "in vitro" de Tirosina hidroxilasa	65
3.11. Medida de la actividad Tirosina hidroxilasa "in vitro"	66
3.12. Determinación de grupos carbonilos en homogenados de proteínas tras oxidación	66
3.13. Determinación de grupos carbonilos de la enzima Tirosina hidroxilasa tras oxidación	67
3.14. Medida de la cantidad de proteínas	68
3.15. Tratamiento con deprenilo	68
3.16. Obtención del plasma tras el tratamiento con deprenilo	68
3.17. Extracción de IGF-I	70
3.18. Medida de IGF-I	70
3.19. Análisis estadístico	71
4. RESULTADOS	72
4.1. Estudio de la actividad y la cantidad de enzima Tirosina hidroxilasa en diferentes centros del SNC durante el envejecimiento	73
4.1.1. <u>Bulbo olfatorio</u>	
4.1.1.1. Medida de la actividad Tirosina hidroxilas "in vivo"	73
4.1.1.2. Estudio de la cantidad de enzima Tirosina hidroxilasa	73

4.1.2. <u>Colículo superior</u>	
4.1.2.1. Medida de la actividad Tirosina hidroxilas "in vivo"	76
4.1.2.2. Estudio de la cantidad de enzima Tirosina hidroxilasa	76
4.1.3. <u>Hipocampo</u>	
4.1.3.1. Medida de la actividad Tirosina hidroxilas "in vivo"	78
4.1.3.2. Estudio de la cantidad de enzima Tirosina hidroxilasa	78
4.1.4. <u>Corteza prefrontal</u>	
4.1.4.1. Medida de la actividad Tirosina hidroxilas "in vivo"	80
4.1.4.2. Estudio de la cantidad de enzima Tirosina hidroxilasa	80
4.1.5. <u>Eje hipotalámico-hipofisario</u>	
4.1.5.1. Medida de la actividad Tirosina hidroxilas "in vivo" en hipotálamo, eminencia media e hipófisis	82
4.1.5.2. Estudio de la cantidad de enzima Tirosina hidroxilasa en hipotálamo, eminencia media e hipófisis	84
4.1.6. <u>Vía nigro-estriada</u>	
4.1.6.1. Medida de la actividad Tirosina hidroxilas "in vivo" en estriado y sustancia negra	86
4.1.6.2. Estudio de la cantidad de enzima Tirosina hidroxilasa en estriado y sustancia negra	88
4.2. "Actividad molecular" de la enzima Tirosina hidroxilasa en diferentes centros del SNC durante el envejecimiento	90
4.3. Medida de la cantidad de neurofilamentos y glía en diferentes centros del SNC durante el envejecimiento	92
4.3.1. Bulbo olfatorio	92
4.3.2. Colículo superior	94
4.3.3. Hipocampo	96
4.3.4. Corteza prefrontal	98
4.3.5. Eje hipotalámico-hipofisario	100
4.3.6. Vía nigro-estriada	103

4.4. Determinación del contenido de grupos carbonilos de homogenados de proteínas de diferentes centros del SNC durante el envejecimiento	105
4.4.1. Bulbo olfatorio	105
4.4.2. Colículo superior	105
4.4.3. Hipocampo	106
4.4.4. Corteza prefrontal	106
4.4.5. Vía nigro-estriada	111
4.5. Determinación de grupos carbonilos de la enzima Tirosina hidroxilasa en sustancia negra durante el envejecimiento	113
4.6. Estudio de los efectos de la oxidación "in vitro" sobre la actividad Tirosina hidroxilasa, el contenido de grupos carbonilos de homogenados de proteínas y el contenido de grupos carbonilos de la enzima Tirosina hidroxilasa	115
4.6.1. Medida de la actividad Tirosina hidroxilasa "in vivo" en homogenados de estriado tras oxidación	115
4.6.2. Medida de grupos carbonilos en homogenados de estriado tras oxidación	116
4.6.3. Medida de grupos carbonilos de la enzima Tirosina hidroxilasa de estriado tras oxidación	116
4.7. Tratamiento con deprenilo en animales viejos. Estudio en la vía nigro-estriada	119
4.7.1. Medida de la actividad Tirosina hidroxilasa "in vivo"	119
4.7.2. Medida de la cantidad de enzima Tirosina hidroxilasa	121
4.7.3. Medida de la cantidad de neurofilamentos y glía	123
4.7.4. Determinación del contenido de grupos carbonilos de homogenados de proteínas	125
4.7.5. Determinación del contenido de grupos carbonilos de la enzima Tirosina hidroxilasa en sustancia negra	126

4.8. Determinación de los niveles plasmáticos de IGF-I en ratas viejas tratadas con deprenilo	128
5. DISCUSION	
5.1. Actividad Tirosina hidroxilasa y cantidad de enzima en diferentes centros del SNC	131
5.2. Variaciones de la actividad Tirosina hidroxilasa y de la cantidad de enzima durante el envejecimiento	132
5.3. Variaciones de la cantidad de neurofilamentos y glía durante el envejecimiento	134
5.4. Determinación de grupos carbonilos y daño oxidativo	135
5.5. Posible inactivación de la enzima Tirosina hidroxilasa en sustancia negra	136
5.6. Importancia del proceso de envejecimiento en sustancia negra	137
5.7. Efecto del tratamiento con deprenilo	141
6. CONCLUSIONES	147
7. BIBLIOGRAFIA	149

1.INTRODUCCION

1.1.RADICALES LIBRES Y ENVEJECIMIENTO.

El envejecimiento es un fenómeno universal. Kohn (1985) y Upton (1977) definen el envejecimiento como la acumulación de cambios responsables de las alteraciones que acompañan a la edad avanzada y del progresivo aumento de las posibilidades de enfermedad y muerte. A pesar de que existen numerosas observaciones clínicas y biológicas acerca de los cambios producidos durante el envejecimiento, la comprensión de sus causas y de los mecanismos por los cuales se produce no queda esclarecida totalmente, dando lugar a controversias debido, quizás, a las numerosas teorías descritas sobre dicho proceso.

Entre las teorías existentes destacan la Teoría Genética (Hayflick, 1987) la cual considera el envejecimiento y la longevidad como fenómenos genéticamente programados; la Teoría de Orgel (1963) considera que errores en la transferencia de información génica conducen a la síntesis de proteínas anormales. Estas dos teorías estarían relacionadas ya que los errores génicos podrían ser el resultado de un programa génico determinado. Otra teoría de gran importancia es la Teoría de los Radicales Libres (Harman, 1956). Esta teoría postula que el envejecimiento es causado por reacciones mediadas por radicales libres que ocurren al azar y de manera no específica, originando un cúmulo de daños en las moléculas biológicas.

Los radicales libres son átomos o moléculas extremadamente reactivas que poseen un electrón desapareado en un orbital externo. La enorme reactividad de los radicales libres se debe a la inestabilidad de su configuración electrónica, tendiendo siempre a captar de otras moléculas el electrón que les falta para alcanzar la estabilidad.

En los radicales libres oxigenados este electrón se localiza en un átomo de oxígeno. Estos radicales libres de oxígeno, en particular el anión superóxido O_2^- , se producen de manera constante en el organismo teniendo algunos efectos beneficiosos como por ejemplo poder bactericida, pero también son altamente perjudiciales a nivel celular y molecular. La extrema reactividad de los radicales libres hace que estos

ocasionen importantes desordenes moleculares. Cuando un radical reacciona con otro compuesto no radical, se generan más radicales libres produciéndose reacciones en cadena. Este fenómeno de propagación se produce sobre los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos de las membranas biológicas (Esterbauer y col., 1975), lo cual aumenta el estado de oxidación celular debido a la producción de peróxidos lipídicos, aldehidos (dialdehido malónico, 4-hidroxinonenal), dienos conjugados, hidrocarburos (etano, metano) y compuestos fluorescentes (lipofuscina). La peroxidación de lípidos de membrana altera la función, estructura y fluidez de la membrana (Alvarez y col.,1993) provocando alteraciones en el flujo de calcio (Bast y Goris, 1989).

Los radicales libres también actúan sobre polisacáridos (despolimerización de ácido hialurónico), producen alteraciones en moléculas como el colágeno, (LaBella y Paul, 1965; Dunn y col., 1991) y causan daños en el DNA, donde pueden dar lugar a deleciones cromosómicas o a una aberrante expresión génica que conduzca a la muerte celular (Freeman y Crapo, 1982; Ritcher y col.,1988). El DNA mitocondrial se encuentra más afectado lo que contribuye a aumentar una incorrecta expresión génica con la edad (Cutler, 1991).

Sobre las proteínas, originan modificaciones en algunos aminoácidos (Met, Trp, His, Cys) que son cruciales para determinadas funciones enzimáticas (Gordillo y col.,1991). Además pueden formar puentes y fragmentar cadenas polipeptídicas.

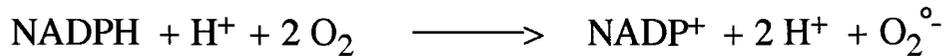
El daño producido por radicales libres en la función celular está asociado a un gran número de enfermedades propias de la edad: artritis, distrofia muscular, disfunción pulmonar, desórdenes neurológicos (Parkinson, Alzheimer), arteriosclerosis (Del Maestro, 1980) y algunos tipos de cánceres (Sun, 1990).

Nuestro organismo posee diferentes mecanismos de formación de radicales libres así como mecanismos naturales para la defensa y control de los daños producidos por estos radicales.

Entre los diferentes mecanismos de formación de radicales libres que se encuentran en el organismo destacamos:

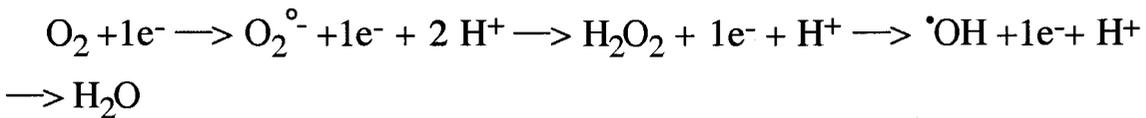
A.- Mecanismos enzimáticos.

-Activación de la NADPH oxidasa.



Esta reacción tiene lugar cuando los fagocitos son estimulados por péptidos bacterianos, constituyendo un mecanismo de defensa contra bacterias.

-Reducción del oxígeno a agua en el sistema mitocondrial.



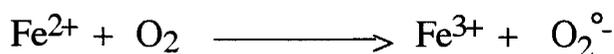
- Formación de radical hidroperoxilo (R-OO^o) debido a la actividad enzimática ciclooxygenasa o lipooxygenasa.

B.- Mecanismos no enzimáticos.

-Activación fotoquímica del O₂ : conduce a la formación de oxígeno singlete (¹O₂), el cual no es un radical libre y por lo tanto, posee un menor efecto tóxico. También puede generarse en la descomposición no enzimática del radical hidroperoxilo (R-OO^o)

- Radiolisis del agua : origina radicales hidroxilos ^oOH. Este radical es mucho más reactivo que el radical superóxido.

- Reacción de Haber-Weiss. Es una reacción secundaria a la formación de radical superóxido y de agua oxigenada, la cual se ve favorecida por la presencia de cationes (Fe²⁺, Fe³⁺) (Aust y col., 1985).



$$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2^{\circ-} \longrightarrow \text{OH}^- + \text{OH}^{\circ} + \text{O}_2$$
 (Reacción de Haber-Weiss)

- El H₂O₂ también puede reaccionar no enzimáticamente con iones ferroso y cúprico: Reacción de Fenton (Halliwell y Guterridge, 1984).



- Formación incontrolada de radicales alcoxilos (R-O°) e hidroperoxilos (R-OO°), secundaria a la producción de superóxido y al metabolismo de algunos xenobióticos.

Frente a esta producción permanente de radicales libres, nuestro organismo presenta sistemas de protección entre los que distinguimos:

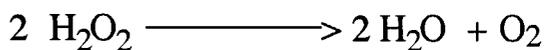
A- Mecanismos enzimáticos.

- Superoxido dismutasa (SOD) y catalasa.

Respecto a la familia de SOD, estas metaloproteínas aceleran de 10^4 a 10^5 veces la dismutación espontánea del O_2° según la siguiente reacción:



Las células eucariotas presentan dos tipos de SOD: una SOD que contiene cobre y zinc, localizada en el citosol (Tyler, 1975) y otra que contiene manganeso, localizada en la matriz mitocondrial (Baum y Scandalios, 1979). La reacción catalizada por la SOD conduce a la formación de H_2O_2 , la cual es eliminada por la catalasa.



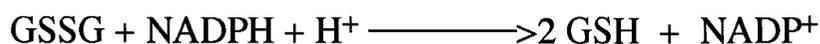
El papel de la catalasa es limitado, ya que sólo está presente en hematíes y peroxisomas.

-Glutation peroxidasa.

La responsable de la eliminación del agua oxigenada de forma más general es la glutacion peroxidasa Se dependiente (Se-GPx) (Jocelyn, 1972). Esta enzima está constituida por cuatro subunidades idénticas, cada una de las cuales posee un átomo de Se.



El glutacion reducido se genera por acción de la glutacion reductasa.



B.- Mecanismos no enzimáticos.

- Vitamina E (α -tocoferol).

Por su liposolubilidad, (de Duve y Hayaishi, 1978) elimina los radicales R-OO^o formados en los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares.

- Sistemas naturales encargados de la eliminación del radical hidroxilo.

Son mucho menos conocidos, destacan el ácido úrico (Ames y col., 1981; Peden y col., 1990) el glutatión, la taurina, la vitamina C e incluso la glucosa. También ciertas proteínas plasmáticas transportadoras de metales podrían contribuir a la protección global del organismo fijando algunos cationes (Fe^{2+} , Fe^{3+}) implicados en la activación del oxígeno o en la reacción de Haber-Weiss, donde se generan radicales hidroxilos. En general, los niveles de antioxidantes varían de un tejido a otro, entre distintas especies y con la edad (Pérez-Campo y col., 1990; Rao y col., 1990; Sohal y col., 1990 a,b).

Cuando existe un desequilibrio entre los sistemas de producción de especies reactivas y los sistemas de control de las mismas, se dice que el tejido está sometido a estrés oxidativo.

El estrés oxidativo se caracteriza por:

-Pérdida de sustancias reductoras: ascorbato, glutatión, tocoferol.

-Cambios en el estado redox celular, aumentando la razón glutatión oxidado/glutatión reducido.

-Peroxidación de lípidos, oxidación de proteínas, daños en el DNA.

1.2. OXIDACION DE PROTEINAS Y ENVEJECIMIENTO.

Durante el envejecimiento se acumulan proteínas alteradas, que van aumentando en cantidad a medida que la célula va envejeciendo. El estudio de distintas proteínas alteradas con la edad (Machado y col., 1983) pone de manifiesto que existen unas propiedades que cambian con la edad y otras que permanecen invariables. Entre las propiedades que no sufren cambios o sus cambios son poco significativos, podemos citar: el peso molecular, los aminoácidos inicial y final de la cadena polipeptídica, la

carga eléctrica, el comportamiento electroforético de dichas proteínas en geles y el patrón de inmunodifusión. Entre las propiedades que se alteran con mayor frecuencia, con la edad, podemos citar: la sensibilidad al calor, la actividad específica, las propiedades espectrales, la degradación por proteasas y la inmunotitulación (Gershon y Gershon, 1970; Oliver y col., 1987a). Estos datos apuntan a que las alteraciones que sufren las proteínas durante el envejecimiento deben ser producidas con posterioridad a la traducción, o sea, por modificaciones post-traduccionales y que no son la consecuencia de la acumulación de errores en la transferencia de información génica tal y como postula Orgel.

Actualmente se han descrito numerosas modificaciones químicas que se producen en las proteínas con posterioridad a su síntesis. Estas modificaciones post-traduccionales pueden ser:

- a) Enzimáticas.
- b) No enzimáticas.

De estos dos posibles tipos de modificaciones post-traduccionales que se pueden dar en los seres vivos, el que parece tener una mayor repercusión sobre el envejecimiento, son las modificaciones no enzimáticas. Entre éstas, las que actualmente se consideran más importantes son la oxidación y la glucosilación.

Los trabajos llevados a cabo por Stadman y colaboradores (1983; 1990) ponen de manifiesto el efecto inactivador que sobre muchas enzimas producen una gran variedad de sistemas oxidativos. En estos estudios, también se ha observado que la inactivación por oxidación hace a las enzimas más susceptibles a la degradación proteolítica. La degradación de numerosas proteínas implica generalmente dos pasos (Levine y col, 1981): en el primero, la enzima es oxidada a una forma catalíticamente inactiva. Se oxidan aminoácidos por la acción combinada de hierro y de agua oxigenada, dando lugar a derivados carbonílicos. En el segundo paso, la forma oxidada es degradada rápidamente por proteasas intracelulares. (Figura 1) Así, para la enzima glutamina sintetasa de *E. coli*, se ha comprobado que su inactivación está producida por la conversión de His²⁶⁹ en Asn (Farber y Levine, 1986) y de Arg³⁴⁴ en un derivado del semialdehído glutámico (Climent y col., 1989). Estos dos residuos están situados en uno de los dos sitios de unión del metal al centro catalítico de

la enzima (Almassy y col., 1986). La susceptibilidad de la enzima al siguiente paso de degradación por proteasas, está asociada con la modificación de un segundo residuo de His (Sahakian y col., 1991), el cual está situado en el segundo sitio de unión del metal a la enzima (Almassy y col., 1986).

Se ha podido comprobar que las enzimas alteradas que se acumulan durante el envejecimiento, son altamente sensibles a los sistemas de oxidación catalizados por metales (MCO), que juegan un papel importante en el turnover de proteínas y en la acumulación de proteínas oxidadas, las cuales podrían estar altamente implicadas en el proceso de envejecimiento (Stadman, 1992) y es por eso por lo que se propone que los cambios producidos con la edad en estas proteínas sean el resultado de daños ocasionados por radicales libres de oxígeno (Oliver y col., 1981; Stadman, 1986) y la acumulación de proteínas dañadas en el envejecimiento sea debida a un aumento en el nivel de radicales libres o a una pérdida en la capacidad de degradación de proteínas oxidadas (Stadman, 1986; Levine, 1990).

Los residuos aminoacídicos se oxidan generando derivados carbonílicos, luego el contenido en carbonilos de las proteínas puede ser usado como medida del daño producido en las mismas por procesos de oxidación. Se han desarrollado procedimientos altamente sensibles para la detección y cuantificación de grupos carbonilos (Levine, 1990). Por medio de estas técnicas, se ha visto que hay un pequeño aunque significativo aumento de proteínas oxidadas (contenido en carbonilos) en función de la edad celular en eritrocitos humanos (Oliver y col., 1987b). Estos mismos autores encuentran que el contenido en carbonilos de cultivos humanos de fibroblastos dérmicos aumenta exponencialmente con respecto a la edad del donador de fibroblastos, siendo también más alto en individuos con envejecimiento prematuro (Progeria y síndrome de Werner) con respecto a individuos normales. Relaciones similares entre la edad y el aumento de grupos carbonilos se han encontrado en el lóbulo occipital del cerebro humano (Smith y col., 1991), en el cristalino del ojo humano (Garland y col., 1988) y en hepatocitos de rata (Starke-Reed y Oliver, 1989).

Por otra parte, cambios observados con la edad en la oxidación de proteínas van acompañados de un descenso progresivo en la actividad

proteasa alcalina neutra (Smith y col., 1991; Starke-Reed y Oliver, 1989; Carney y col., 1991). Esta enzima es capaz de degradar formas oxidadas de enzimas, pero carece de capacidad para degradar formas no oxidadas (Rivett, 1985). Esto apunta la posibilidad de que la acumulaci3n de prote3nas dañadas en individuos viejos sea el resultado de una disminuci3n en la degradaci3n de las mismas.

1.3. FORMACION DE GRUPOS CARBONILOS EN PROTEINAS.

Como mencionabamos anteriormente, algunos amino3cidos son convertidos en derivados carbon3licos por radicales libres de ox3geno, radiaciones ionizantes, metales catalizadores de oxidaci3n y ozono. Los radicales libres de ox3geno est3n implicados en la producci3n de carbonilos como lo indican numerosos estudios. Por ejemplo, en hepatocitos de rata los grupos carbonilos aumentan 3,3 veces cuando las ratas se exponen al 100% de ox3geno durante 48 horas (Starke-Reed y col., 1987).

La oxidaci3n directa de amino3cidos no es la 3nica v3a por la que pueden formarse carbonilos en las prote3nas; la glucosilaci3n implica la interacci3n de az3cares reductores con el grupo E-amino de la lisina para formar bases de Schiff, las cuales sufren una reacci3n de Amadori para formar cetoaminas (Harding, 1985; Cerami y Crabb, 1986; Cerami y col., 1986) (Figura 2)

Alternativamente el az3car puede ser oxidado a cetoaldehido que puede reaccionar con la lisina formando bases de Schiff (Wolff y Dean, 1987). Los productos de glucosilaci3n dan lugar a pigmentos marrones fluorescentes de estructura desconocida llamados productos de Maillard, cuya concentraci3n se ha visto que aumenta con la edad del animal (Monnier, 1990; Cerami y col., 1987).

Los radicales libres en su actuaci3n sobre los acidos grasos poliinsaturados dan lugar a aldehidos α,β - insaturados, especialmente 4-hidroxinonenal, el cual reacciona con grupos sulfhidrilos de prote3nas mediante una adici3n de Michael dando lugar al tioeter estable que posee un grupo carbonilo. Mediante ese mismo mecanismo puede reaccionar

también con histidina y lisina formando aductos que poseen grupos carbonilos. (Figura 3)

Esto podría representar el 10% el contenido en grupos carbonilos que se encuentra en hepatocitos de rata con el envejecimiento.

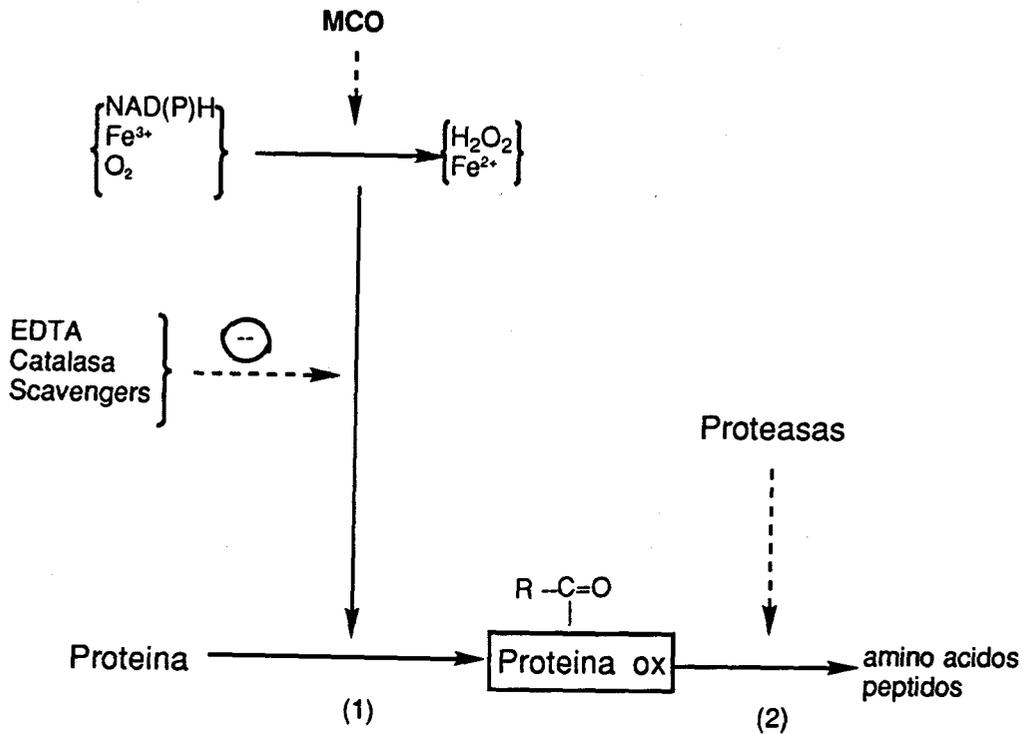


Figura 1. Mecanismo de degradación de enzimas por acción de radicales libres. En el primer paso la enzima es oxidada a una forma catalíticamente inactiva. En el segundo paso la forma oxidada es degradada por proteasas intracelulares.

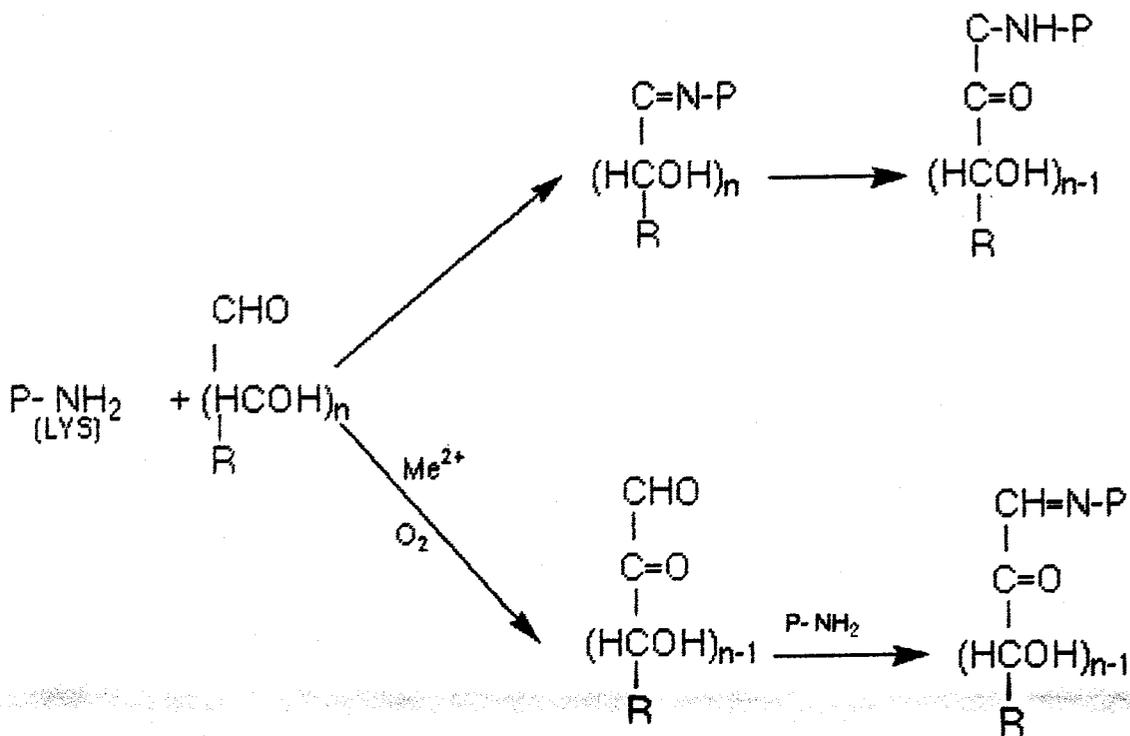


Figura 2. Formación de grupos carbonilos en las proteínas por glucosilación. Abreviaturas : P-NH₂ (grupo ε-amino de residuos de lisina); Me²⁺ (catión divalente)

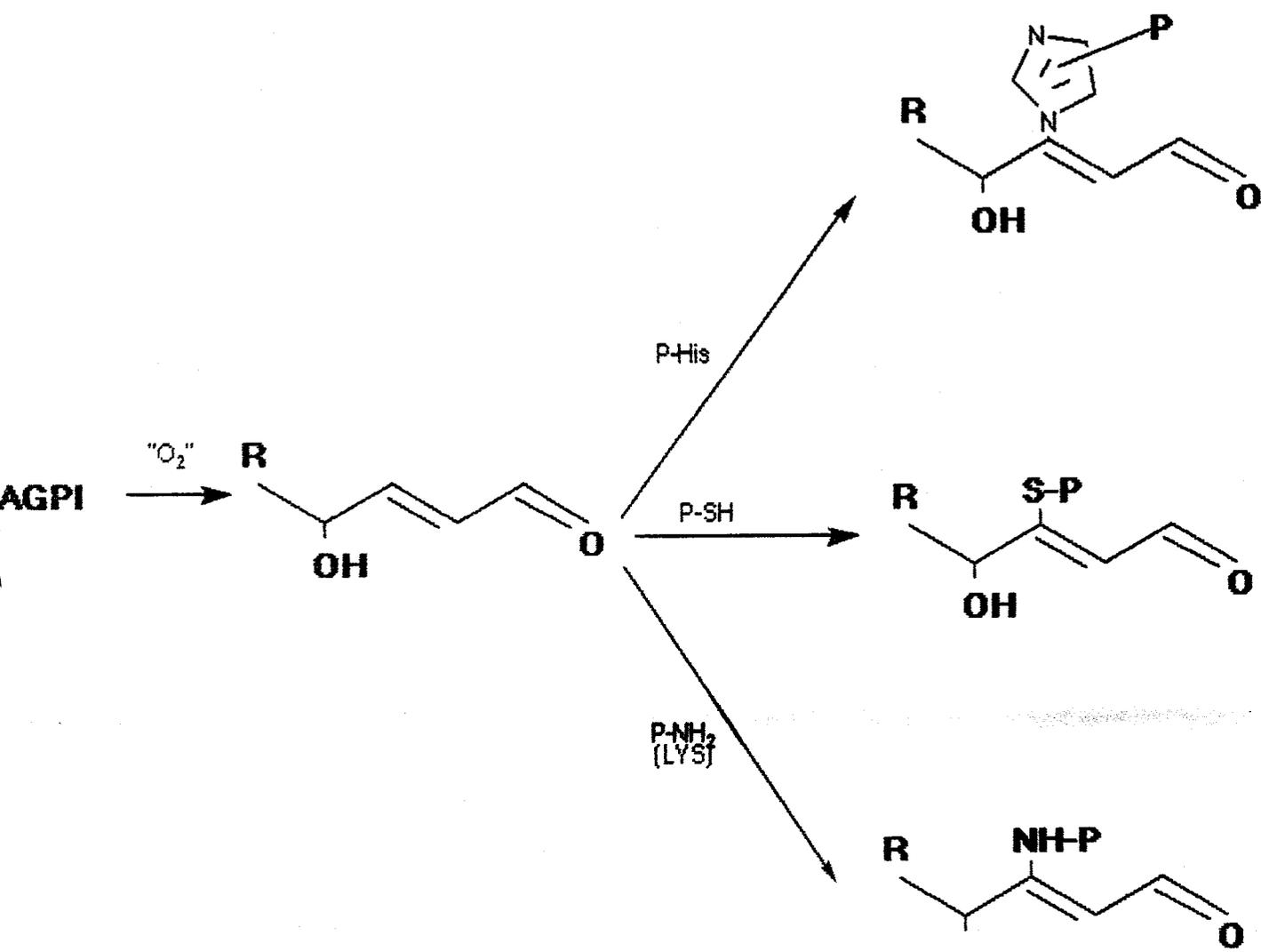


Figura 3. Formación de grupos carbonilos en las proteínas por reacción con aldehidos $\alpha\beta$ -insaturados. Abreviaturas : AGPI (ácidos grasos poliinsaturados); "O₂" (radicales libres oxigenados); P-NH₂ (grupo ε-amino de residuos de lisina); P-SH (grupos sulfhidrilos de residuos de cisteína); P-His (residuos de histidina)

1.4. METABOLISMO DE CATECOLAMINAS

Según su estructura química, las catecolaminas son compuestos que poseen un grupo catecol (anillo benceno con dos sustituyentes hidroxilos adyacentes) y un grupo amino. Los neurotransmisores que presentan dicha estructura son dopamina (DA), noradrenalina (NA) y adrenalina (A).

La biosíntesis de las catecolaminas está determinada por cuatro enzimas (Figura 4): Tirosina hidroxilasa (TH) (EC.1.14.16.2); L-aminoácido aromático descarboxilasa (L-AADC) (EC.4.1.1.28); dopamina β -hidroxilasa (DBH) (EC.1.14.17.1) y feniletanolamina-N-metil transferasa (PNMT) (EC.2.1.1.28.).

Las neuronas adrenérgicas son las únicas que poseen las cuatro enzimas. Las neuronas dopaminérgicas carecen de DBH y PNMT, siendo la DA el producto final. En neuronas noradrenérgicas la DA es sólo un metabolito intermedio que aparece a muy baja concentración. Estas células carecen de PNMT y el producto final es la NA.

La síntesis de catecolaminas se inicia en el aminoácido tirosina (Tyr). Este se encuentra disponible en los depósitos tisulares y llega al cerebro con el flujo sanguíneo. Atraviesa la barrera hematoencefálica mediante un transportador. Ya en las neuronas catecolaminérgicas se transforma en 3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), por hidroxilación en la posición 3 del anillo fenilo. Esta reacción está catalizada por la enzima tirosina hidroxilasa (Tirosina-3-monooxigenasa). Para llevarse a cabo se requiere un cofactor pterínico reducido y oxígeno molecular. Dicha reacción es el paso limitante de la síntesis de catecolaminas. De ella y de la enzima TH hablaremos más detalladamente en el apartado siguiente.

El segundo paso de esta ruta es la conversión de L-DOPA en DA mediante descarboxilación, reacción catalizada por la enzima L-AADC. Esta enzima es piridoxal fosfato dependiente pero no es específica ni en cuanto a los sustratos que utiliza ni en cuanto a su localización (Lovenberg y col.,1962), ya que también puede encontrarse en neuronas serotoninérgicas donde descarboxila el 5-hidroxitriptófano (5-HTP) para

formar serotonina (5-HT), otro neurotransmisor de gran interés en el SNC. Además también aparece en otros órganos como riñón e hígado.

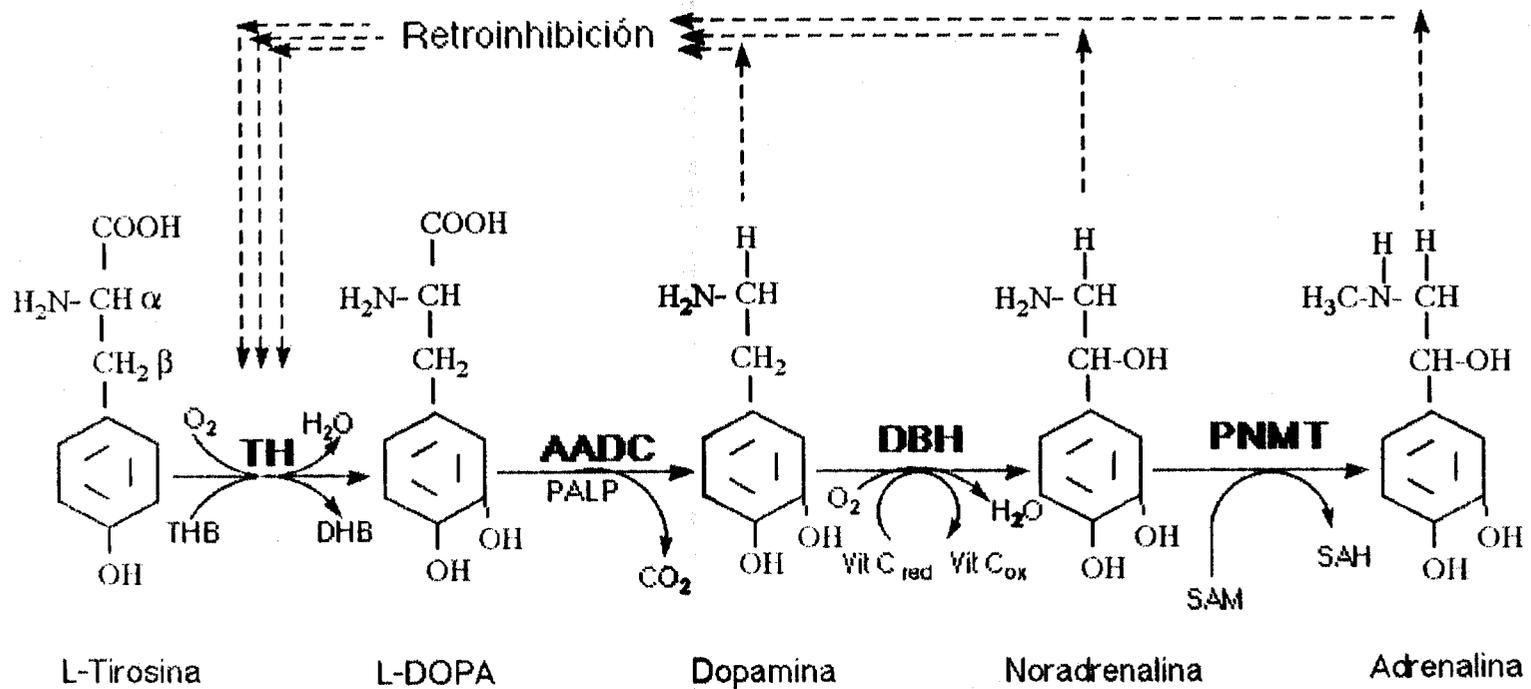


Figura 4. Síntesis de catecolaminas. Abreviaturas: L-DOPA (L-hidroxifenilalanina); TH (tirosina hidroxilasa); AADC (aminoácido aromático descarboxilasa); DBH (dopamina-β-hidroxilasa); PNMT (feniletanolamin-N-metiltransferasa); THB (tetrahidrobiopterina); DHB (dihidrobiopterina); SAM (S-adenosilmetionina); SAH (S-adenosilhomocisteina); PALP (piridoxalfosfato).

La síntesis de NA se realiza a partir de DA en neuronas noradrenérgicas, en nervios simpáticos periféricos y en células de la médula adrenal. La reacción está catalizada por la enzima dopamina β -hidroxilasa (dopamina β -monooxigenasa), la cual hidroxila la cadena etilamina de la DA. Esta enzima depende de cobre, por lo tanto, puede ser inhibida por agentes quelantes. También utiliza oxígeno molecular y ácido ascórbico como donador de electrones.

La A se sintetiza a partir NA en células de la médula adrenal y en neuronas adrenérgicas centrales, mediante la enzima PNMT. Esta enzima cataliza la metilación de la NA utilizando S-adenosilmetionina.

Una vez sintetizados, los neurotransmisores se almacenan en vesículas sinápticas (Glowinski e Iversen, 1966), de esta forma quedan protegidos de la degradación intraneuronal.

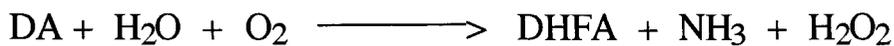
En cuanto al mecanismo de liberación de los neurotransmisores de las vesículas sinápticas, existen varias teorías. Uvnas y Aborg (1987) propusieron que la liberación de histamina y de catecolaminas se producía debido a un intercambio catiónico amina⁺ \leftrightarrow Na⁺, lo cual provocaría la liberación fraccional del neurotransmisor. Otra teoría sugiere que el responsable es el Ca²⁺, el cual abre canales de K⁺ presentes en la membrana de las vesículas, provocando la lisis de las mismas (Stanley y Ehrenstein, 1985). Por otra parte, la liberación de catecolaminas está regulada por autorreceptores, que se encuentran situados en la membrana de la terminal presináptica, mediante un mecanismo de retroalimentación (Wolf y Roth, 1987).

El neurotransmisor tras ser liberado al espacio sináptico puede ser recaptado por la terminal presináptica. El mecanismo de recaptación depende de Na⁺ y obtiene la energía necesaria del gradiente iónico de Na⁺ y K⁺ que circula a través de la membrana celular (Horn, 1979; Ross, 1987). Este mecanismo no es selectivo para un único neurotransmisor, pero la recaptación de DA puede diferenciarse de la de NA en la distinta especificidad con que pueden ser inhibidas por los antidepresivos

tricíclicos. Por ejemplo, la maprotilina inhibe selectivamente la recaptación de NA (Richelson y Phening, 1984).

En cuanto a la degradación de catecolaminas, tanto DA como NA pueden degradarse por dos rutas diferentes. En cada una de estas dos vías participan las mismas enzimas, solo que lo hacen en orden diferente. Ambas pueden ser metabolizadas por la enzima monoamino oxidasa (MAO) (EC. 1.4.3.4.) o por la catecol orto metil transferasa (COMT) (EC.2.1.1.6.).

En el caso de la DA, la MAO cataliza su desaminación oxidativa dando lugar al 3,4-dihidroxifenilacetaldehido (DHFA) mediante la siguiente reacción:



En dicha reacción vemos como el turnover de DA está estequiométricamente ligado a la formación de peróxido de hidrógeno y éste puede reaccionar con iones ferrosos generando el radical hidroxilo (reacción de Fenton).

Se distinguen dos tipos de MAO, llamados A y B que se diferencian por su preferencia por determinados sustratos, su sensibilidad a inhibidores específicos y su localización (Jonhston, 1968). La MAO-A es de localización intraneuronal y la MAO-B se encuentra mayoritariamente en la glía (Jarrot e Iversen, 1971; Yu, 1986). La DA puede ser metabolizada por ambos tipos de MAO. EL DHFA formado por acción de la MAO es muy inestable y es oxidado a ácido por la aldehido deshidrogenasa dando lugar al ácido 3,4-dihidroxifenil acético (DOPAC). El último paso de esta vía lo constituye la acción de la COMT. Esta enzima cataliza la transferencia de grupos metilos a grupos catecoles a partir de S-adenosilmetionina (SAM). Para ello requiere cationes divalentes. La enzima COMT puede encontrarse de forma soluble (S-COMT) o unida a membranas (MB-COMT). Se cree que la S-COMT se localiza principalmente en células gliales y la MB-COMT en neuronas (Kaakola y col.,1987). La acción de esta enzima sobre el DOPAC genera ácido homovanílico (HVA).

Esta vía degradativa puede ocurrir tanto de forma intraneuronal, tras la recaptación del neurotransmisor, como extraneuronalmente en células gliales.

Si sobre la DA actúa primeramente la COMT se forma 3-metoxitiramina (3-MT) el cual es metabolizado por la MAO dando lugar al 3-metoxi-4-hidroxifenilacetaldehído (MHFA) que es rápidamente oxidado hasta ácido homovanílico (HVA) por la aldehído deshidrogenasa. Esta vía ocurre enteramente de forma extraneuronal. La figura 5 muestra un esquema de la síntesis y degradación de la DA.

En el caso de la NA, si en primer lugar es metabolizada por la MAO, se forma el aldehído del ácido 3,4-dihidroximandélico (AADM), el cual puede ser metabolizado por la aldehído reductasa dando lugar al 3,4-dihidroxifenilglicol (DHPG) o por la aldehído deshidrogenasa originando ácido 3,4-dihidroximandélico (ADM). La acción de la COMT sobre el DHPG genera 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG) y sobre el ADM produce ácido vanilmandélico (VMA).

Si la NA es metabolizada por la COMT se forma normetanefrina (NMN). Sobre la NMN actúa la MAO dando lugar al aldehído del ácido 3-metoxi-4-hidroximandélico (AAMHM). Este compuesto puede ser metabolizado bien por la aldehído reductasa formando MHPG o bien por la aldehído deshidrogenasa dando VMA. La figura 6 muestra un esquema de la síntesis y degradación de la NA.

Tanto el MHPG como el VMA en el caso de la NA, y el HVA en el caso de la DA, son conjugados como sulfatos y glucuronatos y eliminados por la orina. La sulfatación de estos compuestos está catalizada por la enzima fenol sulfotransferasa (PST; EC.2.8.2.1.) que sulfata en la posición 3 del anillo aromático (Roth, 1984).

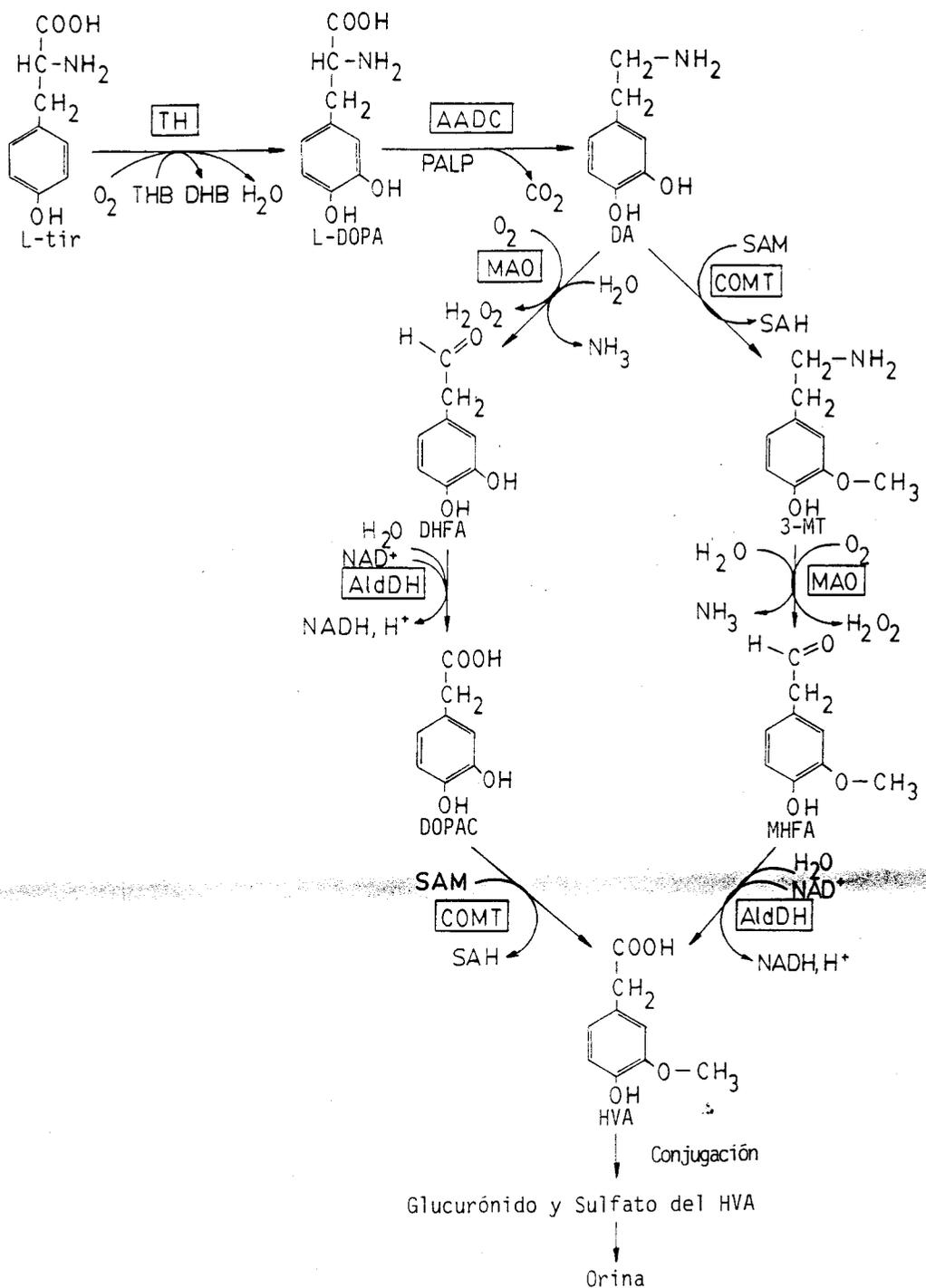


Figura 5. Síntesis y degradación de la dopamina (DA).
 Abreviaturas: **TH** (tirosina hidroxilasa); **AADC** (aminoácido aromático descarboxilasa); **MAO** (monoamino oxidasa); **COMT** (catecol-O-metil transferasa); **AldDH** (aldehído deshidrogenasa); **Tir** (tirosina); **L-DOPA** (L-hidroxifenilalanina); **DHFA** (3,4-dihidroxiacetaldéido); **DOPAC** (ácido 3,4-dihidroxiacetato); **3-MT** (3-metoxitiramina); **MHFA** (3-metoxi-4-hidroxiacetaldéido); **HVA** (ácido homovanílico); **THB** (tetrahidrobiopterina); **DHB** (dihidrobiopterina); **SAM** (S-adenosilmetionina); **SAH** (S-adenosilhomocisteína); **PALP** (piridoxalfosfato).

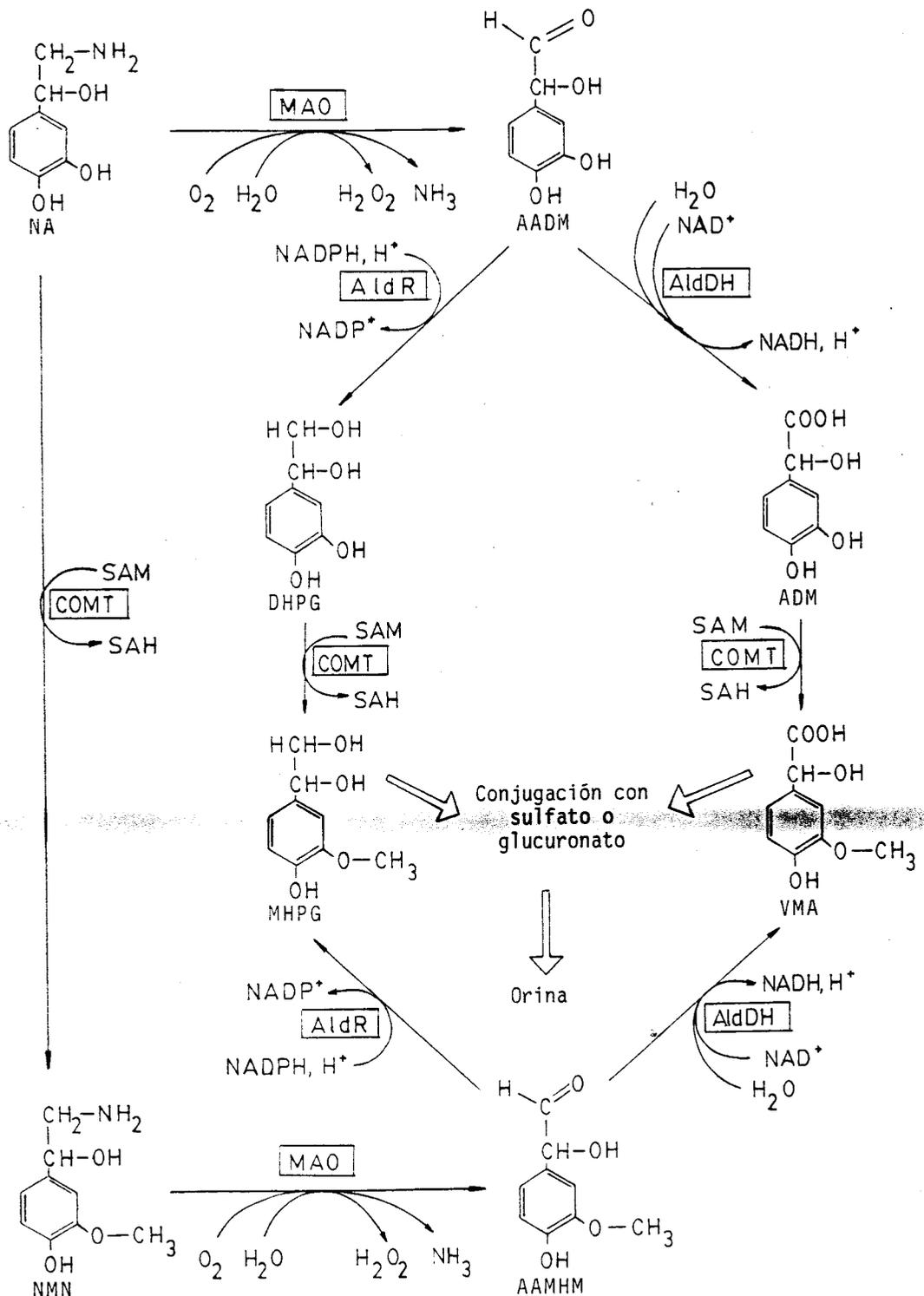
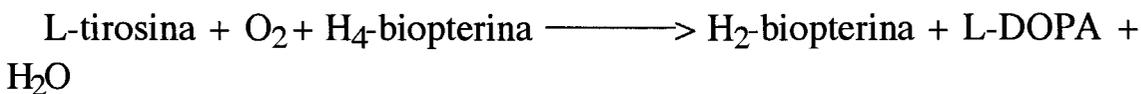


Figura 6. Síntesis y degradación de noradrenalina (NA).
 Abreviaturas: **MAO** (monoamino oxidasa); **COMT** (catecol-O-metil transferasa); **AldDH** (aldehyde deshidrogenasa); **AldR** (aldehyde reductasa); **NMN** (normetanefrina); **AADM** (aldehyde del ácido 3,4-dihidroxifenilglicol); **ADM** (ácido dihidroximandélico); **DHPG** (3,4-dihidroxifenilglicol); **MHPG** (3-metoxi-4-hidroxifenilglicol); **VMA** (ácido vanillimandélico); **AAMHM** (aldehyde del ácido 3-metoxi-4-hidroximandélico); **SAM** (S-adenosilmetionina); **SAH** (S-adenosilhomocisteina); **PALP** (piridoxalfosfato).

1.5. TIROSINA HIDROXILASA.

En 1953 Udenfriend y Wyngaarden proponen que la tirosina es convertida en L-DOPA por una reacción enzimática, pero la demostración directa de la hidroxilación de la tirosina a L-DOPA no se vio hasta 10 años más tarde, gracias al grupo de Nagatsu (1964).

La tirosina hidroxilasa es una monooxigenasa que cataliza la formación de L-3,4 dihidroxifenilalanina (L-DOPA) a partir de L-tirosina en neuronas catecolaminérgicas centrales y periféricas, en ganglios simpáticos, en células cromafines de la médula adrenal y en células PC12 de feocromocitoma de rata (Nagatsu y col., 1964) mediante la siguiente reacción :



Utiliza tirosina como sustrato, requiere oxígeno molecular para su actividad y un cofactor pterínico reducido (6R)-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina (BH₄). En la reacción el cofactor es oxidado a dihidrobiopterina (BH₂), la cual es de nuevo reducida a tetrahidrobiopterina por la enzima dihidropteridina reductasa (Kaufman, 1977). En la oxidación del cofactor se forma un producto intermedio, 4- α -hidroxitetrahidrobiopterina, el cual se deshidrata espontáneamente para formar BH₂ (Dix y col., 1987; Haavick y Flatmark, 1987). La enzima muestra la máxima actividad a pH 6.

La actividad TH puede ser inhibida por catecolaminas. La inhibición por L-DOPA no es competitiva con respecto a los tres reactivos. La inhibición por dopamina es competitiva con respecto al cofactor pero no competitiva con respecto a tirosina (Udenfriend y col., 1965; Nagatsu y col., 1972). Esta interacción competitiva entre dopamina y cofactor sugiere que ambos se unen al mismo punto de la enzima.

La enzima contiene hierro, necesario para su actividad (Kaufman, 1974; 1978), siendo catalíticamente activa cuando el hierro está como

Fe^{2+} . La forma enzimática de Fe^{3+} puede ser reducida a Fe^{2+} por el cofactor. Las catecolaminas se unen fuertemente a la TH cuando el hierro está como Fe^{3+} formando complejos de un color azul verdoso característico (Anderson y col., 1988), que es inactivo.

Se ha propuesto que la inhibición de la TH por catecolaminas puede ocurrir por dos mecanismos posibles: 1) unión de catecolaminas impidiendo el acceso del cofactor y 2) estabilización de la forma enzimática de Fe^{3+} por unión de catecolaminas (Anderson y col., 1988).

Varios autores sugieren que la concentración de cofactor en células adrenérgicas está por debajo de la saturación para la enzima. Los valores de la K_m de la TH para el cofactor varían dependiendo del estado de activación de la enzima, de la fracción subcelular en la cual se examine la actividad, del tipo de cofactor utilizado y del pH del ensayo. Lo mismo ocurre con respecto a la concentración de sustrato, pero ésta normalmente es saturante.

La enzima está presente en todas las células que sintetizan catecolaminas siendo la médula adrenal, el tejido con mayor contenido de TH. Por esta razón, la glándula adrenal o tumores derivados de ella han sido frecuentemente utilizados para la purificación de la enzima.

En cuanto a la localización subcelular de la enzima, un gran número de estudios sugiere que se encuentra en el citoplasma y también unida a membranas (Kuczenski y Mandell, 1972). Estas formas muestran diferente afinidad por el cofactor pterínico y diferente sensibilidad a la inhibición por dopamina. En el estriado la forma unida a membrana tiene valores de K_m y K_i menores que la forma soluble. En estudios de enzima purificada a partir de células PC12 de rata, la mayor actividad TH se encuentra en la forma soluble (Andersson y col., 1992). La funcionalidad de la forma unida a membrana no está clara. Se piensa que pueda estar asociada a vesículas sinápticas o a la membrana plasmática en los sitios de liberación de neurotransmisores (Stephens y col., 1981; Morita y col., 1987).

En cuanto a las propiedades moleculares de la enzima, se ha visto por centrifugación en gradiente de sacarosa que la forma nativa es un tetrámero de subunidades idénticas (Vrana y col., 1981), cada una de ellas de peso molecular alrededor de 60.000 daltons (Vulliet y Weier,

1981). No se sabe claramente si la especies activas de TH son tetraméricas y si las formas monoméricas o diméricas poseen o no actividad catalítica. En base a la secuencia del cDNA, el peso molecular del monómero de la TH de rata es de 55.903 daltons (Grima y col., 1985). Estudios con TH purificada de células PC12 lo confirman (Andersson y col., 1992) y mediante técnicas de electroforesis bidimensional estiman su pI en aproximadamente 6,3. La secuencia de amino ácidos muestra gran homología con la de la fenilalanina hidroxilasa (Kwok y col., 1985; Dahl y Mercer, 1986) y la de la triptofano hidroxilasa (Grenett y col., 1987), enzimas que también utilizan tetrahidrobiopterina como cofactor y oxígeno molecular como sustrato.

La enzima de rata ha sido clonada y expresada en cultivos celulares de insectos (Fitzpatrick y col., 1990); además se han encontrado cuatro isoenzimas de TH humana que han sido clonadas y expresadas en células eucariotas (Horellou y col., 1989) y en *E. coli* (Haavik y col., 1991).

La fosforilación parece ser el principal mecanismo que controla la actividad TH a corto plazo. Todos los sistemas de segundos mensajeros (AMPc, Ca^{2+} , diacilglicerol y GMPc) y sus correspondientes quinasas están implicados en esta regulación. Experimentos con enzima purificada han demostrado que la TH es sustrato de la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) (Vulliet y col., 1980); de la proteína quinasa Ca^{2+} /fosfolípido dependiente (PKC) (Albert y col., 1984); proteína quinasa Ca^{2+} /calmodulina dependiente (Vulliet y col., 1984) y de la proteína quinasa dependiente de GMPc (Roskoski y col., 1987).

Vulliet y colaboradores (1980) formulan la hipótesis de que existen dos formas de TH, una de alta K_m , la cual representa a la enzima no fosforilada y otra de baja K_m que corresponde a la enzima fosforilada. Por otra parte, Markey y colaboradores (1980) observan un aumento de la K_i de la enzima fosforilada para catecoles, además de un descenso en la K_m para el cofactor, resultados que han sido recientemente confirmados por Pasqualini y colaboradores (1994).

Al ser la TH sustrato de cuatro proteínas quinasas diferentes, se piensa que tiene varios sitios de fosforilación. Según Campbell y colaboradores (1986), la serina 40 sería el principal sitio de fosforilación para la proteína quinasa dependiente de AMPc. Los últimos estudios indican que son las serinas 8, 19, 31 y 40 las implicadas en la fosforilación de la TH

en tejidos de rata intactos y que estímulos fisiológicos incrementan la incorporación de ^{32}P en las tres últimas (Haycock, 1990; Haycock y Haycock, 1991). La fosforilación de estos sitios está regulada por vías de señales intracelulares diferentes en tejidos catecolaminérgicos de rata (Haycock, 1993). La Ser¹⁹ vía proteína quinasa Ca²⁺/ Calmodulina dependiente, la Ser³¹ mediante la proteína quinasa Ca²⁺/ fosfolípido dependiente y la Ser⁴⁰ a través de la proteína quinasa dependiente de AMPc.

Si se digiere la TH con tripsina resulta un fragmento de peso molecular 34.000, (que probablemente sea el extremo C-terminal del monómero), el cual contiene hierro y posee actividad enzimática, pero sin embargo, no se activa por fosforilación (Hoeldtke y Kaufman, 1977; Abate y Joh, 1991). Estos datos sugieren que la porción C-terminal de la enzima es el dominio catalítico (aminoácidos 158-491) y que la porción N-terminal es el dominio regulador, (aminoácidos 1-157), el cual contiene los sitios de fosforilación y mantiene a la enzima en una forma menos activa, reduciendo la afinidad por los sustratos o dificultando su acceso. La fosforilación de este dominio provoca un cambio conformacional y un cambio en la actividad. Se ha comprobado que la porción C-terminal es la que presenta homología en la secuencia con fenilalanina hidroxilasa y triptófano hidroxilasa.

También puede hablarse de una regulación de TH a largo plazo. En ella el descenso o aumento en la actividad TH puede ser debido a cambios en la cantidad de enzima. Esto incluiría cambios en su síntesis, la cual está regulada a nivel de transcripción, o/y cambios en su degradación.

De esta manera, asumiendo que toda la TH de un determinado tipo de células tiene similar actividad específica e inmunoreactividad, los cambios en los niveles de enzima pueden ser medidos por cualquier tipo de inmunoreacción cuantitativa. En este sentido ha sido orientado nuestro trabajo.

1.6. TIROSINA HIDROXILASA Y ENVEJECIMIENTO.

Diversos autores han puesto de manifiesto un descenso de la transmisión dopaminérgica durante el proceso normal de envejecimiento (McGeer y McGeer, 1976 a,b; McGeer y col., 1977; Coté y Kremzner, 1983). Este es

debido a la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la vía nigroestriada observada tanto en humanos (McGeer y col., 1989) como en animales de experimentación (Tatton y col., 1991a). En dichas neuronas tiene lugar la síntesis de catecolaminas, cuyo paso inicial está catalizado por la enzima TH, como mencionábamos anteriormente.

Nuestro estudio se centra principalmente en sustancia negra y estriado, ya que los trabajos publicados sobre estos dos centros son escasos y contradictorios. Algunos de ellos ponen de manifiesto una disminución de la actividad tirosina hidroxilasa en ratas de 3 a 27 meses de edad en estriado(). En cuanto a humanos se han publicado datos tanto de mantenimiento de la actividad TH durante el envejecimiento (McGeer y McGeer, 1976), como de disminución (Coté y Kremzner, 1974). El mismo tipo de estudio realizado en animales de experimentación indica un mantenimiento de la actividad TH durante el envejecimiento tanto en rata como en ratón (Reiss y col.,1977).

Por el contrario, estudios más recientes ponen de manifiesto una disminución de la actividad TH en estriado, sistema límbico e hipotálamo de ratas viejas. Esta disminución es dependiente del sexo según el área cerebral (Fernandez-Ruiz y col., 1992).

En cuanto al contenido de enzima TH, tampoco se observan cambios en caudado de individuos de edades comprendidas entre 15 y 63 años (Wolf y col.,1991). Sin embargo, mediante estudios inmunocitoquímicos, se ha observado que el número de células TH positivas es mayor en sustancia negra de ratones de 8 semanas de edad que en ratones de 104 semanas de edad (Tatton y col.,1991b), pero al estudiar la actividad TH en dichas células se observa que se mantiene. Mediante microscopía electrónica se ha podido observar que las neuronas TH positivas de ratas jóvenes conservan intactos los orgánulos celulares mientras que en ratas viejas dichas neuronas presentan cambios degradativos como la aparición de elementos gliales, inclusiones y figuras de mielina (Ichitani y col.,1990).

1.7. DEGENERACION NEURONAL

Las neuronas son células especialmente vulnerables al ataque por radicales libres, y una disminución en los mecanismos protectores o una exposición excesiva a los mismos conduce a la muerte neuronal.

Dentro del cerebro, los radicales libres oxigenados dañan células del endotelio capilar que contribuyen a mantener la homeostasis de electrolitos y de agua (Lo y col.,1986) y alteran la fluidez de las membranas (Villacara y col.,1989). Ya que la función neuronal depende significativamente de la integridad de la membrana celular y de las membranas de orgánulos subcelulares, si éstas están dañadas se altera la transmisión sináptica.

Por otra parte, el cerebro presenta un alto nivel de ácidos grasos poliinsaturados, y esto lo hace más susceptible al daño por radicales. La mayoría de las últimas investigaciones se han centrado en el estudio del daño que producen los radicales libres sobre los fosfolípidos, principales constituyentes de las membranas biológicas.

Procesos de peroxidación lipídica serían los que conducen a la muerte neuronal observada en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson (Dexter y col.,1989), tras periodos de isquemia y reperfusión (Traystman y col.,1991) e incluso en el proceso de envejecimiento normal (Harman, 1987; Pryor, 1987).

La enfermedad de Alzheimer es otra patología en la que se observa una acelerada pérdida de neuronas en regiones específicas de la corteza (Mann y col.,1985), hipocampo (Ball y col.,1985) y ciertos núcleos subcorticales (Whitehouse y col.,1982). Esta pérdida neuronal va acompañada de la aparición de estructuras neurofibrilares anormales, "tangles", y de placas seniles que contienen proteína β A4 amiloide (Tomlinson y Corsellis, 1984). Por otra parte, la proteína β -amiloide puede tener acción neurotóxica (Yanker y col.,1989, 1990).

En las regiones afectadas el número de sinapsis está reducido (Davies y col., 1987; Masliah y col.,1993; Terry y col.,1991). Las causas de la atrofia neuronal y muerte celular observadas en la enfermedad de Alzheimer no son bien conocidas. Además de la peroxidación lipídica (Harman, 1993) y de las alteraciones de membrana mencionadas anteriormente (Bosman y col.,1991; Farooqui y col.,1988), parece estar

alterada la homeostasis del calcio (Mattson y col.,1993), el sistema lisosomal (Nixon y col.,1992) y el citoesqueleto (Kosik y col., 1986).

Estos hechos podrían considerarse también causantes de degeneración neuronal en el proceso de envejecimiento.

Los principales componentes del citoesqueleto neuronal son microtúbulos, microfilamentos y neurofilamentos. Los neurofilamentos son los filamentos mayoritarios de las neuronas maduras. Están constituidos por tres subunidades de peso molecular 68 kDa, 160 kDa y 200 kDa, las cuales pueden ser detectadas mediante anticuerpos específicos. La cantidad de neurofilamentos es un índice de supervivencia neuronal. En un trabajo muy reciente, Vega y colaboradores (1994) ponen de manifiesto mediante experimentos de inmunocitoquímica un descenso de las tres subunidades de neurofilamentos en corteza cerebral de ratas viejas, sugiriendo que los daños en el citoesqueleto, no se producen únicamente en la demencia senil sino también en el envejecimiento fisiológico. En nuestro trabajo hemos cuantificado mediante E.L.I.S.A. neurofilamentos en distintas estructuras cerebrales de ratas de distintas edades como indicativo de la pérdida neuronal que acompaña al proceso de envejecimiento.

Otro índice de degeneración neuronal es la medida de la cantidad de glía. Tanto en la enfermedad de Alzheimer como en el envejecimiento se producen unas lesiones cerebrales características que son la placas seniles y los "tangles" neurofibrilares. Las placas seniles están formadas por un centro de proteína β A4 amiloide rodeado por un anillo de astrocitos reactivos y elementos neuronales degenerativos (Wisniewski y Terry, 1973; Wisniewski e Iqbal, 1980). La astrogliosis reactiva es la principal reacción de los astrocitos adyacentes al sitio dañado (Eng, 1987). Se caracteriza por un aumento en los niveles de proteína ácida de glía (principal proteína de los filamentos de las células gliales) (Eng, 1985) y por hipertrofia de los astrocitos. Mediante procedimientos de inmunomarcaje se ha observado un aumento de proteína ácida de glía en tinciones de astrocitos en el envejecimiento normal (Hansen y col., 1987), pero este aumento es mucho mas acusado en la enfermedad de Alzheimer (Duffy y col., 1980; Mancardi y col., 1983). Se sabe que la proliferación de células gliales tiene lugar como respuesta a una gran variedad de alteraciones del SNC, entre ellas la perdida neuronal. Por lo tanto, hemos

considerado importante cuantificar glía de la misma manera que neurofilamentos para ver si ambos procesos van acompañados en las distintas áreas cerebrales estudiadas.

1.8. ENFERMEDAD DE PARKINSON

La enfermedad de Parkinson es un desorden neurodegenerativo progresivo de los ganglios basales. Los síntomas principales de esta enfermedad son rigidez muscular, temblor en reposo e incapacidad para iniciar el movimiento o aquinesia. Los exámenes "post-mortem" de los cerebros de enfermos de Parkinson muestran un gran número de anormalidades neuroquímicas e histológicas. La más importante es la degeneración de las neuronas pigmentadas de la sustancia negra compacta (SNc) (Hirsch y col., 1988) y la disminución de la liberación de DA en el estriado desde las terminales nerviosas de la vía nigroestriada. La muerte celular va acompañada de inclusiones eosinofílicas llamadas "cuerpos de Lewy" (Jellinger, 1986).

La etiología del Parkinson es aún desconocida, pero se han formulado numerosas hipótesis. Así, se ha relacionado con factores hereditarios (Ward y col., 1983; Johnson y col., 1990) y con factores medioambientales. Estudios epidemiológicos como los de Barbeau (1985), o los de Tanner (1989) llevan a la conclusión de que factores tóxicos presentes en el medio ambiente, aumentan la incidencia de la enfermedad. Calm y Langston (1983) propusieron que es la combinación de factores medio ambientales junto con el envejecimiento normal lo que conlleva a la degeneración de neuronas dopaminérgicas observada en la enfermedad de Parkinson. Eldridge y Rocca (1985), insisten en el nivel de incidencia de la enfermedad en individuos viejos. Por otra parte, está descrito un descenso en el número de células que contienen DA en la sustancia negra con la edad, con lo cual, cabe pensar que un proceso de envejecimiento acelerado podría disminuir el número de neuronas hasta un nivel a partir del cual se iniciaría la enfermedad (McGeer y col., 1989). Sin embargo, el patrón de degeneración celular que ocurre en la sustancia negra durante el envejecimiento normal, es distinto al observado en enfermos de Parkinson

(Fearnely y Lees 1991). En la patología del Parkinson la pérdida neuronal es más acusada en la región ventrolateral, mientras que en el envejecimiento normal, la más afectada es la parte dorsal.

Una teoría más reciente, está basada en que la pérdida de neuronas dopaminérgicas puede ser debida al metabolismo cerebral normal, el cual va produciendo radicales libres, induciendo de este modo un estado de estrés oxidativo que favorecería el desarrollo de la enfermedad (Fanh, 1989; Olanow, 1990; Jenner, 1991). En el estrés oxidativo las reacciones de oxidación celular promovidas por la producción de H_2O_2 y radicales libres sobrepasarían la capacidad de protección de los mecanismos antioxidantes.

La sustancia negra podría ser una estructura particularmente vulnerable a los procesos oxidativos ya que en ella se dan una serie de características que los favorecen: alta actividad MAO, acumulación de hierro, procesos de autooxidación y presencia de neuromelanina (Fanh y Cohen, 1992).

Como hemos mencionado con anterioridad, en el catabolismo normal de la dopamina se generan radicales libres debido a la acción de la MAO. Por otra parte, la autooxidación de la DA hasta neuromelanina genera quinonas y semiquinonas que son tóxicas (Graham, 1978).

Además en la sustancia negra de enfermos de Parkinson se ha visto un aumento en la concentración de hierro, lo cual favorece la formación de radicales hidroxilos mediante reacciones del tipo Fenton o Haber-Weiss (Youdim, 1988) y un aumento de neuromelanina. Es por esto, por lo que el estrés oxidativo está altamente relacionado con la enfermedad de Parkinson ya que son precisamente las neuronas pigmentadas de la sustancia negra las dañadas en esta enfermedad. Esta teoría también está apoyada por la observación de que la peroxidación lipídica en la sustancia negra de enfermos de Parkinson se encuentra aumentada unas 10 veces con respecto a controles (Dexter y col., 1989).

La hipótesis de los radicales libres ha llevado al estudio de los mecanismos protectores frente a oxidaciones. Sin embargo, diferentes autores muestran distintos resultados cuando valoran los niveles de glutatión, catalasa y glutatión peroxidasa (Ambani y col., 1975; Kish y col., 1985; Perry y Yong, 1986; Marttila y col., 1988; Johanssen y col., 1991). Riederer y colaboradores (1989) encontraron una disminución en

el nivel de glutatión en sustancia negra de parkinsonianos que está relacionada con el estado de la enfermedad.

La acumulación y generación de especies oxidantes puede afectar particularmente a la función mitocondrial y a la producción de energía (Di Monte y col., 1992). Esto estaría de acuerdo con los estudios sobre la actividad enzimática SOD, en los que se observa una disminución de actividad en la fracción mitocondrial de la enzima en pacientes de Parkinson pero no en la citosólica ni en la SOD total (Saggu y col., 1989). Además los niveles de NADH citocromo c reductasa están disminuidos (Schapira y col., 1989), pero no los de succinato citocromo c reductasa, que no muestran cambios. El complejo I NADH Co-Q10 reductasa también se encuentra disminuido en parkinsonianos con respecto a individuos sanos (Schapira y col., 1990a). Esta deficiencia podría ser debida a la acumulación de toxinas endógenas.

Se han realizado numerosos estudios en animales para contribuir al esclarecimiento de las posibles causas de esta enfermedad. Estos estudios se han basado en producir degeneración de las neuronas dopaminérgicas mediante tóxicos selectivos como 6-hidroxdopamina (6-OHDA) y 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP). El MPTP produce Parkinson en humanos (Langston y col., 1983) y en animales de experimentación (Burns y col., 1983; Langston y col., 1984). El MPTP tras atravesar la barrera hematoencefálica es metabolizado por la MAO-B formándose 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) acumulándose en la mitocondria e inhibiendo la cadena respiratoria a nivel del complejo I (Nicklas y col., 1985; Ramsay y col., 1986). Esta misma anomalía se ha observado en la sustancia negra de enfermos de Parkinson.

La terapia con L-DOPA, precursor de la dopamina, o agonistas dopaminérgicos puede paliar la pérdida de dopamina mejorando los síntomas de la enfermedad, especialmente la rigidez y la aquinesia, aunque no evita la progresión de la degeneración celular. Si consideramos que procesos oxidativos están implicados en la aparición de la enfermedad de Parkinson, hay que tener en cuenta que la terapia con levodopa puede inducir estrés oxidativo por formación de peróxido de hidrógeno y

radicales libres. En este sentido se están aplicando terapias con antioxidantes tales como α -tocoferol o con inhibidores de la MAO-B como el deprenil o selegilina, los cuales contribuyen a disminuir el estrés oxidativo.

1.9.DEPRENILO.

El deprenilo (fenilisopropil-N-metilpropinilamina) fue descubierto en Hungría en el año 1961 por Z. Ecseri y J. Knoll, como una mezcla racémica de dos isómeros ópticamente activos (+) y (-) deprenilo a la cual se le dio el nombre de E-250. Mas tarde, consiguieron separar los dos isómeros ópticos. La forma L resultó ser la menos tóxica y a ella se le dio el nombre de (-) deprenilo o selegilina.

El deprenilo fue descrito como un inhibidor irreversible de la enzima MAO (Knoll y col., 1965). En 1968 Johnston diferenció dos formas de esta enzima, MAO-A y MAO-B, las cuales eran inhibidas selectivamente por clorgilina y deprenilo respectivamente. Estas dos enzimas también presentan sustratos específicos: 5-HT y A para la MAO-A y feniletilamina (PEA), benzilamina y metilhistamina para la MAO-B. Tiramina, octopamina, DA, NA y triptamina pueden ser sustratos para ambos tipos de MAO (Glover y col., 1986).

Encontramos actividad MAO en la mayoría de los tejidos, pero está ausente en el músculo esquelético y en las células rojas de la sangre. En cuanto a la distribución de los dos tipos de MAO, ésta sufre grandes variaciones dependiendo del tejido y de la especie. En humanos la mayor actividad MAO se encuentra en el hígado en el que ambos tipos, A y B están en la misma proporción. En el intestino el 75% de actividad MAO es del tipo A, mientras que en plaquetas casi exclusivamente es del tipo B. En cerebro humano el 70% de actividad es MAO-B, a diferencia de cerebro de rata en donde la mayor proporción es MAO-A (Oreland y col., 1983; Stenström y col., 1987).

La MAO-A se localiza intraneuronalmente y la MAO-B en células gliales. En cerebro humano, la MAO-A predomina en los cuerpos celulares noradrenérgicos del locus ceruleus y la MAO-B en estructuras serotoninérgicas (Konradi y col., 1988). En sustancia negra la actividad MAO es debida a la de las células gliales (Riederer y col., 1986).

Está descrito que en varias regiones cerebrales y en plaquetas la actividad MAO aumenta con la edad (Robinson y col., 1972; Fowler y col., 1980). Venero y colaboradores (1991) no encuentran cambios significativos en la MAO-A en estriado de ratas viejas, pero sí un incremento en la actividad MAO-B. Este aumento puede ser debido a un aumento de las células gliales con la edad (Oreland y col., 1980), el cual es más pronunciado aún en algunas enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (Jossan y col., 1990).

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). Los inhibidores no específicos de la MAO potencian los efectos de la tiramina provocando crisis hipertensivas lo cual obliga a una restricción dietética de los alimentos ricos en tiramina como el queso. El deprenilo, al ser un inhibidor selectivo de la MAO-B, a dosis terapéuticas está libre de este efecto adverso conocido como "efecto del queso" lo cual favorece su utilización en clínica.

El deprenilo es transportado de forma similar a las sustancias fisiológicas a través de los axones neuronales. En la terminal sináptica no moviliza los neurotransmisores de sus lugares de almacenamiento, por lo que el deprenilo no actúa como agente liberador.

La DA en cerebro humano es metabolizada por la MAO-B (Glover y col., 1980). La concentración de DA en pacientes parkinsonianos tratados con deprenilo es del 40-50% más alta que en no tratados (Riederer y col., 1978). Estudios "in vivo" con ratas demuestran que el tratamiento con deprenilo aumenta la concentración de DA en estriado (Knoll, 1983; Zsilla y col., 1986) y disminuye la concentración de sus dos metabolitos mayoritarios, HVA y DOPAC (O'Regan y col., 1987).

En otros estudios se ha visto que el deprenilo inhibe la captación de DA en cortes de estriado de rata tras el tratamiento continuo con dosis de 0,25 mg/kg. Este efecto parece ser reversible, ya que deja de observarse

cuando se administran dosis únicas (Zsilla y col., 1986). Por otra parte, se ha descrito que el deprenilo aumenta el turnover de DA y que la clorgilina lo disminuye (Zsilla y col., 1982; Knoll 1983). Esto sugiere que el deprenilo inhibe los receptores presinápticos de DA y de este modo aumenta su síntesis (Knoll, 1987).

El deprenilo potencia y prolonga la acción de la L-DOPA, permitiendo reducir las dosis de ésta (Golbe, 1988; Chrisp y col., 1991). En estudios sobre enfermos de Parkinson a los que solamente se administró deprenilo, se observó una mejoría de los síntomas sobre todo de la hipoquinesia, pero este efecto no se mantuvo sin la utilización de L-DOPA (Málly, 1991), a pesar de que el deprenilo sí puede retrasar la necesidad de utilización de L-DOPA (Myllyla y col., 1991). Al comparar enfermos tratados únicamente con L-DOPA, con otros tratados con L-DOPA más deprenilo, se vio que el número de neuronas de la sustancia negra era mayor en los pacientes que recibían deprenilo, además era menor el número de cuerpos de Lewy encontrados por neurona (Rinne y col., 1991). Esto indica que el deprenilo podría tener un efecto neuroprotector. También Knoll (1992, 1993) ha observado que el deprenilo puede prevenir los cambios estructurales que se producen en los gránulos de melanina de neuronas de la sustancia negra debido a la edad.

Ultimamente se han realizado numerosos estudios en animales. Knoll y colaboradores (1989), han mostrado que la vida media en ratas podía aumentar aproximadamente un año con tratamiento continuo con deprenilo. Por otra parte, Carrillo y colaboradores (1990) han encontrado un aumento de las actividades enzimáticas SOD y catalasa en ratas tratadas con deprenilo. Este aumento era selectivo para determinadas regiones cerebrales (Carrillo y col., 1992) y también se observaba en ratas viejas tratadas con deprenilo (Carrillo y col., 1993; Carrillo y col., 1994).

El deprenilo, por inhibición de la MAO-B, puede prevenir el Parkinson causado por MPTP en roedores (Heikkila y col., 1984; Hess, 1989) y en primates (Cohen y col., 1985), ya que puede evitar la conversión del MPTP en su metabolito activo MPP⁺. También puede disminuir la formación de peróxido de hidrógeno asociada al catabolismo de la DA (Cohen y Spina, 1989), y de esta manera disminuir la muerte neuronal causada por radicales libres.

Todas estas acciones implican un aumento de la transmisión dopaminérgica en cerebro, lo cual ha permitido que el deprenilo sea utilizado con éxito en el tratamiento de la fase temprana de la enfermedad de Parkinson.

La eficacia como antidepresivo del deprenilo está muy discutida (Mendis y col., 1981; Mann y col., 1982; Mendlewicz y col., 1983). En los últimos años se ha propuesto para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, ya que se ha visto que mejora las deficiencias en las funciones cognitivas de los pacientes (Fowler, 1982; Tariot y col., 1987 a, b; Piccinin y col., 1990; Agnoli y col., 1990). La MAO-B juega un papel fundamental en la modulación del tono monoaminérgico, y su hiperactividad podría influir negativamente en funciones cognitivas como atención y memoria. Según esto, una terapia con inhibidores de la MAO-B podría considerarse adecuada.

Por otro lado, la DA tiene un papel importante en el control de la secreción adenopituitaria de algunas hormonas como prolactina (PRL) y hormona del crecimiento (GH). Tratamientos prolongados con deprenilo reducen significativamente los niveles de PRL en plasma (Mendlewicz y Yodium, 1977), aunque esto no está confirmado por otros investigadores (Wajsbort y col., 1982).

También se ha observado un aumento en la actividad sexual en ratas tratadas con deprenilo (Knoll y col., 1989), pero estos resultados no han sido confirmados en primates (Chambers y col., 1989). En un reciente trabajo, Knoll y colaboradores (1994) describen que el tratamiento crónico con dosis bajas de deprenilo mejora la actividad sexual, el aprendizaje y alarga la vida de la rata.

El deprenilo es rápidamente absorbido en el tracto gastrointestinal (Magyar y Tothfalusi, 1984) y su concentración máxima aparece de media hora a dos horas después de su administración oral. Al ser una sustancia lipofílica básica, es distribuida rápidamente por todo el cuerpo penetrando fácilmente en los tejidos. A concentraciones terapéuticas, el 94% del deprenilo se une a proteínas plasmáticas, siendo más fuerte su unión a macroglobulinas que a la albúmina (Szoko y col., 1984; Kalasz y col., 1990). Atraviesa rápidamente la barrera hematoencefálica debido a su baja polaridad.

El deprenilo es metabolizado a (-)-desmetildeprenilo y 1-(-)-metanfetamina, los cuales pueden ser convertidos en (-)-anfetamina y su correspondiente metabolito p-hidroxilado (Yoshida y col., 1986). La hidroxilación es seguida de conjugación con el ácido glucurónico. El metabolismo parece ser dependiente del citocromo P-450 microsomal.

Es muy importante la estereoselectividad de los metabolitos del deprenilo (Ariens, 1986). Todos son de la forma 1-(-) y no ha sido detectada transformación racémica (Scachter y col., 1986; Meeker y Reynolds, 1990). Las formas (-) tienen un efecto estimulador más débil sobre el sistema nervioso central.

Los efectos del deprenilo son totalmente diferentes a las típicas respuestas de las anfetaminas, por lo tanto no dependen de las propiedades farmacológicas de sus metabolitos anfetamínicos.

Los beneficios clínicos del deprenilo no están únicamente asociados con su efecto inhibitorio sobre la MAO-B. Así por ejemplo, con dosis de 1 mg/día en humanos se puede conseguir una inhibición casi total (70-100%) de la actividad MAO-B en plaquetas. Sin embargo, esta dosis es insuficiente para detectar mejorías en enfermos de Parkinson, en los cuales la dosis administrada es de 10 mg/día (Oreland y col., 1983; Teychenne y col., 1989). El deprenilo puede tener otros mecanismos de acción los cuales aún son desconocidos y son objeto de estudio en las investigaciones actuales.

1.10. HORMONA DE CRECIMIENTO, IGF-I Y ENVEJECIMIENTO

Otro aspecto del envejecimiento es la observación de una disminución de la masa corporal. Esto refleja procesos atróficos del músculo esquelético, hígado, riñón, bazo, piel y huesos (Rudman, 1985). Recientemente se ha propuesto que una disminución de la disponibilidad de la hormona de crecimiento podría contribuir a tales cambios (Rudman, 1985; Meites 1988).

La hormona de crecimiento (GH), también llamada hormona somatotrópica o somatotropina es secretada por la hipófisis anterior o adenohipófisis. Es una proteína de cadena única de peso molecular 22.005 daltons. Provoca el crecimiento de los tejidos corporales, aumenta el volumen celular y favorece la mitosis, con el consecuente desarrollo de mayor número de células. Principalmente aumenta los depósitos de proteínas del organismo, ya que estimula el transporte de aminoácidos a través de las membranas celulares, estimula la síntesis de proteínas por los ribosomas, aumenta la transcripción de DNA y disminuye el catabolismo de proteínas y aminoácidos. Además conserva los carbohidratos y favorece el empleo de los depósitos de grasa.

La regulación de la secreción de GH es compleja, ya que los niveles de esta hormona pueden aumentar o disminuir en el plazo de minutos. Depende del estado nutricional de la persona y del estado de estrés. Se sabe que esta hormona es secretada en pulsos y que su secreción se incrementa de forma característica durante las dos primeras horas de sueño profundo. Estas fluctuaciones dificultan el proceso de medida.

La concentración plasmática normal de GH en adultos es de cerca de 3 nanogramos por mililitro y en niños de 5 nanogramos por mililitro.

Se ha observado que la GH no actúa de manera directa sobre el cartílago y el hueso, sino que lo hace a través de proteínas más pequeñas llamadas somatomedinas. Las somatomedinas actúan como factores mediadores de la acción de la GH. Estos factores han sido caracterizados como IGF-I e IGF-II, denominación que les viene de "insulin-like growth factor", ya que constituyen una familia de hormonas peptídicas de bajo peso molecular, aproximadamente 7.500 daltons, relacionadas estructuralmente con la insulina (Rinderknecht y Humbel, 1978; Froesch y Zapf, 1985). El IGF-II muestra una menor dependencia de la GH que el IGF-I

La secreción de GH puede ser medida indirectamente midiendo las concentraciones plasmáticas de IGF-I o somatomedina C, la cual es liberada por el hígado (Moses y col.,1979; Schwander y col.,1983; Lund y col.,1986; Murphy y col.,1987) en respuesta a la liberación de GH. Apenas existen variaciones diurnas en la concentración plasmática de IGF-I, ni relacionadas con factores nutricionales, estrés o ejercicio. Su medida es un indicador de la secreción de GH (Clemmons y Van Wyk, 1984).

Se sabe que a partir de los 30 años la secreción de GH por la hipófisis tiende a disminuir (Rudman, 1985; 1981; Finkelstein, 1972). Esto se atribuye a incapacidad de la glándula pituitaria. Los pulsos espontáneos de GH están marcadamente reducidos en ratas viejas (Sontag y col.,1980, 1982; Takahashi y col.,1987). Debido a este pulsátil patrón de secreción, la reducción de GH no se observa en determinaciones plasmáticas individuales (Florini y col.,1981). El catabolismo de GH decrece muy poco con el envejecimiento, luego la disminución en los niveles de GH es debida a una disminución en su secreción. La concentración plasmática de IGF-I también decrece con la edad en adultos sanos (Rudman 1985, 1981; Florini y col.,1985) y en animales. Takahashi y colaboradores (1987b) muestran que el tratamiento con GH exógena aumenta los niveles plasmáticos de IGF-I en ratas viejas incluso a niveles superiores a los encontrados en animales jóvenes. Sin embargo, dicho tratamiento carece de efecto en animales jóvenes. De la misma manera ocurre en humanos (Rudman y col., 1981).

Las catecolaminas hipotalámicas juegan un papel importante en la regulación de las funciones de la glándula pituitaria y por lo tanto en el declive de numerosas funciones corporales con la edad. En ratas viejas hay un decenso en la secreción de catecolaminas del hipotálamo, especialmente de DA y NA (Meites y col.,1987; Meites, 1988). Esto conduce a una menor liberación de hormona liberadora de GH en el hipotálamo y por tanto una disminución en la secreción de GH por la hipófisis.

Como hemos mencionado anteriormente, los niveles plasmáticos de GH decrecen durante el envejecimiento. Se ha podido comprobar que dos inyecciones diarias de L-DOPA durante 8 días incrementan la secreción de GH en ratas viejas macho hasta los mismos niveles observados en ratas macho jóvenes y promueve la síntesis de proteínas en el músculo diafragma (Sontag y Meites, 1988). Presumiblemente estos mismos efectos pueden ser producidos en animales viejos por la administración de drogas que aumenten las catecolaminas hipotalámicas, tales como el deprenilo.

En cuanto a la relación del deprenilo con cambios en los niveles hormonales, existen muy pocos trabajos. Se ha comprobado que tratamientos prolongados con deprenilo reducen significativamente los niveles plasmáticos de PRL (Mendlewicz y Youdim, 1977), aunque esto

no está confirmado por otros investigadores (Wajsbort y col.,1982). Por otra parte, dosis de 10 mg de deprenilo no modifican los niveles basales de GH. Sin embargo, se ha observado que la premedicación con deprenilo a pacientes que posteriormente fueron tratados con L-DOPA, aumentaba la liberación de GH inducida por la L-DOPA (Hietala y col.,1985) y no estimulaba la liberación de GH en pacientes posteriormente tratados con otros agonistas dopaminérgicos como apomorfina (Koulu y Lammintausta, 1981). Esto indica que el deprenilo no modifica la función de los receptores postsinápticos de DA, los cuales están implicados en la liberación de GH, sino que únicamente aumenta los niveles de DA.

1.11.ASPECTOS ESTRUCTURALES

1.11.1.GANGLIOS BASALES: VIA NIGRO-ESTRIADA

Fisiológicamente, se considera que los ganglios basales comprenden el núcleo caudado, putamen y globo pálido. El caudado y el putamen constituyen el neostriado, que en la rata se denomina "caudoputamen". El globo pálido también se conoce como paleostriado. Además de estos tres, los anatomistas consideran que el claustró y la amígdala son ganglios basales, a pesar de que la función del claustró se desconoce y de que la amígdala funciona como parte del sistema límbico. Por otra parte, la sustancia negra, subtálamo e importantes porciones del tálamo y de la formación reticular operan en estrecha asociación con los ganglios basales, por lo que se consideran parte del sistema de los ganglios basales para el control motor.

Los ganglios basales están ubicados en una de las vías de fibras más importantes del cerebro, llamada cápsula interna, la cual es el principal nexo de comunicación entre la corteza, las regiones más bajas del cerebro y la médula espinal. Así, los ganglios basales funcionan en asociación con la corteza cerebral para el control de actividades motoras y sensitivas. También están implicados en la selección del programa motor, planificación del movimiento, memoria motora y recuperación (Graybiel, 1990).

El estriado está formado por dos compartimentos: estriosomas y matriz. En cada uno de ellos un mismo neurotransmisor puede tener efectos diferentes (Graybiel, 1990). El neostriado colabora junto con la corteza motora en el control de movimientos intencionales toscos que llevamos a cabo normalmente de forma subconsciente.

La sustancia negra se divide en tres partes: parte compacta (SNc), rica en cuerpos neuronales los cuales contienen melanina; parte reticulada (SNr) a donde van la mayoría de las aferencias y parte lateral (SNl).

La figura 7 muestra un esquema de las vías de conexión entre los ganglios basales y estructuras relacionadas.

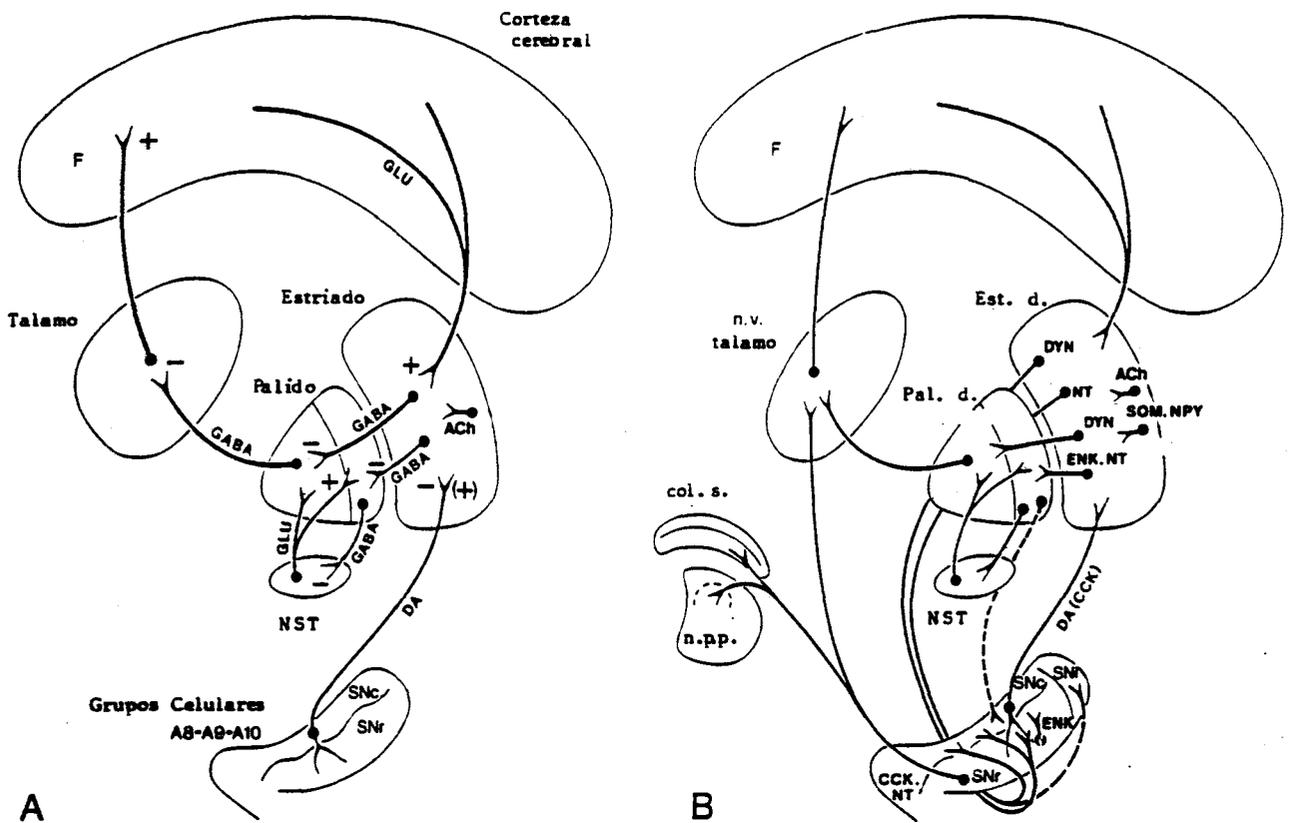


Figura 7. Principales vías que convergen entre la sustancia negra, ganglios basales y estructuras relacionadas. La corteza cerebral proyecta a través de la vía inhibitoria estrío-pálido-talámico, la cual termina de vuelta a la corteza en el lóbulo frontal (F). Este circuito básico está modulado por interneuronas colinérgicas estriales, con participación de los núcleos subtalámicos (NST) y 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 retrorubral, A9 a la SNC y A10 al área ventral tegmental de Tasai). En este circuito además participan los núcleos caudado y putamen (estriado dorsal; **Est.d.**, neoestriado) y el globo pálido (pálido dorsal; **Pal. d.**, paleoestriado), también participan diversas estructuras del sistema límbico (región 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** (sustancia negra parte lateral); **SNr** (sustancia negra parte reticular); **SOM** (somatostatina).

De entre todas las vías de conexión de los ganglios basales, nuestro trabajo se ha centrado en la vía nigro-estriada. Las fibras que nacen en las células de la SNc proyectan hacia el estriado. Estas proyecciones son dopaminérgicas y llegan fundamentalmente a los estriosomas (Graybiel, 1990). El control fino ejercido por las neuronas dopaminérgicas es ejecutado por la liberación de DA en axones terminales y en dendritas que arborizan en la SNr (Geffen y col., 1976; Korf y col., 1976; Cheramy y col., 1981). Esta DA dendrítica juega un papel importante en la plasticidad y regeneración neuronal y en el establecimiento de nuevas sinapsis (Geffen y col., 1976). La SNc también envía axones que inervan el globo pálido (Lindvall y Björklund, 1979)

La vía que se origina en la SNr es considerada principalmente GABAérgica (Oertel y col., 1982). Esta envía fibras al tálamo y a la formación reticular (Beckstead, 1983). Algunas neuronas de la SNr envían axones al colículo superior. Esto indicaría la participación de la SNr en el control de la función visual-motora (Chevalier y col., 1984).

Entre un 30% y un 50% de las células del estriado proyectan a la sustancia negra (Bunney y Aghajanian, 1976); las proyecciones que llegan a la SNc vienen principalmente de los estriosomas, mientras que las que llegan a la SNr lo hacen fundamentalmente desde la matriz (Graybiel, 1990). Los neurotransmisores más importantes de la vía estriado-nigral son: GABA, como neurotransmisor inhibitorio (Fisher y col., 1976); sustancia P (Bolam e Izzo, 1988) como excitatorio; dinorfina (Vicent y col., 1982), la cual tiene efectos variables sobre las neuronas de la SNr (Roberson y col., 1987) y encefalina. Estos neurotransmisores pueden encontrarse juntos en la misma terminal (Reiner, 1986; Besson y col., 1990; Reiner y Anderson, 1990).

El 80% de la vía rafe-estriada es serotoninérgica (Steinbusch y col., 1981). El papel de la 5-HT en el estriado no está totalmente claro. Sí se sabe que está estrechamente relacionada con la DA. Disminuciones de 5-HT aumentan los efectos de agentes dopaminérgicos, mientras que el aumento de 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). La serotonina que llega a la sustancia negra, parece inhibir la actividad de las neuronas dopaminérgicas (Dray y col., 1978).

En los ganglios basales tienen un papel modulador muy importante las interneuronas colinérgicas. Por ejemplo, en el estriado existe un equilibrio entre la DA liberada por las fibras nigroestriales y la acetilcolina liberada por las interneuronas colinérgicas. La pérdida de este equilibrio da lugar a alteraciones como la hiperquinesia que aparece en la Corea de Huntington, enfermedad en la que existe una degeneración de las neuronas GABAérgicas y colinérgicas, lo cual conlleva a una excesiva secreción de DA, o la hipoquinesia del Parkinson, donde los niveles de DA están muy disminuidos.

Una enfermedad resultante del daño en los ganglios basales es la atetosis. Esta cursa con movimientos contorsivos lentos, rítmicos y repetitivos. Es debida a la interrupción de circuitos de retroalimentación entre los ganglios basales, la corteza y el tálamo, por daño en la porción lateral del globo pálido.

El hemibalismo cursa con movimientos violentos de grandes áreas del cuerpo (movimientos balísticos). Este síndrome es el resultado de una gran lesión en el subtálamo contralateral.

Los ganglios basales y en concreto la sustancia negra y el estriado, son centros de interés para nosotros por estar implicados en enfermedades de gran incidencia en individuos viejos como es la enfermedad de Parkinson.

1.11.2. CORTEZA PREFRONTAL E HIPOCAMPO

La corteza prefrontal y el hipocampo son dos estructuras que forman parte del llamado sistema límbico. El sistema límbico es el encargado del control de aspectos emocionales y afectivos y también de funciones relacionadas con el comportamiento.

La corteza prefrontal está relacionada con la capacidad cognitiva y lingüística (de Bruin, 1990) y con determinados comportamientos emocionales. Si se lesiona esta estructura disminuye la capacidad de aprendizaje y se producen cambios en la esfera social y emocional, observándose en la especie humana, apatía a la hora de manifestar afectos, conductas pueriles o euforia (Fuster, 1980).

La corteza prefrontal tiene un alto contenido en NA, 5-HT y en menor proporción DA. La inervación dopaminérgica juega un papel fundamental

en el correcto funcionamiento de la corteza prefrontal, ya que ejerce un papel modulador interaccionando con fibras que salen del tálamo y también llegan a la corteza.

Existen numerosas evidencias que demuestran el papel de la NA y la DA en los procesos de aprendizaje y memoria (Kohler y Lorens, 1978; Normile y Altman, 1988). Se sabe que existe un balance DA/NA necesario para el buen funcionamiento de la corteza prefrontal. Además la estimulación del receptor D2 de DA regula la liberación de NA en esta estructura (Rossetti y col., 1989).

El hipocampo también está relacionado con la capacidad cognitiva. Tiene gran importancia en el control de funciones cerebrales como aprendizaje y memoria. Se cree que el hipocampo interpreta para el cerebro la importancia de la mayor parte de nuestras experiencias sensitivas, para que éstas sean almacenadas como recuerdos en la corteza cerebral.

En el hipocampo se han identificado una gran variedad de neurotransmisores, principalmente acetil colina, ya que recibe la mayoría de la aferencias de las neuronas acetil colinérgicas del septum, GABA, NA, 5-HT y DA (Storm-Mathise, 1978; Bischoff y col., 1979).

Hasta hace pocos años se pensaba que la DA en el hipocampo tenía únicamente el papel de precursor de la NA (Costa y col., 1972). Sin embargo, Bischoff y colaboradores (1979) publicaron la primera evidencia bioquímica del papel de la DA hipocampal como neurotransmisor. A pesar de que la vía dopaminérgica es una vía menor en el hipocampo, está implicada en un gran número de funciones. Se sabe que la DA participa en el proceso de retención de la conducta adquirida (Matthies, 1974).

La corteza prefrontal y el hipocampo están relacionadas con la demencia senil y la enfermedad de Alzheimer. En esta enfermedad están afectados los sistemas colinérgico, noradrenérgico y serotoninérgico. Además de la demencia, tienen lugar numerosas alteraciones degenerativas como hemos mencionado al hablar de degeneración neuronal, en las cuales están implicados los radicales libres. Por todo ello nos ha parecido interesante realizar nuestro estudio en estas estructuras.

1.11.3. BULBO OLFATORIO

El bulbo olfatorio es otra estructura del sistema límbico. Media información sobre comportamientos tales como alimentación, organización social y reproducción.

Es una estructura muy rica en sustancias neuroactivas. Además de encontrar DA, GABA, NA, 5-HT, pueden detectarse gran cantidad de péptidos: carnosina, colecistoquinina, encefalina y sustancia P, entre otros.

1.11.4. COLICULO SUPERIOR

El colículo superior forma parte del conjunto de estructuras cerebrales que componen la vía visual. Está situado en posición rostral al colículo inferior, el cual está implicado en funciones auditivas.

El colículo superior tiene un papel importante en la integración de información visual y no visual (Kassel, 1980), en la orientación espacial (Maeda y col., 1979) y en los movimientos sacádicos de los ojos (Hikosaka y Burtz, 1985).

Recibe proyecciones GABAérgicas, noradrenérgicas y dopaminérgicas. Se cree que el colículo superior puede actuar como una estación de salida en la mediación de ciertas respuestas de comportamiento dependientes de DA en el estriado. Weller y colaboradores (1987) han sugerido que la DA pueda actuar como neurotransmisor en esta estructura.

1.11.5. EJE HIPOTALAMICO-HIPOFISARIO.

El sistema nervioso controla parte de la actividad corporal mediante la secreción de numerosas hormonas. El área central de control es el hipotálamo. La estimulación de ciertas áreas del hipotálamo implica que se segreguen hormonas por la hipófisis anterior.

En determinados núcleos hipotalámicos se segregan hormonas liberadoras e inhibidoras que llegan a la hipófisis a través de la sangre, donde actúan sobre células glandulares controlando la liberación de hormonas hipofisarias.

Los cuerpos celulares de las neuronas que segregan hormonas liberadoras y hormonas inhibidoras se localizan en los núcleos mediales basales del hipotálamo. Sin embargo, los axones provenientes de estos núcleos se proyectan luego hacia la eminencia media, que es un área engrosada del infundíbulo en el lugar en que este se desprende del hipotálamo. Es aquí donde los terminales nerviosos segregan las hormonas liberadoras e inhibidoras que son absorbidas hacia los capilares sanguíneos de la eminencia media y transportadas hacia la hipófisis.

La hipófisis o glándula pituitaria es una glándula pequeña que se ubica en la silla turca o base del cerebro y se conecta con el hipotálamo mediante el tallo hipofisario o tallo pituitario. Se divide en hipófisis anterior o adenohipófisis y en hipófisis posterior o neurohipófisis. Entre ellas existe una zona pequeña, avascular, llamada pars intermedia, que está prácticamente ausente en el hombre siendo de mayor tamaño y funcionalidad en algunos animales inferiores.

2. OBJETIVOS

Estudios anteriores llevados a cabo en nuestro laboratorio han mostrado modificaciones en los niveles de neurotransmisores y en su turnover en distintas estructuras del SNC durante el proceso de envejecimiento.

Como principal objetivo de esta tesis, estudiaremos la enzima Tirosina hidroxilasa, (enzima que cataliza el paso inicial y limitante de la síntesis de catecolaminas) en animales jóvenes, adultos y viejos, viendo si esta enzima sufre modificaciones con la edad en distintas estructuras cerebrales. Para ello estudiaremos:

1. Actividad TH durante el envejecimiento
2. Cantidad de proteína enzimática TH durante el envejecimiento.

La TH se considera un marcador de células catecolaminérgicas, pero además estudiaremos el contenido de proteína neurofibrilar de 68 y 160 kDa como marcadores neuronales en general, para ver la existencia de muerte neuronal, y de proteína fibrilar ácida de glía, ya que se ha descrito un aumento de glía con el proceso de envejecimiento.

Realizaremos nuestro estudio en las siguientes estructuras cerebrales por estar implicadas en distintas funciones:

- Bulbo olfatorio y colículo superior, relacionadas con los órganos de los sentidos.
- Corteza prefrontal e hipocampo, implicadas en procesos de aprendizaje y memoria.
- Hipotálamo, eminencia media e hipófisis encargados de la regulación hormonal.
- Sustancia negra y estriado, implicadas en la coordinación de movimientos motores y en la enfermedad de Parkinson.

Como siguiente paso, estudiaremos si las modificaciones observadas en la enzima TH, estarán relacionadas con procesos oxidativos, de acuerdo con la teoría del envejecimiento producido por radicales libres de oxígeno.

Otro objetivo de nuestro trabajo será el estudio de la acción protectora del deprenilo frente a los daños oxidativos y la muerte neuronal producidos durante el envejecimiento y su posible aplicación en el tratamiento del Parkinson.

3. MATERIAL Y METODOS

3.1. ANIMALES

Los animales utilizados en todos los experimentos fueron ratas macho de la raza Wistar de 4, 12 y 24 meses de edad, criadas en nuestro laboratorio con libre acceso a agua y comida y dieta de mantenimiento A O4 de Panlab S. L.

Las ratas fueron mantenidas en ciclos de luz y oscuridad de 12 horas bajo condiciones apropiadas de temperatura y humedad.

Los animales fueron decapitados entre las 10 y 11 horas a.m. Los cerebros fueron rápidamente diseccionados sobre hielo, separandose las distintas estructuras según el atlas de Paxinos y Watson. Todas las estructuras se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su utilización. Las figuras 8, 9, 10 y 11 muestran cortes de sustancia negra, estriado, bulbo olfatorio e hipocampo respectivamente, en las cuales se detalla la técnica de disección para cada uno de estos centros nerviosos. No se muestra ningún corte a nivel de la corteza prefrontal debido a su localización externa. En la figura 12 se muestra la situación del colículo superior. La figura 13 representa un esquema de la situación de la hipófisis en relación con los núcleos hipotalámicos.

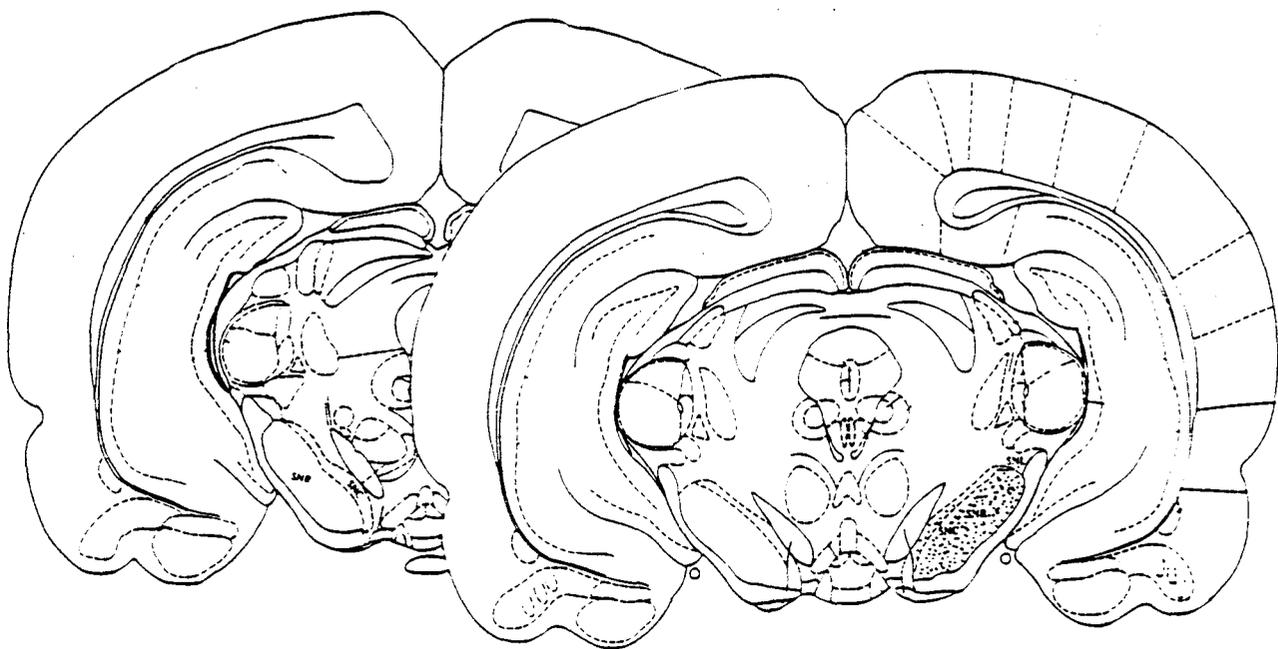


Figura 8. Representación esquemática de dos secciones coronales del cerebro de la rata, donde se muestran las distintas áreas de la sustancia negra: SNC (parte compacta de la sustancia negra); SNL (parte lateral de la sustancia negra). La zona diseccionada se muestra en la figura de forma punteada.

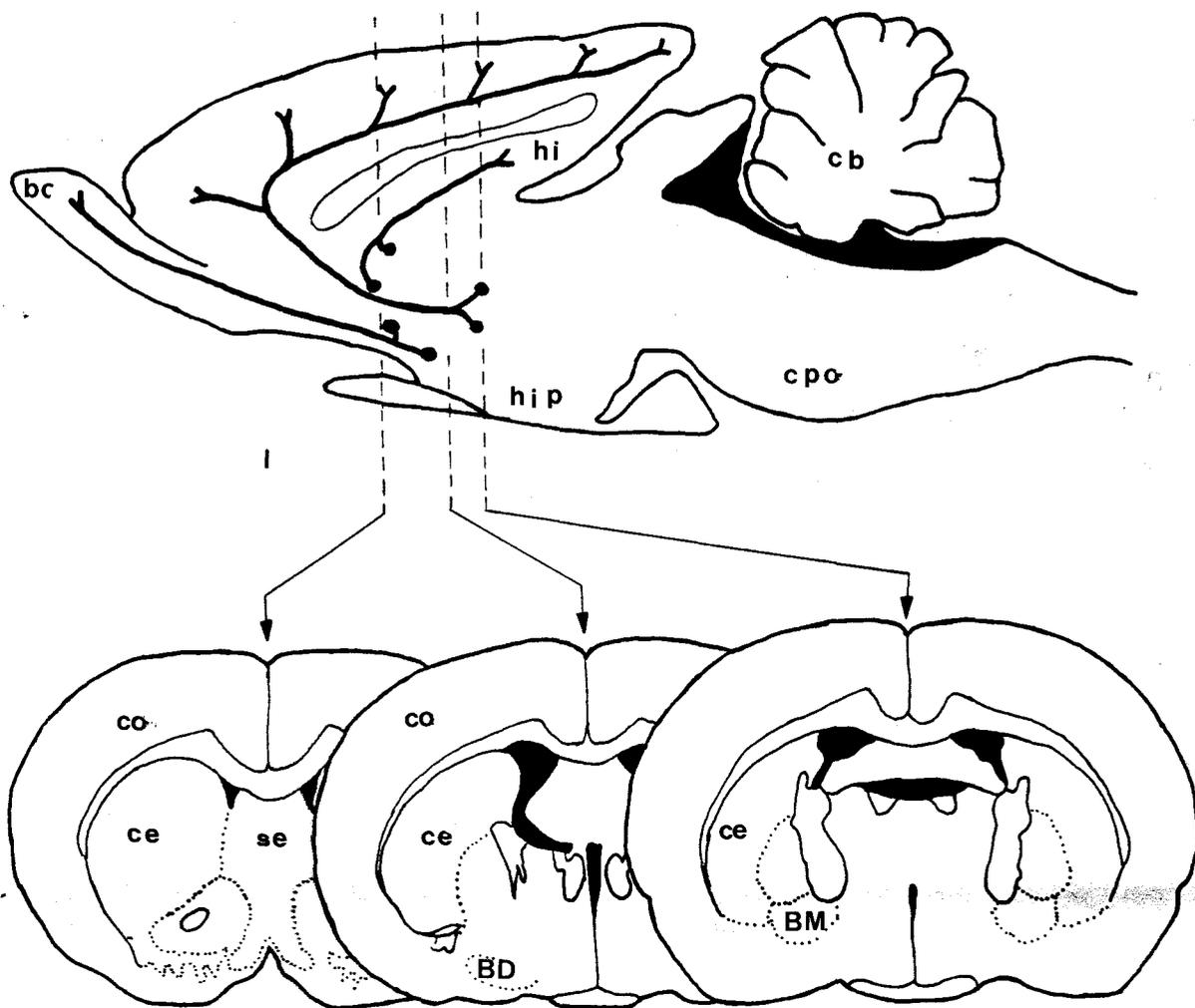


Figura 9. Representación esquemática del cerebro de la rata en la que podemos observar el núcleo caudado putamen (cp). Los espacios ventriculares se muestran en negro. Las líneas discontinuas en la sección transversa indican la distancia en milímetros desde el punto bregma. Abreviaturas: **BM** (núcleo basal de Meynert); **cb** (cerebelo); **BD** (banda diagonal de Broca); **cpo** (cerebelo posterior); **hi** (hipocampo); **hip** (hipotálamo); **mo** (médula oblongada); **bo** (bulbo olfatorio); **se** (septum); **ce** (cuerpo estriado); **to** (tecto óptico).

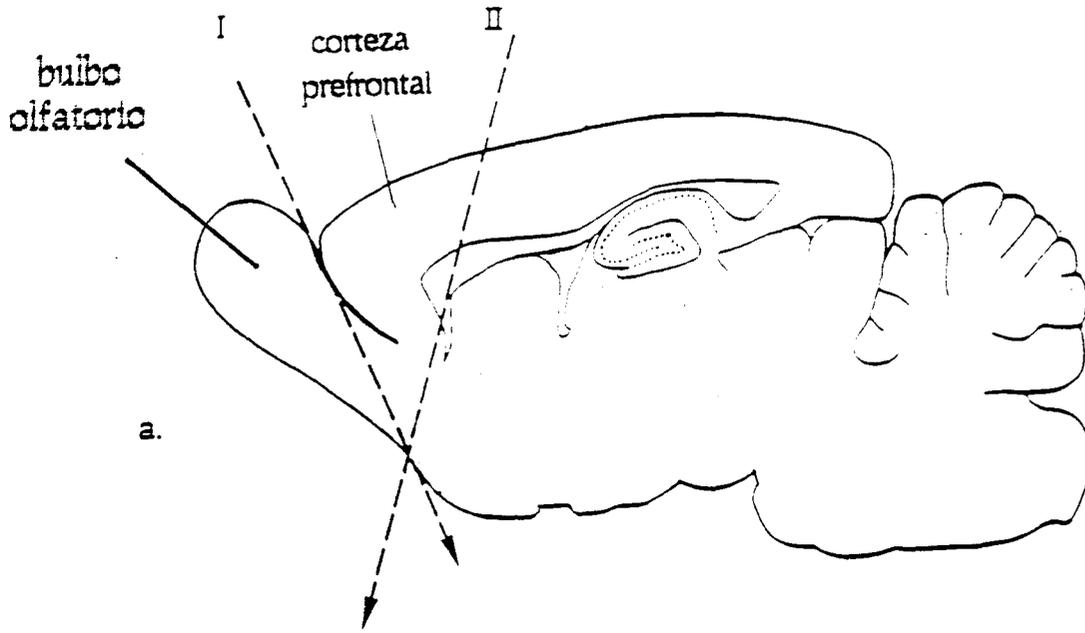


Figura 10. Sección transversal del cerebro de la rata, en la que se muestra la corteza prefrontal y un corte a nivel de los bulbos olfatorios.

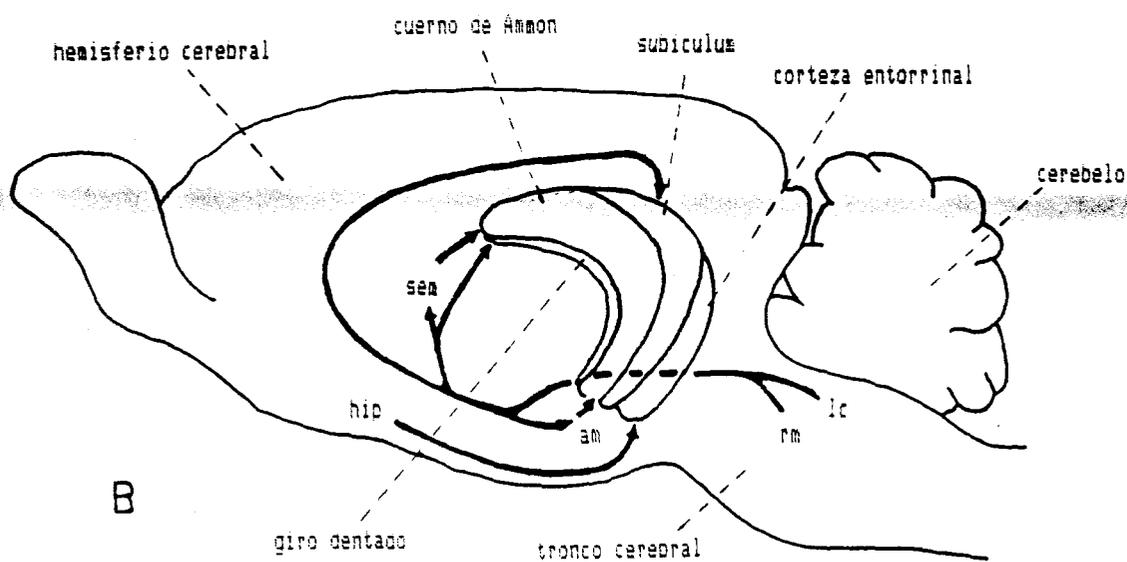
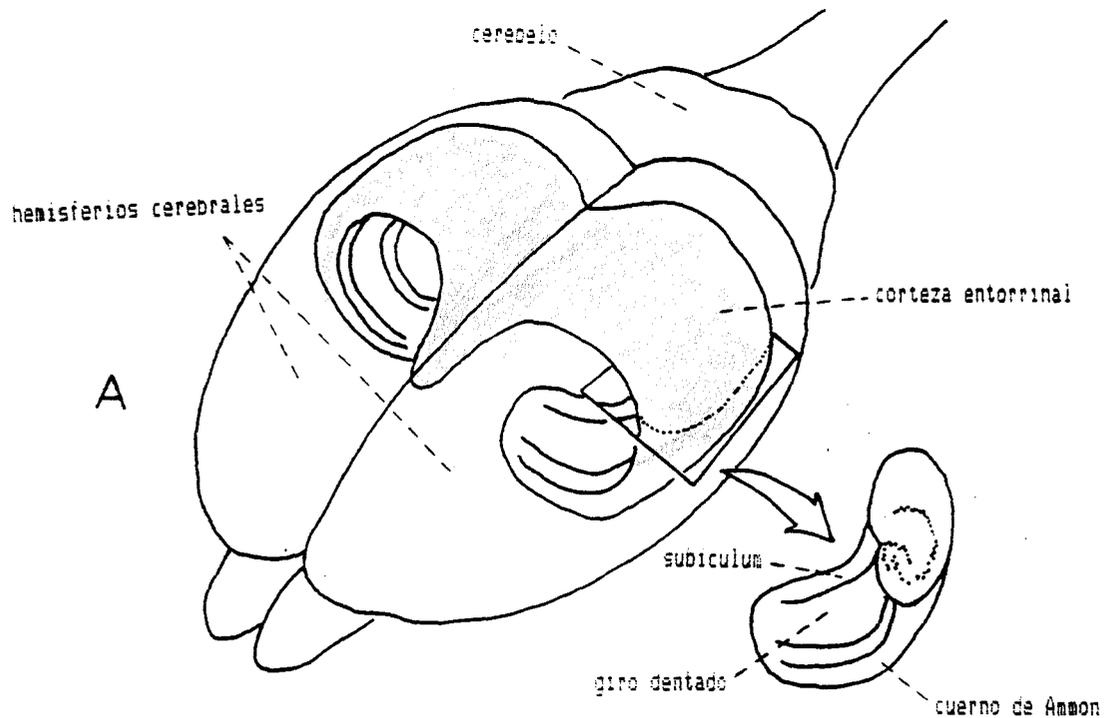


Figura 11. Representación esquemática del cerebro de la rata en la cual podemos observar el hipocampo (estructura sombreada). A: forma de los dos hipocampos vistos por transparencia en el interior de los hemisferios cerebrales. B: corte longitudinal a través del hemisferio cerebral, lo que permite situar la posición del hipocampo, así como los principales circuitos de diversas estructuras (flechas negras). Abreviaturas: **am** (amígdala); **hip** (hipotálamo); **lc** (locus coeruleus); **rm** (rafe medial); **sem** (secto medial).

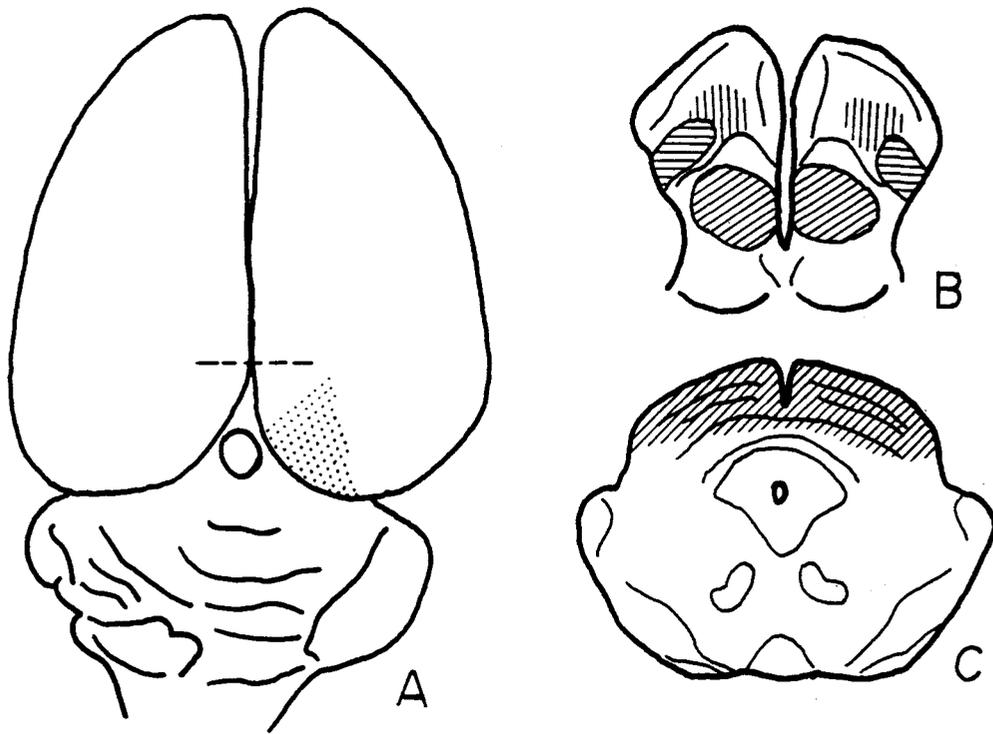


Figura 12. Diagrama de una vista dorsal del cerebro de la rata. Realizando un corte a nivel de la línea punteada (figura b) se muestra una sección frontal en la que los colículos superiores aparecen rayados.

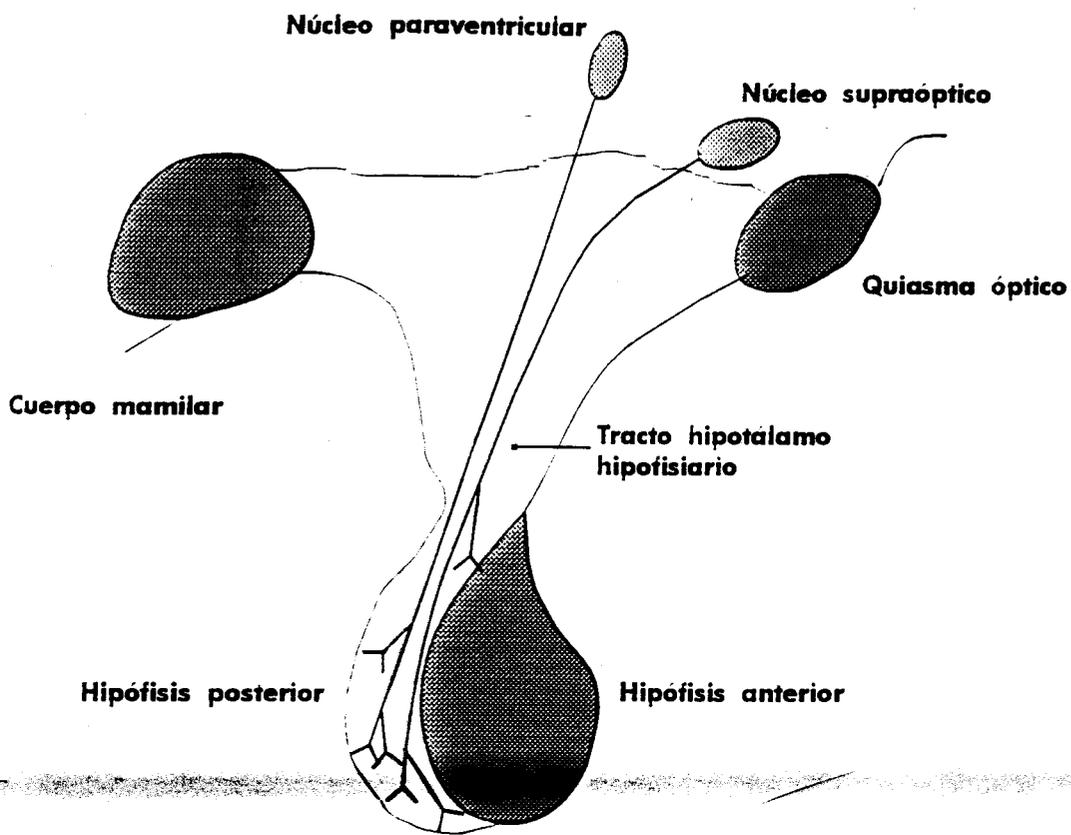


Figura 13. Representación esquemática de la situación de la hipófisis en relación con los núcleos hipotalámicos.

3.2. REACTIVOS

Para el análisis en HPLC se utilizó como patrón L-β-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) suministrado por Sigma Chemical Co. También se utilizaron ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) de Sigma Chemical Co., ácido tricloroacético, ácido perclórico y acetato sódico de Merck, ácido octanosulfónico de Scharlau. El agua utilizada fue desionizada (Milli Q-Millipore).

En la valoración de L-DOPA se utilizó m-hidroxibencil hidracina dihidroclorhídrico (NSD-1015) suministrado por Sigma Chemical Co.

Para la determinación de la cantidad de TH, Neurofilamentos y Glía todos los anticuerpos utilizados fueron suministrados por Boehringer Mannheim, la avidina marcada con peroxidasa y el reactivo para el revelado: ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolino-6-sulfónico), (ABTS) fueron suministrados por Sigma Chemical Co.

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

En la inmunoprecipitación de la TH se utilizó Proteína A sefarosa CL-4B suministrada por Sigma Chemical Co. y Protosol de New England Nuclear.

Como líquidos de centelleo se emplearon Formula-989 LSC Cocktail de New England Nuclear y Ready Protein⁺ de Beckman.

Para la medida de la actividad TH "in vitro" se utilizó tirosina marcada con tritio suministrada por Amersham y cofactor pterínico suministrado por Schircks Laboratories (Suiza).

Los productos para electroforesis fueron suministrados por Bio Rad. Todos los demás reactivos utilizados fueron suministrados por Sigma Chemical Co., Merck y Panreac.

Todos los reactivos necesarios para la cuantificación de IGF-I fueron suministrados en un kit del Instituto Nichols (U.S.A.) Para la extracción del IGF-I se utilizaron columnas C 18 Sep-Pak de Millipore.

En el tratamiento de los animales el R(-)-Deprenil HCL fue suministrado por Research Biochemicals Incorporated.

Para la medida de proteínas se utilizó como estándar albúmina bovina de Sigma Chemical Co.

3.3. APARATOS

El equipo de HPLC utilizado en la valoración de la L-DOPA consistió en una bomba Merck Hitachi L 6200, un detector electroquímico (amperímetro LC 4B de Bioanalytical System Inc.), un integrador Hitachi D-2000 y columnas LichroCART 125-4 (Lichropher 100 RP-18) de 5 μ m de diámetro de partícula de Merck.

En las determinaciones mediante E.L.I.S.A. se utilizó un lector Tirtetek Multiskan Plus MK II (tipo 314).

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

La homogenización de las estructuras estudiadas se llevó a cabo en un sonicador Labsonic modelo 1510 de Braun.

Las centrifugaciones se realizaron en una centrífuga refrigerada Centrikon H-401 de Kontron y una microfuga Hettisch Mikroliter.

Para el secado de muestras se utilizó una centrífuga de vacío Speed Vac svc 100 de Savant.

En la determinación de grupos carbonilos de la enzima TH se utilizó para dializar un Microdialyzer System 500 de Pierce.

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

La cuantificación de IGF-I se realizó en un contador Multi Gamma modelo 1261 de LKB (Suecia).

Para la medida de la intensidad de bandas de geles se utilizó un densitómetro laser de Molecular Dynamics (Sunnivale, CA, USA.)

3.4. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD TIROSINA HIDROXILASA "IN VIVO".

La medida de la actividad TH se llevó a cabo según el método de Carlsson y col. (1972). Se determinó como la formación de L-DOPA, midiendo su nivel de acumulación tras la administración de un inhibidor de la L-aminoácido aromático descarboxilasa: m-hidroxibenzil hidracina (NSD-1015). Los niveles de L-DOPA fueron medidos de acuerdo con el método descrito por Venero y col. (1991). La tasa de acumulación se obtuvo calculando la pendiente de la curva por regresión lineal.

Los animales fueron sacrificados 60 minutos después de la inyección intraperitoneal de NSD-1015 (100mg/kg). El NSD-1015 fue disuelto en NaCl al 0,9 %. El volumen de inyección fue de 5 ml/Kg de peso del animal. La actividad enzimática se expresó como pmol de producto formado/mg de proteína/hora.

Las diferentes estructuras cerebrales estudiadas se homogeneizaron mediante sonicación en perclórico 0,1M y bisulfito sódico 1mM. Las muestras se centrifugaron a 1000xg durante 10 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se filtraron por rotación a baja velocidad (1000xg) a través de filtros de 0,2 μ m de diámetro de poro. Los filtrados resultantes (pH 1) se neutralizaron hasta alcanzar un pH de aproximadamente 3,0 mediante la adición del 10% (V/V) de una mezcla del tampón de la fase móvil con NaOH 5N en la proporción 3:1. Las muestras así neutralizadas se inyectaron con un inyector de alta presión (Rheodine 7125-075) con un bucle de relleno de 20 μ l. Los análisis se realizaron isocráticamente a temperatura ambiente y a un flujo de 0,8 ml/min. El potencial del detector se mantuvo a 0,55 V. La fase móvil consistió en una mezcla formada por 0,1mol/l de ácido tricloroacético y ácido octanosulfónico pH 3,2 ajustado con acetato sódico sólido y 0,01 mmol/l de Na₂EDTA.

El precipitado fue resuspendido en tampón carbonato-bicarbonato pH 9,6 utilizándose para la medida de la cantidad de proteína y posteriores cuantificaciones.

La concentración de L-DOPA se calculó mediante la inyección de un patrón puro, el cual se preparó en perclórico 0,1 M y bisulfito sódico 1mM (1 mg patrón/ml) y se conservó a 4°C hasta el momento de su utilización (máximo 30 días). La correcta identificación de los compuestos encontrados en el cromatograma se llevó a cabo mediante el estudio de muestras y patrones a diferentes potenciales de oxidación, mostrando ambos un comportamiento electroquímico similar, lo que permitió apoyar la especificidad del método.

3.5.CUANTIFICACIÓN DE TIROSINA HIDROXILASA.

La determinación de la cantidad de TH se llevó a cabo mediante la técnica E.L.I.S.A.(enzyme-linked inmunoabsorbent assay). La figura 14 muestra un esquema general de la técnica. Previamente se realizaron curvas de saturación para determinar la cantidad de proteína en pocillo, que fue diferente según la estructura a estudiar.

Las curvas de saturación se realizaron colocando en los pocillos cantidades crecientes de proteína total del extracto desde 0 a 50 μ g y completando cada una de ellas con albúmina bovina (BSA) disuelta en tampón carbonato-bicarbonato hasta una cantidad fija para todos los pocillos de 50 μ g 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 μ g/ml en tampón carbonato-bicarbonato pH 9,6 para sustancia negra, estriado y bulbo olfatorio. Para las restantes estructuras la dilucción fue de 250 μ g/ml. De cada una de estas soluciones se añadieron por triplicado, 100 μ l a los pocillos de una placa NUNC, la cual se incubó toda la noche a 4°C. Para cada placa se realizaron controles negativos por triplicado incubando

los pocillos con un homogenado de hígado a la misma concentración que los homogenados de cerebro y blancos a los que no se añadió el primer anticuerpo. 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 albúmina bovina al 3% en PBS (tampón fosfato salino), de la cual se añadieron 200 μ l 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 μ l 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 μ l de la solución de 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 en oscuridad, procediéndose a la lectura de la absorbancia a 405 nm.

3.6. CUANTIFICACIÓN DE NEUROFILAMENTOS Y GLÍA.

Se realizó mediante E.L.I.S.A. como se describe anteriormente para la TH. Los antígenos fueron diluidos a la concentración de 250 μ g/ml. Los anticuerpos utilizados fueron monoclonales frente a proteína neurofibrilar de 68 kDa, 160 kDa y proteína fibrilar ácida de glía y se diluyeron 40 veces en PBS-Tween.

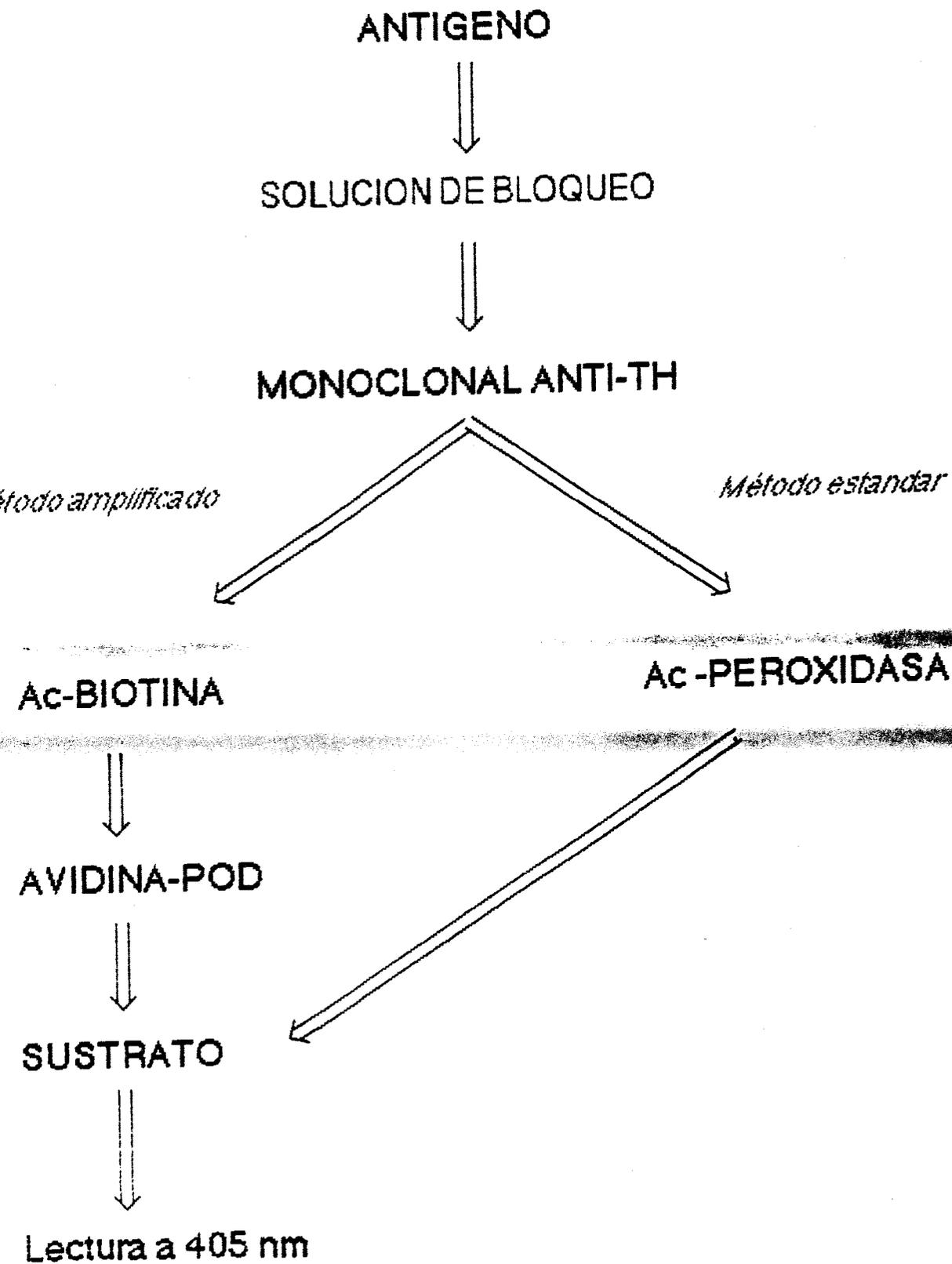


Figura 14. Esquema general de la técnica de cuantificación mediante E.L.I.S.A.

3.4. DETERMINACION DE GRUPOS CARBONILOS EN HOMOGENADOS DE PROTEINAS.

Se realizó midiendo la incorporación de tritio tras la reducción con boro hidruro sódico tritiado según el método de Lenz y col. (1989). 50 μ g de proteínas del extracto fueron secados a vacío y posteriormente tratados con tampón Tris-HCl 1M, EDTA 10 mM pH 8,5 y borohidruro tritiado 100 mM en 0,1 M de NaOH (actividad específica 100 mCi/mmol). Se incubaron a 37° C durante 30 minutos. A continuación la proteína se precipitó con 1 ml de ácido tricloroacético al 10% por centrifugación. Tras lavar tres veces el precipitado se resuspendió por incubación a 37° C durante toda la noche en 300 μ l de ácido fórmico al 70%. Seguidamente se procedió a la hidrólisis de la proteína por calentamiento a 145° C con HCl 6N durante cuatro horas. Una vez hidrolizada se separaron los aminoácidos pasándolos por una resina Dowex-50 que se lavó primero con agua y después con NH₄OH 2M. La radiactividad se determinó en el NH₄OH eluido.

3.8. DETERMINACIÓN DE GRUPOS CARBONILOS DE LA ENZIMA TIROSINA HIDROXILASA.

Las estructuras fueron homogeneizadas por sonicación en tampón RIPA (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 140 mM NaCl; 1% Triton X-100; 1% ácido deoxicólico y 0,1% SDS y los siguientes inhibidores de proteasas: leupeptina 0,5 mg/ml; pepstatina 0,7 mg/ml y PMSF 40 mg/ml). Los homogenados se centrifugaron a 12000xg en una microfuga durante 15 minutos. Una alícuota del sobrenadante fue marcada con borohidruro sódico tritiado según el método de Lenz y colaboradores (1989). Las muestras se incubaron a 37° C durante 30 minutos y se dializaron durante 3 horas en un microdializador para proceder a la inmunoprecipitación.

3.9. INMUNOPRECIPITACION DE LA TIROSINA HIDROXILASA RADIOMARCADA.

El anticuerpo monoclonal frente a la TH fue incubado junto con Proteína A Sefarosa CL-4B durante 4 horas a 4° C. El complejo fue lavado tres veces con tampón RIPA. Una alícuota de muestra radiomarcada fue incubada con el complejo Proteína A-anticuerpo durante toda la noche a 4° C. Las muestras fueron centrifugadas en una microfuga 15 minutos y el inmunoprecipitado fue lavado tres veces con tampón RIPA. A continuación se añadieron a las muestras 0,5 ml de Protosol y se tuvieron en incubación durante toda la noche a 60° C. Seguidamente se añadieron 17 μ l de ácido acético glacial y se midió la radiactividad incorporada a la TH en 10 ml de líquido de centelleo.

3.10. OXIDACIÓN "IN VITRO" DE TIROSINA HIDROXILASA.

Las oxidación "in vitro" de la enzima TH se llevó a cabo utilizando peróxido de hidrógeno como generador de radicales libres. Se realizó en estriado de ratas controles (4 meses de edad). Dichas estructuras fueron homogeneizadas en tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7,2 en la proporción 1/10 peso/volumen. Seguidamente, se procedió a la incubación de 100 μ l de homogenado de estriado con 900 μ l de tampón fosfato potásico 50 mM pH 7,2 y 100 μ l de una solución de H₂O₂ 40 mM, en tubos destapados a 37°C y diferentes tiempos (0, 5, 10 y 20 minutos). Para todos los tiempos se utilizó el mismo homogenado de estriado. Tras la oxidación, las muestras a los diferentes tiempos fueron alicuoteadas para proceder a la medida de la actividad TH, el contenido de grupos carbonilos en los homogenados y el contenido de grupos carbonilos específicos de la enzima TH.

3.11. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD TIROSINA HIDROXILASA "IN VITRO".

La medida de la actividad TH "in vitro" se llevó a cabo según el método descrito por Reinhard y colaboradores (1986) con modificaciones. Rápidamente, tras la incubación con H₂O₂ las muestras fueron diluidas en la proporción 1:1 con el tampón siguiente: Tris 30 mM; Tritón X-100 0,1 %, pH 6,5 ajustado con ácido acético. Una alícuota del homogenado fue incubada con 2,5 nmoles de Tirosina-HCl (conteniendo 0,4 μ Ci de L-[3,5 ³H]tirosina), 50 nmoles de cofactor 6(R)-L-eritro-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina, 5000 unidades de catalasa y ditioneitol 5 mM en fosfato potásico 100 mM pH 6,0 a 37°C durante 20 minutos. Seguidamente se colocó en baño de hielo y se añadió a cada tubo 1 ml de una suspensión de carbón activo al 10% en HCl 0,1 M la cual se mantenía en agitación continua. Se agitaron todos los tubos y se centrifugaron durante 6 minutos en microfuga a 4°C. Tras la centrifugación, se tomaron 700 μ l del sobrenadante que fueron transferidos a otros tubos a los cuales se añadieron 750 μ l de la suspensión de carbón activo, se volvieron a agitar y a centrifugar a 4°C. Finalmente se tomaron 750 μ l del sobrenadante y se pasaron a viales de centelleo en los que se determinó la radiactividad utilizando 5ml de líquido de centelleo Formula 989.

3.12. DETERMINACION DE GRUPOS CARBONILOS EN HOMOGENADOS DE PROTEINAS TRAS OXIDACIÓN.

Tras incubar los homogenados de proteínas diferentes tiempos con el oxidante, las proteínas se precipitaron con ácido perclórico 0,1 M por centrifugación a 12000xg. El precipitado fue resuspendido en tampón carbonato-bicarbonato pH 9,6. Una vez que las muestras estaban en estas condiciones, la medida de grupos carbonilos se realizó mediante el mismo procedimiento que para los homogenados sin oxidar, siguiendo el método descrito por Lenz y col. (1989).

Una alícuota de la muestra marcada se utilizó para determinar los grupos carbonilos de los homogenados y el resto para la determinación de los grupos carbonilos específicos de la TH.

3.13. DETERMINACION DE GRUPOS CARBONILOS DE LA ENZIMA TIROSINA HIDROXILASA TRAS OXIDACIÓN.

Se realizó mediante electroforesis de las muestras marcadas seguida de inmunoblot.

La electroforesis se realizó siguiendo el protocolo de Laemmli (1970), con geles al 10% de poliacrilamida y SDS. Las muestras fueron previamente neutralizadas con NaOH 5 M, secadas a vacío y resuspendidas en tampón de disociación (Tris-HCl 0,01 M pH 6,8 ; 20% glicerol; 10% β -mercaptoetanol; 2,3% SDS y 0,005% azul de bromofenol). Se desnaturalizaron por calentamiento en agua hirviendo durante 5 minutos, se centrifugaron y el sobrenadante fue cargado en el gel.

Tras la electroforesis se procedió a la transferencia de las proteínas a membranas de nitrocelulosa de 0,45 μ . La transferencia se realizó según el método descrito por Towbin (1979), durante toda la noche, a 4°C y 30 V.

Una vez transferidas las proteínas, se procedió al bloqueo de la membrana con solución al 5% de leche no grasa en tampón tris salino con Tween-20, durante una hora a temperatura ambiente y agitación suave. Seguidamente la membrana se lavó tres veces y se incubó con una dilución 1/500 del anti-TH monoclonal toda la noche a 4°C. A la mañana siguiente, se procedió al lavado de la membrana y su posterior incubación con un segundo anticuerpo biotinilado a la dilución 1/3000 durante una hora a temperatura ambiente y agitación suave. Tras lavar de nuevo la membrana se incubó con una solución de estreptoavidina y fosfatasa alcalina biotinilada durante una hora a temperatura ambiente y agitación suave y se procedió al revelado.

Una vez identificada la banda específica de TH, se cortó y se contó en 5 ml de líquido de centelleo Ready Protein+ de Beckman. Previamente al conteo, la intensidad de las bandas fue determinada en un densitómetro laser.

3.14. MEDIDA DE LA CANTIDAD DE PROTEINAS.

La cuantificación de la concentración de proteínas en los diferentes extractos se realizó según el método descrito por Lowry y col. (1951) utilizando albúmina bovina como estándar.

3.15. TRATAMIENTO CON DEPRENILO.

Los animales utilizados fueron ratas macho de la raza Wistar de 22 meses de edad, a las cuales se les administró deprenilo mediante inyección subcutánea tres días a la semana durante dos meses. La dosis suministrada fue de 2 mg de deprenilo/Kg peso del animal disueltos en ClNa al 0,9 %. Otro grupo de animales de igual edad fue llevado como control, tratándolos únicamente con solución salina. Todos los animales fueron sacrificados a los 24 meses, 48 horas después de la última inyección, extrayéndose la sangre y las estructuras cerebrales que se iban a estudiar, las cuales se guardaron a -80°C hasta su utilización.

3.16. OBTENCIÓN DEL PLASMA TRAS EL TRATAMIENTO CON DEPRENILO.

Se utilizó heparina como anticoagulante. La sangre extraída fue centrifugada a temperatura ambiente durante 10 minutos a 1000xg. Se

separó el plasma y repartió en alícuotas que se congelaron a -20°C hasta el momento del ensayo.

3.17. EXTRACCIÓN DE IGF-I.

El IGF-I se separo de su unión a proteínas plasmáticas utilizando columnas de sílice comerciales C18 Sep-Pak.

Se tomaron 50 μ l de cada una de las muestras y controles y se mezclaron con 950 μ l de HCl 0,5 N. Se incubaron a temperatura ambiente durante una hora. Durante este tiempo se aplicó a las columnas el siguiente tratamiento: primero se añadieron 5 ml de alcohol isopropílico, seguidos de 5 ml de metanol y finalmente 10 ml de ácido acético glacial al 4 %. Todos estas soluciones fueron de alta pureza y se desgasificaron previamente. Una vez preparadas las columnas, se tomaron 200 μ l de cada muestra acidificada y se pasaron por las columnas. Tres minutos mas tarde se procedió al lavado de las columnas añadiendo en primer lugar 10 ml de ácido acético al 4%, después se añadieron 2 ml de metanol que se recogieron y secaron mediante burbujeo de nitrógeno a temperatura ambiente.

Las muestras fueron reconstituidas para su utilización con 1,5 ml de tampón fosfato suministrado en el kit para la determinación de IGF-I, quedando así diluidas 150 veces.

3.18. MEDIDA DE IGF-I.

Se realizó mediante radioinmunoensayo (RIA). La curva patrón se realizó con estándares de concentración conocida suministrados en el kit para la determinación de IGF-I. El ensayo se realizó de la siguiente forma:

Todas las muestras, estándares y controles se ensayaron por duplicado. Se tomaron 50 μ l de cada uno de ellos y se mezclaron con 350 μ l de tampón fosfato. Seguidamente, se añadieron 100 μ l de anti-IGF-I, se agitaron todos los tubos y se incubaron durante una hora a temperatura

ambiente, tras la cual, se añadieron 100 μ l de IGF-I marcado con I¹²⁵ y se volvieron a incubar durante 16-18 horas a 4° C. Posteriormente se añadieron 500 μ l del segundo anticuerpo (para la precipitación) y 50 μ l de un reactivo compuesto por suero normal de conejo. Tras agitar muy bien los tubos se tuvieron a temperatura ambiente durante 20 minutos y después se centrifugaron durante 30 minutos a 1500 x RCF a 4° C. Inmediatamente después de la centrifugación se eliminó el sobrenadante y se procedió al conteo de los precipitados.

3.19. ANALISIS ESTADÍSTICO.

Las comparaciones entre dos grupos se hicieron mediante el test *t* de Student. Las comparaciones entre varias medias simultáneamente se hicieron mediante análisis de la varianza (ANOVA) seguido del test de Scheffe.

4.RESULTADOS

4.1. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD Y LA CANTIDAD DE ENZIMA TIROSINA HIDROXILASA EN DIFERENTES CENTROS DEL SNC DURANTE EL ENVEJECIMIENTO.

4.1.1. BULBO OLFATORIO.

4.1.1.1. Medida de la actividad Tirosina Hidroxilasa "in vivo".

La actividad TH fue medida "in vivo" utilizando un inhibidor específico de la enzima L-aminoácido aromático descarboxilasa (m-hidroxibenzilhidrazina, NSD-1015), como se describe en el apartado de Material y Métodos. El bulbo olfatorio es también una estructura dopaminérgica, recibe proyecciones desde el área ventral tegmental del mesencéfalo. Presenta menor inervación dopaminérgica que la vía nigroestriada. No encontramos cambios significativos en ninguna de las tres edades estudiadas, aunque el valor más alto se observa a los 12 meses.

4.1.1.2. Estudio de la cantidad de enzima Tirosina Hidroxilasa.

Los resultados se muestran en la tabla 1. Al igual que para la actividad, tampoco se observan cambios en la cantidad de enzima en ninguna de las edades estudiadas.

Estos resultados indican que la enzima TH no se modifica en esta estructura durante el envejecimiento.

TABLA 1. ESTUDIO "IN VIVO" DE LA ACTIVIDAD TIROSINA HIDROXILASA Y DE LA CANTIDAD DE ENZIMA EN BULBO OLFATORIO DURANTE EL ENVEJECIMIENTO.

	Edad (meses)		
	4	12	24
Actividad TH	19,30 ± 6,9	26,00 ± 2,9	21,50 ± 4,1
Cantidad TH	0,066 ± 0,003	0,061 ± 0,007	0,056 ± 0,007

Los resultados se han obtenido como se describe en Material y Métodos. Corresponden a la media ± D.E. El número de animales fue de más de cinco en cada experimento. Los valores de actividad están expresados en pmol de L-DOPA/mg proteína/hora. Los valores de cantidad TH son valores de absorbancia a 405 nm. Significación estadística: ANOVA seguido del test de Scheffe: *p<0,05; **p<0,01; a comparado con 4 meses, b comparado con 12 meses.

4.1.2. COLÍCULO SUPERIOR.

4.1.2.1. Medida de la actividad Tirosina Hidroxilasa "in vivo".

El colículo superior es una estructura de la vía visual que también recibe proyecciones dopaminérgicas. Los cuerpos neuronales están situados en la sustancia negra y en el área ventral tegmental. Esta estructura es principalmente noradrenérgica y en ella la DA actúa como precursor de la NA. Los resultados de la medida de actividad TH se muestran en la tabla 4. Dicha actividad es muy baja, ya que presenta poca inervación dopaminérgica, y no presenta variación significativa durante el envejecimiento.

4.1.4.2. Estudio de la cantidad de enzima Tirosina Hidroxilasa.

Partimos de 25 μg de proteína total del extracto, ya que es una estructura con una baja actividad TH. Los resultados están expresados en la tabla 2. Encontramos valores altos con respecto a la baja actividad. No se observan diferencias significativas entre ninguna de las tres edades estudiadas, lo cual sugiere que no existen modificaciones de la TH durante el envejecimiento.

TABLA 2. ESTUDIO "IN VIVO DE LA ACTIVIDAD TIROSINA HIDROXILASA Y DE LA CANTIDAD DE ENZIMA EN COLICULO SUPERIOR DURANTE EL ENVEJECIMIENTO.

	Edad (meses)		
	4	12	24
Actividad TH	4,50 ± 0,9	5,20 ± 0,4	4,80 ± 0,7
Cantidad TH	0,085 ± 0,004	0,080 ± 0,013	0,080 ± 0,012

Los resultados se han obtenido como se describe en Material y Métodos. Corresponden a la media ± D.E. El número de animales fue de más de cinco en cada experimento. Los valores de actividad están expresados en pmol de L-DOPA/mg proteína/hora. Los valores de cantidad TH son valores de absorbancia a 405 nm. Significación estadística: ANOVA seguido del test de Scheffe: *p<0,05; **p<0,01; a comparado con 4 meses, b comparado con 12 meses.

4.1.3. HIPOCAMPO.

4.1.3.1. Medida de la actividad Tirosina Hidroxilasa "in vivo".

El hipocampo es una región cerebral con una pequeña inervación dopaminérgica. Esta procede del área ventral tegmental y de la sustancia negra. Esta estructura recibe principalmente inervación noradrenérgica procedente del locus coeruleus. Por lo tanto los valores de actividad TH son muy bajos en comparación con los de otras estructuras. Los resultados están mostrados en la tabla 2. No encontramos diferencias en ninguna de las tres edades estudiadas.

4.1.3.2. Estudio de la cantidad de enzima Tirosina Hidroxilasa.

Al ser el hipocampo una estructura con escasa inervación dopaminérgica y con una actividad TH muy baja, a la hora de determinar la cantidad de enzima TH mediante E.L.I.S.A., hemos fijado la concentración de proteína total en los pocillos de la placa en 25 μg para de este modo trabajar en condiciones saturantes.

No se observan diferencias significativas en ninguna de las tres edades. Esto indica que la enzima TH no se encuentra afectada por el proceso de envejecimiento en esta estructura. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

TABLA 3. ESTUDIO "IN VIVO" DE LA ACTIVIDAD TIROSINA HIDROXILASA Y DE LA CANTIDAD DE ENZIMA EN HIPOCAMPO DURANTE EL ENVEJECIMIENTO.

	Edad (meses)		
	4	12	24
Actividad TH	4,30 ± 0,7	4,80 ± 0,4	5,20 ± 0,9
Cantidad TH	0,109 ± 0,007	0,098 ± 0,009	0,092 ± 0,015

Los resultados se han obtenido como se describe en Materiales y Métodos. Corresponden a la media ± D.E. El número de animales fue de más de cinco en cada experimento. Los valores de actividad están expresados en pmol de L-DOPA/mg proteína/hora. Los valores de cantidad TH son valores de absorbancia a 405 nm. Significación estadística: ANOVA seguido del test de Scheffe: *p<0,05; **p<0,01; a comparado con 4 meses, b comparado con 12 meses.

4.1.4. CORTEZA PREFRONTAL.

4.1.4.2. Medida de la actividad Tirosina Hidroxilasa "in vivo".

La corteza prefrontal también es una estructura con escasa inervación dopaminérgica. Al igual que hipocampo, las fibras dopaminérgicas proviene del área ventral tegmental y de la sustancia negra. Presenta una baja actividad tirosina hidroxilasa. Los resultados están reflejados en la tabla 3. A diferencia de otras estructuras, en el primer período de edad estudiado, entre 4 y 12 meses, encontramos un aumento significativo de la actividad TH del 70% ($p < 0,01$). Entre 12 meses y 24 meses se mantiene esta actividad elevada siendo el aumento del 47% si lo comparamos con 4 meses ($p < 0,01$).

4.1.4.2. Estudio de la cantidad de enzima tirosina hidroxilasa.

Al igual que para hipocampo, hemos fijado la concentración de proteína total en el pocillo de la placa en 25 μg . Los resultados se muestran en la tabla 3. Contrariamente a los resultados obtenidos en las medidas de actividad TH, no encontramos cambios significativos en la cantidad de enzima en ninguna de las edades estudiadas, aunque podemos considerar que los valores de cantidad son elevados para la baja actividad. Esto indica que el aumento de actividad TH no es debido a un aumento en la cantidad de proteína TH, lo cual sugiere una activación de la enzima en corteza prefrontal durante el envejecimiento.

TABLA 4. ESTUDIO "IN VIVO" DE LA ACTIVIDAD TIROSINA HIDROXILASA Y DE LA CANTIDAD DE ENZIMA EN CORTEZA PREFRONTAL DURANTE EL ENVEJECIMIENTO.

	Edad (meses)		
	4	12	24
Actividad TH	5,70 ± 1,2	9,70 ± 1,7 ^{*a}	8,40 ± 0,9 ^{*a}
Cantidad TH	0,086 ± 0,004	0,087 ± 0,006	0,077 ± 0,010

Los resultados se han obtenido como se describe en Material y Métodos. Corresponden a la media ± D.E. El número de animales fue de más de cinco en cada experimento. Los valores de actividad están expresados en pmol de L-DOPA/mg proteína/hora. Los valores de cantidad TH son valores de absorbancia a 405 nm. Significación estadística: ANOVA seguido del test de Scheffe: *p<0,05; **p<0,01; a comparado con 4 meses, b comparado con 12 meses.

4.1.5. EJE HIPOTALÁMICO-HIPOFISARIO.

4.1.5.1. Medida de la actividad Tirosina Hidroxilasa "in vivo" en hipotálamo, eminencia media e hipófisis.

Estas tres estructuras están íntimamente relacionadas. Los cuerpos celulares que se encuentran en el hipotálamo (núcleo supraóptico y paraventricular) proyectan sus axones hacia la eminencia media. La hipófisis y el hipotálamo están conectados mediante el tallo hipofisario. Las tres estructuras presentan valores de actividad TH del mismo orden, siendo el hipotálamo la estructura que presenta mayor actividad TH a los 4 meses. No observamos cambios significativos a los 12 meses y tampoco a los 24 en dicha estructura. En hipófisis no encontramos cambios en el periodo comprendido entre 4 y 12 meses, aunque a los 12 meses se observa un valor inferior. En el segundo periodo de edad estudiado (entre 12 y 24 meses) encontramos un aumento significativo de la actividad TH del 45,2 % ($p < 0,05$). En cuanto a eminencia media, esta estructura no presenta variaciones significativas, aunque la actividad más elevada se observa a los 12 meses. Los resultados quedan representados en tabla 5.

TABLA 5. ACTIVIDAD TIROSINA HIDROXILASA "IN VIVO" EN HIPOTALAMO, EMINENCIA MEDIA E HIPOFISIS DURANTE EL ENVEJECIMIENTO.

	Edad (meses)		
	4	12	24
Hipotálamo	23,36 ± 4,0	19,82 ± 4,6	21,56 ± 1,9
Eminencia Media	18,47 ± 1,7	22,84 ± 2,8	20,17 ± 3,7
Hipófisis	13,60 ± 2,5	12,66 ± 1,2	18,39 ± 4,7*b

Los resultados están expresados como pmol de L-DOPA/ mg proteína/ hora. Corresponden a la media ± D.E. El número de animales fue de al menos cuatro para cada experimento. Significación estadística: ANOVA seguido del test de Scheffe: *p< 0,05. a: comparado con 4 meses, b: comparado con 12 meses.

4.1.5.2. Estudio de la cantidad de enzima Tirosina Hidroxilasa en hipotálamo, eminencia media e hipófisis.

De estas tres estructuras , el hipotálamo es la que presenta mayor cantidad de enzima TH a los 4 meses, de la misma manera que mostraba más actividad a esa edad. A los 12 meses dicho valor se mantiene, pero a los 24 meses, se observa una disminución significativa del 36,4 %, lo cual sugiere que la enzima presenta una mayor actividad a los 24 meses, o sea parece encontrarse activada.

En eminencia media, el contenido de enzima TH también está relacionado con los valores de actividad, mostrando un aumento significativo a los 12 meses del 85% ($p < 0,05$), el cual está de acuerdo con la máxima actividad observada a dicha edad. los valores observados a los 4 y 24 meses son muy similares.

En hipófisis el contenido de enzima TH no sufre modificaciones estadísticamente significativas durante el envejecimiento. Sin embargo, los valores observados muestran correlación con los valores encontrados para la actividad, manteniendose invariables entre 4 y 12 meses. A los 24 meses se observa un aumento (37,5%) que puede relacionarse con el aumento de actividad encontrado a esa edad. Los resultados están mostrados en la tabla 6.

TABLA 6. CUANTIFICACION DE TIROSINA HIDROXILASA EN HIPOTALAMO, EMINENCIA MEDIA E HIPOFISIS DURANTE EL ENVEJECIMIENTO.

Absorbancia a 405 nm			
Edad (meses)	4	12	24
Hipotálamo	0,044 ± 0,005	0,040 ± 0,009	0,028 ± 0,006*a
Eminencia Media	0,020 ± 0,005	0,037 ± 0,008*a	0,023 ± 0,004
Hipófisis	0,024 ± 0,001	0,022 ± 0,004	0,033 ± 0,009

Los resultados se han obtenido midiendo la absorbancia a 405 nm mediante E.L.I.S.A. como se describe en Material y Métodos. Corresponden a la media ± D.E. de al menos cuatro animales para cada experimento. Significación estadística: ANOVA seguido del test de Scheffe: *p< 0,05. a: comparado con 4 meses, b: comparado con 12 meses.

4.1.6. VÍA NIGRO-ESTRIADA.

4.1.6.1. Medida de la actividad tirosina hidroxilasa "in vivo" en estriado y sustancia negra.

El estriado, que contiene la mayor densidad de terminales dopaminérgicas, presenta una actividad dos veces mayor que la encontrada en sustancia negra, donde se encuentran los cuerpos neuronales dopaminérgicos. (Tabla 7)

Durante el primer periodo de edad estudiado (4 y 12 meses), no se observan cambios en la actividad TH en ninguna de las dos estructuras estudiadas. Sin embargo, en el segundo periodo encontramos un ligero descenso en estriado (23%) que no llega a ser estadísticamente significativo y un descenso en sustancia negra del 55%, que sí es significativo ($p < 0,05$). Estos resultados están de acuerdo con trabajos previos (Fine y col., 1986; McGeer y McGeer, 1977).

TABLA 7. ACTIVIDAD TIROSINA HIDROXILASA "IN VIVO" EN ESTRIADO Y SUSTANCIA NEGRA DURANTE EL ENVEJECIMIENTO.

	Edad (meses)		
	4	12	24
Estriado	75 ± 6,0	75 ± 10,3	58 ± 5,2
Sustancia Negra	30 ± 7,4	33 ± 6,7	15 ± 0,5*a,b

Los resultados están expresados como pmol de L-DOPA/ mg proteína/ hora. Corresponden a la media ± D.E. El número de animales fue de al menos cuatro para cada experimento. Significación estadística: ANOVA seguido del test de Scheffe: *p< 0,05. a: comparado con 4 meses, b: comparado con 12 meses.

4.1.6.2. Estudio de la cantidad de enzima Tirosina Hidroxilasa en estriado y sustancia negra.

La cantidad de TH encontrada en animales jóvenes (4 meses) en estriado y en sustancia negra está en relación con la actividad enzimática en dichas áreas, mostrando el estriado una cantidad mayor que la sustancia negra. (Tabla 8).

En el periodo de 4 a 12 meses de edad de la rata, no se observan variaciones significativas en ninguna de las dos estructuras. Sin embargo, a los 24 meses, de manera similar a lo ocurrido con la actividad, el estriado presenta un descenso en la cantidad de enzima, (21,6%) sin ser significativo, mientras que en sustancia negra este descenso es del 32% y sí es significativo estadísticamente ($p < 0,05$).

En estriado la disminución de la actividad TH (23%) se corresponde con la disminución en la cantidad de enzima TH, mientras que en sustancia negra el descenso en la actividad TH es del 55% y la cantidad de enzima TH solo disminuye el 32%. Esta pérdida de actividad no corresponde únicamente a una disminución en la cantidad de enzima, lo cual indica una posible inactivación de la enzima.

TABLA 8. CUANTIFICACION DE TIROSINA HIDROXILASA EN ESTRIADO Y SUSTANCIA NEGRA DURANTE EL ENVEJECIMIENTO.

Absorbancia a 405 nm

Edad (meses)	4	12	24
Estriado	0,223 ± 0,034	0,189 ± 0,018	0,175 ± 0,022
Sustancia Negra	0,087 ± 0,007	0,085 ± 0,007	0,060±0,010*a,b

Los resultados se han obtenido midiendo la absorbancia a 405 nm mediante E.L.I.S.A. como se describe en Material y Métodos. Corresponden a la media ± D.E. de al menos cuatro animales para cada experimento. Significación estadística: ANOVA seguido del test de Scheffe: *p< 0,05. a: comparado con 4 meses, b: comparado con 12 meses.

4.2."ACTIVIDAD MOLECULAR" DE LA ENZIMA TIROSINA HIDROXILASA EN DIFERENTES CENTROS DEL SNC DURANTE EL PROCESO DEL ENVEJECIMIENTO.

Si consideramos un parámetro "actividad molecular" de la enzima TH como la razón entre la actividad y la cantidad de enzima podríamos tener una idea de la actividad por proteína enzimática en cada uno de los centros estudiados así como también ver si las posibles modificaciones en la actividad pueden ser justificadas por variaciones paralelas en la cantidad de enzima. Los resultados se expresan en la Tabla 9.

Como puede verse en estos centros existen fundamentalmente tres tipos de enzima: uno cuya "actividad molecular" esta por de bajo de 100 (hipocampo, corteza prefrontal y colículo superior); otro cuya actividad molecular esta entre 100-200 (bulbo olfatorio, estriado y sustancia negra) y otro cuya actividad se encuentra por encima de los 500 (hipotálamo, eminencia media e hipofisis). Estas diferencias de actividades deben ser debidas a que sean isoenzimas distintas o que su actividad se encuentre regulada "in vivo" por algún mecanismo a corto plazo.

TABLA 9. "ACTIVIDAD MOLECULAR" TIROSINA HIDROXILASA EN DIFERENTES CENTROS DEL SNC DURANTE EL ENVEJECIMIENTO.

	4 meses	12 meses	24 meses
Bulbo olfatorio	116	170	152
Colículo superior	53	65	60
Hipocampo	39	48	56
Corteza prefrontal	66	111	109
Hipotálamo	530	495	770
Eminencia media	923	617	869
Hipófisis	566	575	557
Estriado	134	158	132
Sustancia negra	150	155	100

4.3. MEDIDA DE LA CANTIDAD DE NEUROFILAMENTOS Y GLIA EN DIFERENTES CENTROS DEL SNC DURANTE EL ENVEJECIMIENTO.

Los cambios producidos en la actividad o fundamentalmente en la cantidad de la enzima tirosina hidroxilasa pueden ser debidos a cambios en los mecanismos de regulación de la enzima, cambios en la síntesis de proteínas o también producidos por muerte neuronal. La variación en la proporción neurona y glía se puede estudiar cuantificando la concentración de las proteínas de los neurofilamentos y la proteína ácida de glía. Con estas medidas también conoceremos la posible existencia de muerte neuronal. Una disminución en la cantidad de neurofilamentos indicará un proceso de muerte neuronal, y un aumento de proteína ácida de glía puede significar proliferación de la glía o también un proceso de activación de glía (que puede no ir acompañado de aumento de glía). De forma general la degeneración neuronal suele ir acompañada de gliosis.

4.3.1. BULBO OLFATORIO.

En esta estructura hemos utilizado como marcador específico de células neuronales la proteína neurofibrilar de 68 kDa y la proteína fibrilar ácida de glía como marcador de células gliales. Los neurofilamentos presentan valores de absorbancia muy similares a los encontrados para la cantidad de enzima TH. No encontramos diferencias significativas en ninguna de las tres edades.

En cuanto a los valores de proteína fibrilar ácida de glía, también permanecen invariables en bulbo olfatorio durante el envejecimiento. Estos resultados quedan reflejados en la Tabla 10.

TABLA 10. CUANTIFICACION DE NEUROFILAMENTOS Y DE GLIA EN BULBO OLFATORIO DURANTE EL ENVEJECIMIENTO.

Absorbancia a 405 nm

Edad (meses)	4	12	24
Neurofilamentos 68 kDa	0,068 ± 0,018	0,062 ± 0,019	0,052 ± 0,019
Proteína Acida de Glía	0,504 ± 0,045	0,513 ± 0,035	0,493 ± 0,056

Los resultados se han obtenido como se describe en Material y Métodos. Corresponden a la media ± D.E. El número de animales fue de mas de cinco en cada experimento. Significación estadística: ANOVA seguido del test de Scheffe.

4.3.2. COLICULO SUPERIOR

Encontramos una disminución significativa en el contenido de neurofilamentos de 68 kDa a los 12 meses que es del 17,5% ($p < 0,05$) y a los 24 meses del 36,7 % ($p < 0,01$) comparados con 4 meses. También observamos un descenso significativo entre 12 y 24 meses del 23,4 % , ($p < 0,05$).

En cuanto a la glía, no observamos diferencias estadísticamente significativas en el contenido de proteína fibrilar ácida de glía a pesar de que los valores observados a los 12 y a los 24 meses son superiores al observado a los 4 meses. Los resultados se muestran en la tabla 11.

TABLA 11. CUANTIFICACION DE NEUROFILAMENTOS Y DE GLIA EN COLICULO SUPERIOR DURANTE EL ENVEJECIMIENTO.

Absorbancia a 405 nm

Edad (meses)	4	12	24
Neurofilamentos 68 kDa	0,321 ± 0,022	0,265 ± 0,034 ^{*a}	0,203 ± 0,012 ^{**a,*b}
Proteína Acida de Glía	0,771 ± 0,062	0,832 ± 0,050	0,805 ± 0,045

Los resultados se han obtenido como se describe en Material y Métodos. Corresponden a la media ± D.E. El número de animales fue de más de cinco en cada experimento. Significación estadística: ANOVA seguido del test de Scheffe. *p<0,05; **p<0,01; a comparado con 4 meses, b comparado con 12 meses.

4.3.3. HIPOCAMPO

De todos los parámetros estudiados en el hipocampo, sólo encontramos variaciones en el contenido de neurofilamentos y en el contenido de glía. Los resultados se muestran en la tabla 12. Los neurofilamentos de 68 kDa descienden a los 24 meses de edad en un 33% si se compara con 4 meses y en un 43% si se compara con 12 meses ($p < 0,01$). En cuanto a la glía, a los 12 meses se observa un incremento del 16% de proteína ácida de glía comparado con 4 meses y a los 24 meses un incremento del 22% comparado con 4 meses ($p < 0,01$).

TABLA 12. CUANTIFICACION DE NEUROFILAMENTOS Y DE GLIA EN HIPOCAMPO DURANTE EL ENVEJECIMIENTO.

	Absorbancia a 405 nm		
Edad (meses)	4	12	24
Neurofilamentos 68 kDa	0,155 ± 0,004	0,184 ± 0,020	0,104 ± 0,013**a,b
Proteína Ácida de Glía	0,516 ± 0,033	0,602 ± 0,016*a	0,631 ± 0,025**a

Los resultados se han obtenido como se describe en Material y Métodos. Corresponden a la media ± D.E. El número de animales fue de más de cinco en cada experimento. Significación estadística: ANOVA seguido del test de Scheffe. *p<0,05; **p<0,01; a comparado con 4 meses, b comparado con 12 meses.

4.3.4. CORTEZA PREFRONTAL

La cantidad de neurofilamentos de 68 kDa permanece prácticamente invariable durante el envejecimiento.

En cuanto a la proliferación de glía, ésta es del 10% a los 12 meses, aunque este aumento no es estadísticamente significativo. A los 24 meses sí se observa un aumento significativo del 12 % ($p < 0,05$). Los resultados se muestran en la tabla 13.

TABLA 13. CUANTIFICACION DE NEUROFILAMENTOS Y DE GLIA EN CORTEZA PREFRONTAL DURANTE EL ENVEJECIMIENTO.

	Absorbancia a 405 nm		
Edad (meses)	4	12	24
Neurofilamentos 68 kDa	0,119 ± 0,006	0,107 ± 0,011	0,099 ± 0,019
Proteína Acida de Glía	0,516 ± 0,009	0,566 ± 0,0021	0,579 ± 0,052 ^{*a}

Los resultados se han obtenido como se describe en Material y Métodos. Corresponden a la media ± D.E. El número de animales fue de más de cinco en cada experimento. Significación estadística: ANOVA seguido del test de Scheffe. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; a comparado con 4 meses, b comparado con 12 meses.

4.3.5. EJE HIPOTALAMICO-HIPOFISARIO

En cuanto al contenido en neurofilamentos de 68 kDa, el hipotálamo es la estructura que presenta valores más altos, pero estos permanecen invariables durante el envejecimiento

La hipófisis muestra valores muy bajos, sin cambios estadísticamente significativos en ninguna de las tres edades estudiadas.

Respecto al contenido de proteína ácida de glía, también el hipotálamo muestra los valores más altos. En el primer periodo de edad estudiado (entre 4 y 12 meses) no presenta cambios, pero sí se observa un aumento significativo del 16% a los 24 meses ($p < 0,01$) con respecto a 4 y 12 meses.

La hipófisis muestra valores muy bajos comparados con los de hipotálamo y también presenta variaciones. Observamos un aumento del contenido de glía a los 12 meses del 24% (aunque no es estadísticamente significativo). El aumento observado a los 24 meses es del 77% y estadísticamente significativo comparado con 4 meses ($p < 0,05$).

En eminencia media no han sido determinados ninguno de estos dos parámetros, debido al tamaño tan pequeño de esta estructura, que no ha permitido disponer de la suficiente cantidad de muestra para las determinaciones. Para poder llevarlas a cabo, hubiésemos tenido que utilizar animales diferentes a los que no se hubiera podido determinar la actividad TH ni la cantidad de enzima. Esto supondría una variación con respecto a las demás estructuras estudiadas en las cuales todas las determinaciones se han llevado a cabo partiendo de la misma muestra. Los resultados se muestran en las tablas 14 y 15.

TABLA 14. CUANTIFICACION DE NEUROFILAMENTOS EN HIPOTALAMO E HIPOFISIS DURANTE EL ENVEJECIMIENTO.

	Absorbancia a 405 nm		
Edad (meses)	4	12	24
Hipotálamo	0,382 ± 0,029	0,387 ± 0,035	0,331 ± 0,096
Hipófisis	0,020 ± 0,001	0,040 ± 0,017	0,025 ± 0,010

Los resultados se han obtenido mediante E.L.I.S.A. como se describe en Material y Métodos. Corresponden a la media ± D.E. de al menos cuatro animales para cada experimento. Significación estadística: ANOVA seguido del test de Scheffe: *p< 0,05. a: comparado con 4 meses, b: comparado con 12 meses.

TABLA 15. CUANTIFICACION DE GLIA EN HIPOTALAMO E HIPOFISIS DURANTE EL ENVEJECIMIENTO.

Absorbancia a 405 nm

Edad (meses)	4	12	24
Hipotálamo	0,630 ± 0,028	0,632 ± 0,016	0,731 ± 0,022**
Hipófisis	0,053 ± 0,020	0,066 ± 0,006	0,094 ± 0,015*a

Los resultados se han obtenido mediante E.L.I.S.A. como se describe en Material y Métodos. Corresponden a la media ± D.E. de al menos cuatro animales para cada experimento. Significación estadística: ANOVA seguido del test de Scheffe: *p< 0,05. a: comparado con 4 meses, b: comparado con 12 meses.

4.3.6. VIA NIGRO-ESTRIADA.

Los resultados se muestran en la figura 15. No encontramos cambios significativos entre 4 y 12 meses de edad en ninguno de los parámetros estudiados ni en ninguna de las dos estructuras. Entre 12 y 24 meses sí se observa un descenso en la cantidad de neurofilamentos de 68 kDa en sustancia negra (28%) ($p < 0,05$) y en estriado (14%), no significativo. También en sustancia negra hemos medido los neurofilamentos de 160 kDa, los cuales muestran un descenso significativo (30%). Por el contrario, el contenido de glía aumenta significativamente en ambas estructuras a los 24 meses (16% en sustancia negra y 26% en estriado).

En conjunto estos resultados sugieren una considerable pérdida neuronal en sustancia negra, y muy leve en estriado, acompañada por una proliferación de glía en ambas estructuras. Resultados que concuerdan con estudios previos (O'Callaghan y Miller, 1991).

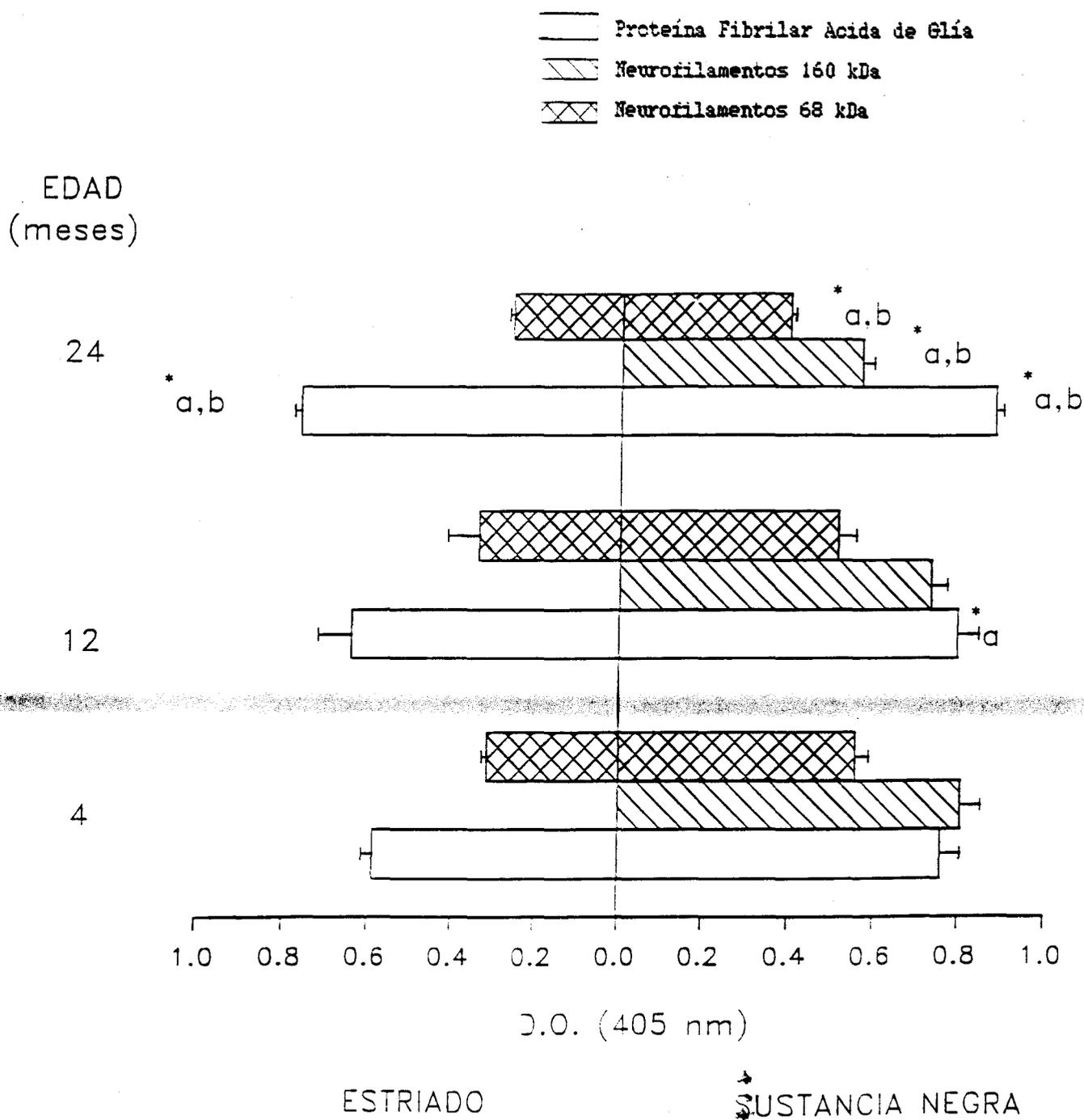


Figura 15. Cantidad de neurofilamentos y glía en estriado y sustancia negra durante el envejecimiento. Los resultados fueron obtenidos midiendo la absorbancia a 405 nm tal como se describe en Material y Métodos. El número de animales fue de al menos 5 en todas las determinaciones. Significación estadística: ANOVA seguido del test de Scheffe : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; a comparado con 4 meses, b comparado con 12 meses

4.4. DETERMINACION DEL CONTENIDO DE GRUPOS CARBONILOS DE HOMOGENADOS DE PROTEINAS DE DIFERENTES CENTROS DEL SNC DURANTE EL ENVEJECIMIENTO

Otro parámetro importante que junto con el de la muerte neuronal nos puede dar una idea del estado de envejecimiento del centro estudiado, es el daño producido por oxidación. El proceso de envejecimiento se justifica actualmente de una manera importante mediante la producción y acumulación de daños oxidativos producidos por radicales libres de oxígeno. Este daño se manifiesta por un aumento en la concentración de grupos carbonilos.

4.4.1. BULBO OLFATORIO.

El contenido en grupos carbonilos de proteínas ha sido ampliamente utilizado como medida de oxidación de proteínas. Los resultados quedan reflejados en la figura 16. Observamos una ligera tendencia al aumento de grupos carbonilos conforme aumenta la edad, a pesar de que los valores no muestran cambios significativos: $170,6 \pm 13,06$ a los 4 meses, $180,17 \pm 14,42$ a los 12 meses y $186,34 \pm 9,44$ a los 24 meses. Los valores están expresados en $\text{cpm}/\mu\text{g}$ de proteína. Estos resultados indican que esta estructura no se encuentra afectada por daños oxidativos.

4.4.2. COLICULO SUPERIOR

En esta estructura no encontramos diferencias en la actividad TH y tampoco en la cantidad de enzima durante el envejecimiento. Pero al encontrar una disminución significativa en el contenido de neurofilamentos, hemos medido los grupos carbonilos en homogenados de proteínas con idea de ver si esa modificación estaba relacionada con procesos oxidativos. Los resultados se muestran en la figura 17.

El valor más alto se observa a los 12 meses. Este incremento es estadísticamente significativo con respecto a 4 meses ($p < 0,01$). Sin embargo, a los 24 meses el valor es similar al encontrado en animales de 4 meses.

4.4.3. HIPOCAMPO

A pesar de que no encontramos diferencias ni en la actividad TH ni en la cantidad TH durante el envejecimiento, el encontrar una disminución significativa en el contenido de neurofilamentos, hemos medido los grupos carbonilos en homogenados de proteínas con idea de ver si la disminución era debida a procesos oxidativos. Los resultados se muestran en la figura 18. No apreciándose diferencias significativas en ninguna de las tres edades.

4.4.4. CORTEZA PREFRONTAL

Esta estructura presenta los valores más elevados de grupos carbonilos si la comparamos con las estudiadas anteriormente. Los resultados quedan reflejados en la figura 19. El valor más alto se observa a los 12 meses y el más bajo a los 24 meses. El descenso observado entre 12 y 24 meses es estadísticamente significativo ($p < 0,05$).

En esta estructura hemos encontrado unos resultados muy particulares, no hay disminución de la actividad TH con la edad sino aumento pero no aumenta la cantidad de enzima. De esta manera no podemos considerar que la enzima esté afectada por daños oxidativos. Los valores de la medida de carbonilos lo confirman.

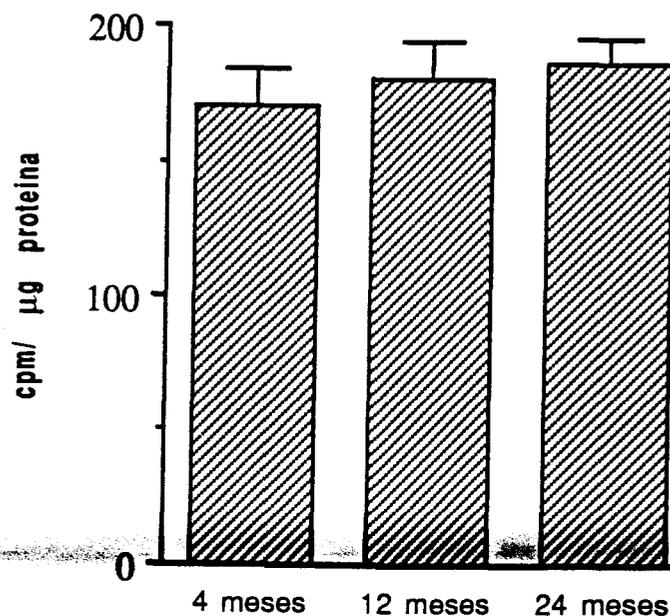


Figura 16. Variación de la cantidad de grupos carbonilos en bulbo olfatorio durante el envejecimiento. Los resultados se han obtenido como se describe en Material y Métodos. Están expresados en cpm/ μ g proteína. Corresponden a la media \pm D.E. de al menos cinco determinaciones. Significación estadística: ANOVA seguido del test de Scheffe: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; a comparado con 4 meses, b comparado con 12 meses.

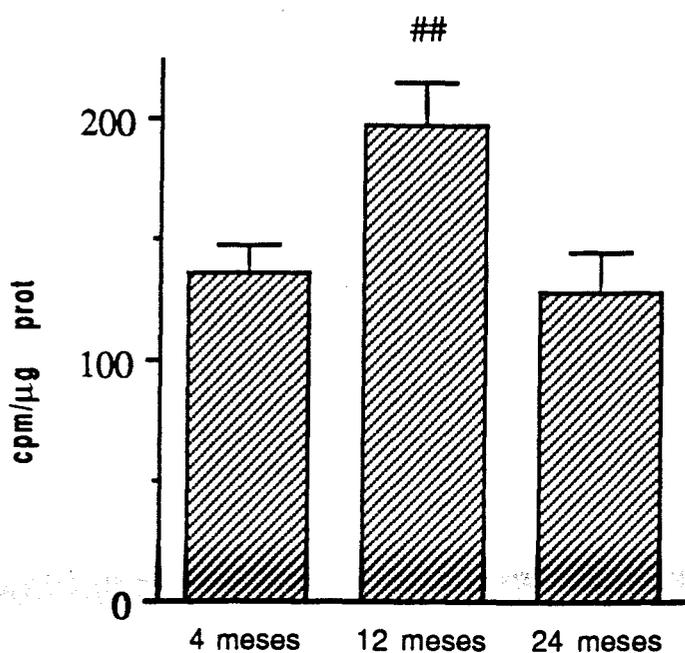


Figura 17. **Variación de la cantidad de grupos carbonilos en colículo superior durante el envejecimiento.** Los resultados se han obtenido como se describe en Material y Métodos. Están expresados en cpm/ μ g proteína. Corresponden a la media \pm D.E. de al menos cinco determinaciones. Significación estadística: ANOVA seguido del test de Scheffe: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; a comparado con 4 meses, b comparado con 12 meses.

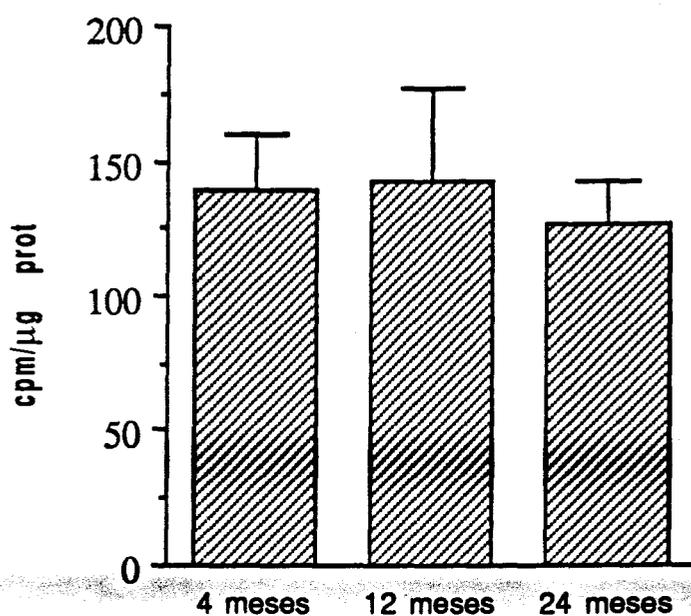


Figura 18. **Variación de la cantidad de grupos carbonilos en hipocampo durante el envejecimiento.** Los resultados se han obtenido como se describe en Material y Métodos. Están expresados en cpm/ μ g proteína. Corresponden a la media \pm D.E. de al menos cinco determinaciones. Significación estadística: ANOVA seguido del test de Scheffe: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; a comparado con 4 meses, b comparado con 12 meses.

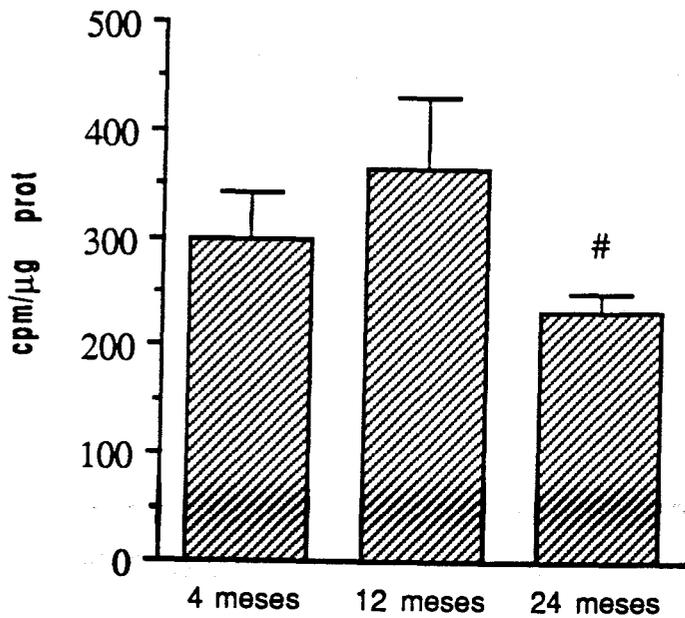


Figura 19. Variación de la cantidad de grupos carbonilos en corteza prefrontal durante el envejecimiento. Los resultados se han obtenido como se describe en Material y Métodos. Están expresados en cpm/ μ g proteína. Corresponden a la media \pm D.E. de al menos cinco determinaciones. Significación estadística: ANOVA seguido del test de Scheffe: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; a comparado con 4 meses, b comparado con 12 meses.

4.4.6. VIA NIGRO-ESTRIADA.

Los resultados están mostrados en la Tabla 16. El estriado no muestra ningún cambio significativo durante todo el periodo de envejecimiento estudiado, aunque muestra valores superiores a los 12 y 24 meses de edad. Por el contrario, la sustancia negra muestra un aumento con la edad del 47% a los 12 meses (no significativo) y del 68% a los 24 meses ($p < 0,05$).

TABLA 16. MEDIDA DE GRUPOS CARBONILOS EN HOMOGENADOS DE ESTRIADO Y SUSTANCIA NEGRA DURANTE EL ENVEJECIMIENTO.

Edad (Meses)	4	12	24
Estriado	133,0 ± 6,7	149,0 ± 28,8	144,4 ± 20,6
Sustancia Negra	81,6 ± 8,4	120,2 ± 11,8	137,0 ± 5,5*a,b

Los resultados están en cpm/ μ g proteína Corresponden a la media \pm D.E. El número de animales fue de al menos cuatro para cada experimento. Significación estadística: ANOVA seguido del test de Scheffe: * $p < 0,05$. a: comparado con 4 meses, b: comparado con 12 meses.

4.5. DETERMINACION DE GRUPOS CARBONILOS DE LA ENZIMA TIROSINA HIDROXILASA EN SUSTANCIA NEGRA DURANTE EL ENVEJECIMIENTO.

De todos los resultados ya descritos podemos ver que la vía nigro-estriada es la que parece sufrir un mayor proceso de envejecimiento y dentro de ésta la sustancia negra. La sustancia negra es la estructura que muestra una mayor disminución de la actividad TH, la cual no corresponde con la disminución de la cantidad de enzima encontrada y con la muerte neuronal producida, lo cual permite pensar en la existencia de un proceso de inactivación. Al encontrar un incremento significativo en el contenido de grupos carbonilos en homogenados de sustancia negra, hemos pensado que la enzima TH podría estar afectada por daños oxidativos en esta estructura. Por esta razón, hemos medido los grupos carbonilos de la enzima específicamente. Los resultados se muestran en la tabla 17.

No encontramos diferencias significativas en el periodo comprendido entre 4 y 12 meses, como tampoco se encontraban en ninguno de los estudios anteriores, pero sí se observa un aumento del 59% en el contenido de carbonilos en la rata vieja cuando se compara con la joven ($p < 0,05$).

TABLA 17. MEDIDA DE GRUPOS CARBONILOS DE LA ENZIMA TIROSINA HIDROXILASA EN SUSTANCIA NEGRA DURANTE EL ENVEJECIMIENTO.

Edad (Meses)	4	12	24
cpm TH	288 ± 41,3	293 ± 34,7	459 ± 2,5 ^{*a}
cpm/cantidad TH	3029 ± 479	4294 ± 465	9514 ± 1365 ^{*a}

Los resultados se han obtenido como se describe en Material y Métodos. Una alícuota de homogenado de sustancia negra fue incubada con borohidruro sódico tritiado. Seguidamente la TH se inmunoprecipitó con un anticuerpo monoclonal y se midió la radiactividad incorporada a la enzima. La cantidad de TH fue determinada mediante E.L.I.S.A. El número de animales fue de cuatro para cada experimento. Significación estadística: ANOVA seguido de test de Scheffe: *p<0,05. a comparado con cuatro meses.

4.6. ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA OXIDACIÓN "IN VITRO" SOBRE LA ACTIVIDAD TH, EL CONTENIDO DE GRUPOS CARBONILOS DE HOMOGENADOS DE PROTEÍNAS Y EL CONTENIDO DE GRUPOS CARBONILOS DE LA ENZIMA TH.

La descripción de un aumento en la cantidad de grupos carbonilos en la enzima TH de sustancia negra parece apunta a que la pérdida de su actividad descrita durante el proceso del envejecimiento se deba a un proceso de inactivación por oxidación, proceso ya descrito en otras enzimas. Sin embargo, para que esto tenga una mayor fiabilidad se necesita demostrar que la TH puede ser inactivada mediante un proceso oxidativo y que este conlleva un aumento en su contenido de grupos carbonilos. Estos experimentos los llevamos a cabo en homogenados de estriado de animales jóvenes con el fin de al tener una mayor cantidad de TH y facilitar las medidas.

4.6.1. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD TIROSINA HIDROXILASA "IN VITRO" EN HOMOGENADOS DE ESTRIADO TRAS OXIDACIÓN.

La actividad "in vitro" TH fue monitorizada bajo tres sistemas diferentes de producción de radicales libres. Uno de ellos incluía ácido ascórbico y cloruro férrico y otro ácido ascórbico y sulfato de cobre, sistemas descritos como generadores de radicales libres (Levine, 1983). Sin embargo, ninguno de los dos pudo ser utilizado para monitorizar la actividad TH, ya que observamos que al tratar los homogenados con ascórbico y cloruro férrico, la actividad aumentaba. Esta observación está relacionada con el hecho de que la TH puede unirse al ión ferroso de manera reversible, siendo su actividad catalítica estrictamente dependiente de la presencia de este ión (Haavick y col., 1991).

Esta hecho nos llevó a utilizar otro sistema generador de radicales libres: ácido ascórbico y sulfato de cobre. Observamos que bajo estas condiciones, la actividad TH era fuertemente inhibida. Esta inhibición parece ser debida únicamente a la presencia del ión cúprico. Para comprobarlo, incubamos el homogenado de estriado con sulfato de cobre en ausencia de ácido ascórbico e igualmente observamos una alta inhibición de la actividad TH. Debido a la interferencia de los cationes divalentes con la actividad TH, decidimos emplear un sistema productor de radicales libres completamente distinto como el peróxido de hidrógeno (Halliwell, 1992). Este compuesto es producido debido a la acción de la enzima monoamino oxidasa en sistemas catecolaminérgicos. Como primer paso de nuestros experimentos incubamos el homogenado de estriado en presencia de concentraciones crecientes de H_2O_2 durante 30 minutos. Encontramos una disminución de la actividad TH dependiente del tiempo y de la concentración de H_2O_2 solo a concentraciones mayores de 30 mM. Por lo tanto, decidimos utilizar el H_2O_2 a la concentración de 40 mM. Los resultados quedan reflejados en la figura 20. Observamos una disminución de la actividad TH dependiente del tiempo que es del 20% a los 5 minutos con respecto a controles sin oxidar, llegando hasta el 45% a los 20 minutos.

4.6.2.MEDIDA DE GRUPOS CARBONILOS EN HOMOGENADOS DE ESTRIADO TRAS OXIDACIÓN

El contenido en grupos carbonilos de los homogenados de proteínas fue ligeramente afectado por el H_2O_2 . Observamos un ligero aumento con respecto al tiempo como puede verse en la figura 2, que es del 5,6 % a los 5 minutos con respecto a controles sin oxidar, llegando hasta el 21,7% a los 20 minutos, aunque estas diferencias no son estadísticamente significativas.

4.6.3.MEDIDA DE GRUPOS CARBONILOS DE LA ENZIMA TIROSINA HIDROXILASA DE ESTRIADO TRAS OXIDACIÓN.

El contenido de grupos carbonilos de la enzima TH con respecto al tiempo de oxidación con H_2O_2 aumenta considerablemente. (Figura 20).

Tras 10 minutos de tratamiento encontramos un aumento del 60% con respecto a controles no oxidados, el cual se mantiene a los 20 minutos.

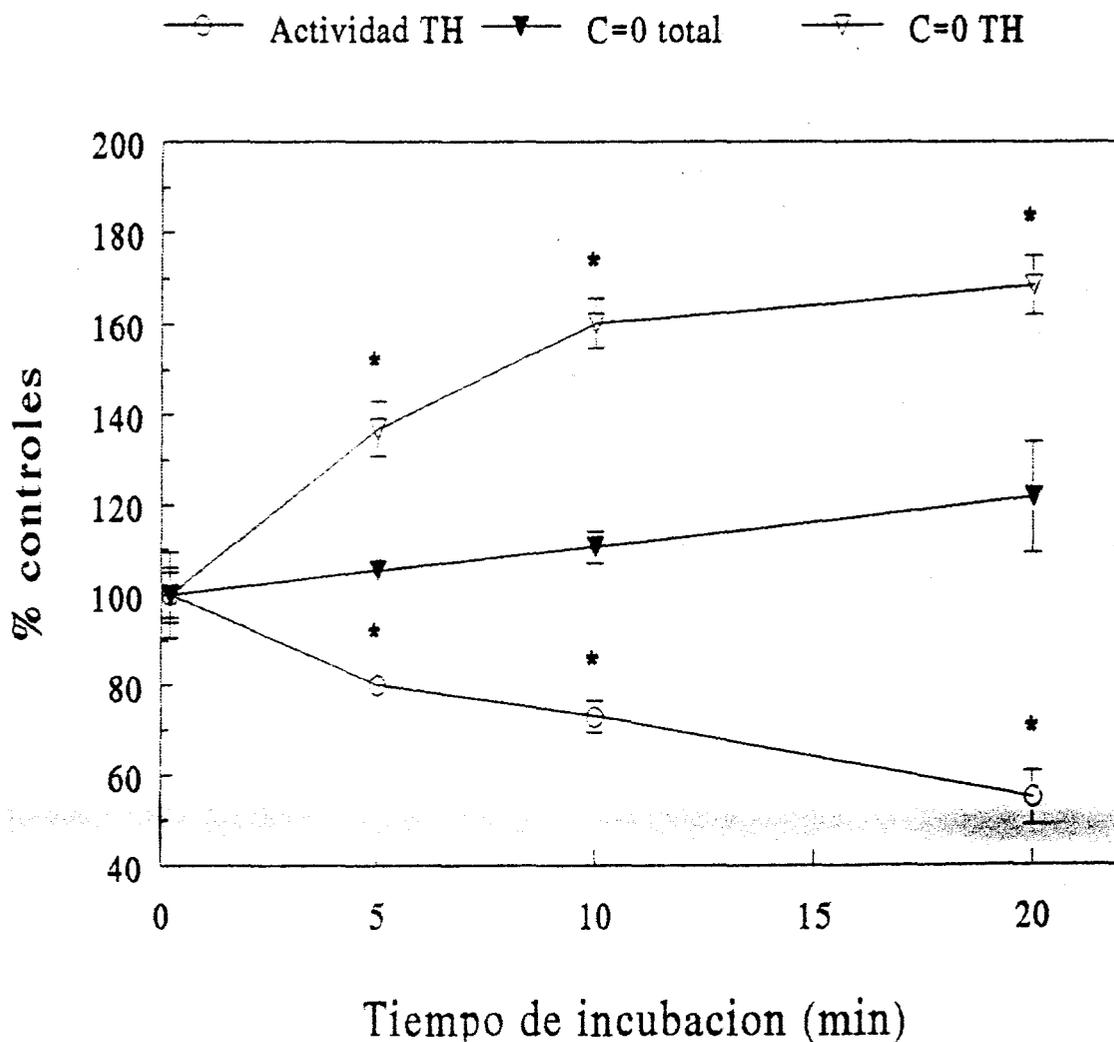


Figura 20. Efecto del efecto de la oxidación "in vitro" sobre la actividad TH, el contenido de grupos carbonilos en homogenados de proteínas y el contenido de grupos carbonilos de la enzima TH. Homogenados de estriado fueron incubados con 40 mM de H_2O_2 . Los resultados están expresados como porcentajes respecto a controles sin oxidar y corresponden a la media \pm D.E. de cuatro determinaciones independientes. Los valores absolutos obtenidos para controles fueron los siguientes: Actividad TH "in vitro": 36,7 nmol/mg proteína/h; grupos carbonilos de homogenados de proteínas: 133 cpm/ μ g proteína; grupos carbonilos de la enzima TH: 0,07 cpm/intensidad de banda en unidades arbitrarias. Significación estadística: ANOVA seguido del test de Scheffe : * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; a comparado con 4 meses, b comparado con 12 meses.

4.7. ESTUDIO DEL TRATAMIENTO CON DEPRENILO EN ANIMALES VIEJOS. ESTUDIO DE LA VIA NIGRO-ESTRIADA.

El deprenilo es un compuesto al que se le atribuyen algunas propiedades que podríamos denominar anti-envejecimiento. Basándonos en nuestros resultados anteriores hemos estudiado el efecto del deprenilo en la vía nigro-estriada, que es la que ha mostrado un mayor o más rápido proceso de envejecimiento sufriendo mayores cambios: inactivación de la enzima TH, muerte neuronal, aumento de grupos carbonilos. Estos hechos ocurren en sustancia negra, aunque también estudiaremos el estriado de forma comparativa.

4.7.1. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD TIROSINA HIDROXILASA "IN VIVO"

La actividad TH fue medida de la misma forma que en nuestro estudio durante el envejecimiento, utilizando NSD-1015 como inhibidor específico de la enzima L-aminoácido aromático descarboxilasa. El estriado presenta más del doble de actividad que la sustancia negra. Los controles tratados con solución salina muestran valores de actividad TH muy similares a los encontrados en animales viejos en nuestro estudio durante el envejecimiento. Los resultados están mostrados en la tabla 18. En sustancia negra no encontramos variaciones significativas en los animales tratados con respecto a los controles. Por el contrario, en estriado observamos una disminución en la actividad del 35 % en los animales que recibieron deprenilo ($p < 0,05$).

TABLA 18. ACTIVIDAD TIROSINA HIDROXILASA "IN VIVO" EN ESTRIADO Y SUSTANCIA NEGRA DE RATAS VIEJAS TRATADAS CON DEPRENILO.

	<u>CONTROLES</u>	<u>DEPRENILO</u>
Estriado	61,60 ± 8,02	39,54 ± 3,60*
Sustancia Negra	22,20 ± 3,25	23,17 ± 2,73

Los resultados están expresados como pmol de L-DOPA formados/ mg de proteína/ hora. Corresponden a la media ± DE de cuatro experimentos. La significación estadística fue obtenida mediante el test *t* de Student: **p*<0,05; ***p*<0,01.

4.7.2.MEDIDA DE LA CANTIDAD DE ENZIMA TIROSINA HIDROXILASA.

Al igual que para la actividad el estriado muestra valores mayores que la sustancia negra. Los resultados se muestran en la tabla 19. Los valores son del orden de los encontrados en nuestro estudio durante el envejecimiento. En el estriado el contenido de TH permanece invariable con el tratamiento, mientras que en sustancia negra se observa un aumento significativo del 86% ($p < 0,01$), con respecto a los controles no tratados. El contenido de enzima TH en sustancia negra de animales viejos tratados con deprenilo llega a ser casi el doble del observado en animales jóvenes.

TABLA 19 .CUANTIFICACION DE TIROSINA HIDROXILASA EN SUSTANCIA NEGRA Y ESTRIADO DE RATAS VIEJAS TRATADAS CON DEPRENILO.

Absorbancia a 405 nm

	<u>CONTROLES</u>	<u>DEPRENILO</u>
Estriado	0,184 ± 0,021	0,196 ± 0,006
Sustancia Negra	0,072 ± 0,012	0,155 ± 0,032**

Los resultados se han obtenido como se describe en Material y Métodos. Corresponden a la media ± DE de al menos cinco experimentos. La significación estadística fue obtenida a partir del test *t* de Student: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.7.3. MEDIDA DE LA CANTIDAD DE NEUROFILAMENTOS Y GLIA

Hemos estudiado el contenido en neurofilamentos de 68 kDa y en proteína ácida de glía mediante E.L.I.S.A. En ambas estructuras se puede ver un ligero aumento en el contenido de neurofilamentos, en los animales tratados que es del 9% en sustancia negra y del 12% en estriado, aunque estas diferencias no son estadísticamente significativas.(Tabla 20)

En cuanto al contenido de glía, en sustancia negra de animales tratados se observa que disminuye significativamente (3%) ($p < 0,05$) con respecto a controles, pero en estriado se observa lo contrario, un aumento de glía del 10 % ($p < 0,05$).

TABLA 19. CUANTIFICACION DE NEUROFILAMENTOS Y DE GLIA EN ESTRIADO Y SUSTANCIA NEGRA DE RATAS VIEJAS TRATADAS CON DEPRENILO.

Absorbancia a 405 nm

	<u>Neurofilamentos 68 kDa</u>		<u>Proteína Acida de Glía</u>	
	<u>CONTROLES</u>	<u>DEPRENILO</u>	<u>CONTROLES</u>	<u>DEPRENILO</u>
Estriado	$0,289 \pm 0,040$	$0,325 \pm 0,070$	$0,729 \pm 0,030$	$0,804 \pm 0,040^*$
Sustancia Negra	$0,327 \pm 0,035$	$0,357 \pm 0,009$	$0,772 \pm 0,010$	$0,755 \pm 0,006^*$

Los resultados se han obtenido como se describe en Material y Métodos. Corresponden a la media \pm DE de al menos cinco experimentos. La significación estadística fue obtenida a partir del test *t* de Student: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.7.4.DETERMINACION DEL CONTENIDO DE GRUPOS CARBONILOS EN HOMOGENADOS DE PROTEÍNAS

La medida de grupos carbonilos es un índice del daño oxidativo producido en proteínas. Hemos visto como en el envejecimiento estaba afectada la sustancia negra y particularmente la enzima TH. Con esta medida pretendemos saber si el deprenilo mejora o previene los daños causados por oxidación reflejados en una variación en el contenido de grupos carbonilos de las proteínas. Los resultados se muestran en la tabla 21. Los controles muestran valores del mismo orden a los encontrados en nuestro estudio durante el envejecimiento.

En estriado no se observan variaciones significativas, por el contrario en sustancia negra se observa una disminución del 47,5 % ($p < 0,01$) en los animales tratados con respecto a los controles. El valor de cpm/ μ g proteína llega a ser inferior al observado en animales de 4 meses.

TABLA 21. MEDIDA DE GRUPOS CARBONILOS EN HOMOGENADOS DE PROTEINAS DE ESTRIADO Y SUSTANCIA NEGRA DE RATAS VIEJAS TRATADAS CON DEPRENILO.

	<u>CONTROLES</u>	<u>DEPRENILO</u>
Estriado	141,96 ± 28,1	143,48 ± 16,8
Sustancia Negra	136,19± 21,8	71,52 ± 13,16**

Los resultados están expresados como cpm/ μ g de proteína. Corresponden a la media \pm DE de al menos cinco experimentos. La significación estadística fue obtenida a partir del test *t* de Student: * $p < 0,05$., ** $p < 0,01$.

4.7.5 DETERMINACION DEL CONTENIDO DE GRUPOS CARBONILOS DE LA ENZIMA TIROSINA HIDROXILASA EN SUSTANCIA NEGRA.

Al observar una disminución significativa de la cantidad de grupos carbonilos en homogenados de sustancia negra, hemos medido los grupos carbonilos específicos de la enzima TH en esta estructura con idea de ver si esta mejora afecta a la enzima particularmente. Los resultados quedan reflejados en la tabla 22. Observamos una disminución en los valores de cpm del 42,3 % en los animales tratados con respecto a los controles ($p < 0,01$).

TABLA 22. MEDIDA DE GRUPOS CARBONILOS DE LA ENZIMA TIROSINA HIDROXILASA EN SUSTANCIA NEGRA DE RATAS VIEJAS TRATADAS CON DEPRENILO.

	<u>CONTROLES</u>	<u>DEPRENILO</u>
cpm TH	471,4 ± 73,8	271,9 ± 50,0**
cpm/cantidad TH	5623,5 ± 689	1578,2 ± 115**

Los resultados se han obtenido como se describe en Material y Métodos. Corresponden a la media ± DE de al menos cinco experimentos. La significación estadística fue obtenida a partir del test *t* de Student: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.8. MEDIDA DE LOS NIVELES PLASMATICOS DE IGF-I EN RATAS VIEJAS TRATADAS CON DEPRENILO.

Las catecolaminas hipotalámicas juegan un papel importante en la regulación de las funciones del sistema hipotalámico-hipofisario y por tanto en la secreción hormonal. Está demostrado que la dopamina liberada en el hipotálamo aumenta la secreción de GH. Por otra parte, hemos visto que el deprenilo parece tener un efecto protector en animales viejos de la enzima TH, la cual cataliza el paso inicial de la síntesis de catecolaminas. Por ello nos ha parecido interesante medir los niveles de GH, hormona secretada por la hipófisis, en animales tratados con deprenilo, ya que éstos pueden verse afectados por las modificaciones que sufran los sistemas catecolaminérgicos. Debido a que la secreción de GH sufre numerosas fluctuaciones diurnas y se ve influenciada por numerosos factores, como por ejemplo, estado nutricional, ejercicio, estrés..., los niveles de GH pueden ser medidos indirectamente midiendo los niveles plasmáticos de IGF-I o somatomedina C, ya que estos guardan estrecha relación con los niveles de GH. Las medidas se han realizado mediante R.I.A., tal como se describe en Material y Métodos. Los niveles de IGF-I para cada muestra individual se han obtenido extrapolando en la curva realizada con los estándares suministrados en el kit de medida.

Encontramos un aumento significativo en el grupo de animales tratados con deprenilo. Este aumento es del 61 % con respecto a controles tratados con solución salina. Los resultados quedan reflejados en la tabla 23.

TABLA 23 . MEDIDA DE LOS NIVELES DE IGF-I EN SUERO DE RATAS VIEJAS TRATADAS CON DEPRENILO

CONTROLES

557,847 ± 65,40

DEPRENILO

899,280 ± 55,42**

Los resultados están expresados en ng IGF-I/ml. El número de experimentos fue de cuatro. La significación estadística fue obtenida mediante el test *t* de Student: **p*< 0,05; ***p*< 0,01.

5. DISCUSION

5.1. ACTIVIDAD TH Y CANTIDAD DE ENZIMA TH EN DIFERENTES CENTROS DEL SNC.

Todos los centros estudiados presentan actividad TH ya que todos ellos poseen terminales o cuerpos neuronales dopaminérgicos. La actividad TH parece estar relacionada fundamentalmente con la cantidad de DA descrita para dichos centros (). Esto es lógico teniendo en cuenta que es la enzima limitante y reguladora de su síntesis (Nagatsu y col., 1964). Por otra parte, la actividad TH también parece estar relacionada con la cantidad de enzima TH. Nosotros observamos la mayor actividad y la máxima cantidad de enzima en estriado. Esto está de acuerdo con otros trabajos en los que se pone de manifiesto una distribución heterogénea de la TH en el cerebro de rata (Björklund y Lindwall, 1984), la cual es paralela a la distribución de los sistemas dopaminérgicos. Mediante técnicas de autorradiografía se ha observado la mayor intensidad de marcaje en áreas con gran inervación dopaminérgica como el estriado (Raisman-Vozari y col., 1991). Sin embargo, cuando relacionamos la actividad con la cantidad de enzima, calculando la "actividad molecular", observamos notables diferencias entre la enzima de unos centros y de otros.

La proteína enzimática con mayor actividad "in vivo" es la de los centros, eminencia media, hipófisis e hipotálamo. Además son unos centros con una fuerte actividad noradrenérgica. Esto parece importante ya que la síntesis de noradrenalina también tiene como enzima limitante a la enzima TH. Estos centros están implicados en el control neuroendocrino, ya que regulan la liberación de algunas hormonas. Estas hormonas también ejercen efectos sobre la síntesis de catecolaminas. Esto quiere decir que la enzima en estas estructuras puede estar regulada por un mecanismo adicional, que justificaría las diferencias observadas con respecto a otros centros que no participan en el control hormonal.

Con una menor actividad se encuentran los centros bulbo olfatorio, sustancia negra y estriado. Estos son centros de gran inervación dopaminérgica. La sustancia negra tiene neuronas dopaminérgicas, con una concentración de DA relativamente pequeña y una pequeña actividad TH. Sin embargo su "actividad molecular" es semejante a la de los otros

dos centros. El estriado es un sistema dopaminérgico muy importante, presenta una elevada concentración de DA, posiblemente la más elevada de cerebro, presentando también una alta actividad TH, así como una elevada cantidad de enzima. Su "actividad molecular" es semejante a la encontrada para la sustancia negra, lo parece indicar un grado semejante de actividad. En cuanto al bulbo olfatorio, éste recibe proyecciones dopaminérgicas cuyos cuerpos celulares están situados en el área ventral tegmental, de una forma similar al estriado que recibe las proyecciones desde la sustancia negra, lo que ocurre es que la vía que va al olfatorio no es tan intensa como la que va al estriado, con lo cual muestra una actividad TH más baja y una menor cantidad de enzima.

Los centros que presenta menor actividad molecular son el hipocampo, la corteza prefrontal y el colículo superior. Hipocampo y corteza prefrontal son centros del denominado sistema límbico. Se caracterizan también por tener una baja concentración de DA, menor que los otros centros estudiados. Esta baja concentración de DA puede justificar la baja actividad "in vivo" encontrada. Sin embargo, este hecho no justifica la relativamente alta concentración de TH encontrada. En este caso esta enzima parece tener una menor actividad que la TH de las otras estructuras. Esto no tiene más remedio que hacer pensar en la diferencia en el tipo de proteína enzimática o en el diferente estado de regulación.

5.2. VARIACIONES DE LA ACTIVIDAD TH Y DE LA CANTIDAD DE ENZIMA TH DURANTE EL PROCESO DE ENVEJECIMIENTO.

Durante el proceso del envejecimiento una parte de los centros estudiados no sufrieron variaciones ni en la actividad TH ni tampoco en su cantidad. Estas estructuras fueron bulbo olfatorio, hipocampo, colículo superior, eminencia media e hipófisis. El hipotálamo no sufrió variación en la actividad TH. Sin embargo sí hubo una disminución en la cantidad de enzima. Estos dos hechos producen por tanto un aumento de su "actividad molecular", lo que parece indicar un proceso de activación de la enzima, posiblemente como mecanismo compensatorio para mantener la concentración de DA en condiciones en las que ha habido una disminución

en la cantidad de enzima. Hechos semejantes se han descritos en algunos otros procesos que producen los mismos efectos, disminución de la cantidad de enzima ().

La corteza prefrontal se comporta de una manera esencialmente diferente a todas las demás estructuras. Durante el proceso del envejecimiento se produce un aumento de su actividad. Este aumento tiene lugar en el primer periodo estudiado, de 4 a 12 meses de edad de la rata. Durante el periodo de envejecimiento entre 12 y 24 meses no hay modificación de la actividad.

El sistema nigro-estriado parece que es, desde el punto de vista de nuestro estudio, el sistema más sensible al proceso del envejecimiento. Este dato parece estar de acuerdo con el hecho conocido de que los ganglios basales presentan durante el envejecimiento un déficit en sus sistemas de neurotransmisión (Finch, 1981), siendo la transmisión dopaminérgica la más afectada (McGeer y col, 1971), como lo demuestra la disminución de DA y sus metabolitos observada en la sustancia negra de rata durante el proceso del envejecimiento (Venero y col., 1989).

Nuestros resultados muestran una ligera pérdida de actividad y de cantidad de enzima en estriado. Sin embargo, la sustancia negra, presenta durante el periodo de 12 a 24 meses, una fuerte pérdida de actividad que supera el 50 %. Estudiando la cantidad de enzima en esta estructura, también observamos que sufre un descenso acusado del 30 %. En estriado, podemos considerar que el descenso en la actividad está producido por disminución en la cantidad de enzima, ya que ambos son del mismo orden. Sin embargo, en sustancia negra, la pérdida de cantidad de enzima no justifica la pérdida de actividad enzimática, produciéndose una fuerte disminución de la "actividad molecular". Este hecho parece indicar que en este centro, sustancia negra, se ha producido una inactivación de la enzima TH durante el proceso de envejecimiento.

5.3. VARIACIONES DE LA CANTIDAD DE NEUROFILAMENTOS Y GLIA DURANTE EL PROCESO DEL ENVEJECIMIENTO.

Las modificaciones en la cantidad de enzima pueden ser producidas por dos causas principales: a) disminución de la síntesis de proteínas durante el proceso del envejecimiento, lo cual ha sido descrito como un hecho general del proceso del envejecimiento (Fando y col., 1980); y b) muerte neuronal.

Durante el proceso del envejecimiento, los centros estudiados muestran un comportamiento diferente. Unos parecen sufrir un proceso de envejecimiento poco acusado, ya que no muestran cambios en el contenido de neurofilamentos y tampoco en glía. Entre estos centros se encuentra fundamentalmente el bulbo olfatorio. Otros presentan un mayor grado de envejecimiento; desde nuestro punto de vista, serían aquellos en los que no habiendo cambios en la cantidad de neurofilamentos, se produce un aumento en la concentración/actividad de la glía. En este segundo grado y en orden creciente se encontrarían: la corteza prefrontal que sufre un aumento de proteína ácida de glía del 12 %, el hipotálamo que sufre un aumento del 16% y la hipófisis que sufre un fuerte aumento del 77%. En otro nivel, con un grado más elevado de envejecimiento, estarían aquellos centros que sufren al mismo tiempo un aumento de la cantidad de glía acompañado de una destacada disminución de la concentración de neurofilamentos, lo que parecería indicar que se ha producido un proceso de muerte neuronal. En este caso se encuentra el estriado, que sufre una pequeña disminución de neurofilamentos (16%) la cual está acompañada de un marcado aumento de glía (26%) y la sustancia negra que muestra una marcada disminución en la cantidad de neurofilamentos (28%) acompañada de un aumento, relativamente bajo, de glía (16%). El hipocampo es otra estructura que sufre un proceso bastante marcado de envejecimiento, ya que presenta una disminución de neurofilamentos del 33 % y un aumento de glía del 22%. El colículo superior es un centro que aunque no presenta modificación en la cantidad de glía, sí muestra una fuerte pérdida de neurofilamentos, la cual comienza a una edad temprana, a los 12 meses ya se produce una pérdida del 12 % y a los 24 meses esta representa el 37%.

Si comparamos estos datos con los obtenidos para la enzima TH, observamos que el sistema más afectado por el proceso de envejecimiento es el sistema dopaminérgico de la vía nigro-estriada, fundamentalmente la sustancia negra. En esta estructura se produce una fuerte pérdida de la actividad TH (55%), la cual no puede ser justificada por la disminución

de la cantidad de enzima (32%). Sin embargo, la disminución de la cantidad de enzima TH sí puede ser debida a la muerte de neuronas dopaminérgicas. Estos datos apuntan a que la pérdida de actividad TH observada en sustancia negra de ratas viejas sea debida a un proceso de inactivación de la enzima. Si consideramos el parámetro "actividad molecular", observamos que en el estriado permaneció invariable durante todo el periodo estudiado, sin embargo, en la sustancia negra disminuyó a los 24 meses.

En otros centros en los que se produce una pérdida de neuronas, como ocurre en hipocampo, podemos pensar que se trata de neuronas no dopaminérgicas, lo que estaría de acuerdo con el hecho de que no se observan cambios en la actividad TH ni en la cantidad de enzima TH.

5.4. DETERMINACION DE GRUPOS CARBONILOS Y DAÑO OXIDATIVO

La inactivación de enzimas puede ser producida por daños oxidativos (McGeer y col., 1988; Halliwell, 1992; Ames y col., 1993). Con el fin de profundizar más en el estudio del proceso de envejecimiento, medimos la concentración de grupos carbonilos en las proteínas en homogenados de los diferentes centros como índice de daño oxidativo. La cantidad de grupos carbonilos en las proteínas es una buena medida del estado de oxidación de las proteínas (Ahn y col., 1987).

Las concentraciones de grupos carbonilos en los distintos centros a los 4 meses de la rata, (adulto joven) no fueron iguales. Estas diferencias no indican que cada estructura tenga un distinto grado de oxidación, sino más bien la diferente proporción de las distintas proteínas en los centros estudiados. Desde el punto de vista del daño oxidativo producido durante el proceso del envejecimiento, el dato importante es la variación de la cantidad de grupos carbonilos producida durante este periodo. El centro que presenta un mayor nivel de daño oxidativo es la sustancia negra. Al mismo tiempo, la corteza prefrontal presenta una disminución en los grupos carbonilos de las proteínas en el periodo comprendido entre 12 y 24 meses, lo que parece indicar un aumento de sistemas de protección frente a las oxidaciones, o una modificación a nivel de sus proteínas. Esta

variación es paralela al aumento de la actividad TH observado a los 24 meses.

5.5 POSIBLE INACTIVACION DE LA ENZIMA TH EN SUSTANCIA NEGRA.

Como hemos mencionado anteriormente, la sustancia negra presenta un marcado aumento de la concentración de grupos carbonilos, lo que indica un alto nivel de daño oxidativo. Además sufre una notable pérdida neuronal (28%), que justificaría la disminución encontrada en la cantidad de la enzima TH (32%). Estos datos indican que la neuronas dopaminérgicas están especialmente afectadas. Por otra parte, la disminución de la cantidad de enzima TH, no justifica la fuerte disminución de la actividad TH encontrada (55%) . Esto nos lleva a pensar que la enzima TH, en sustancia negra, está afectada por un proceso de inactivación.

Teniendo en cuenta el aumento de la concentración en grupos carbonilos encontrado en las proteínas de esta estructura, podemos suponer que este daño oxidativo puede ser el responsable de la inactivación de la enzima TH. Este hecho ha sido descrito para otras enzimas durante el proceso de envejecimiento (Machado y col., 1991; Stadman, 1993) tanto en experimentos "in vitro" como en procesos "in vivo". Stadman y colaboradores (1986) han puesto de manifiesto la presencia de enzimas inactivos o menos activos durante el envejecimiento, debido a la oxidación de aminoácidos como histidina o lisina. Por otra parte, nuestro grupo de trabajo ha descrito la inactivación de dos enzimas (la 6 fosfogluconico deshidrogenasa (Gordillo y col., 1989) y la enzima málico (Gordillo y col., 1988)) por oxidación durante el proceso del envejecimiento en hígado de rata y en eritrocitos humanos (Gordillo y Machado, 1990). Todos los aminoácidos al sufrir procesos de oxidación generan derivados carbonílicos, luego el daño oxidativo puede manifestarse como aumento en la cantidad de grupos carbonilos de las proteínas. Todos estos datos nos permiten sugerir que al menos parte de la pérdida de actividad encontrada en la sustancia negra durante el proceso

del envejecimiento, puede ser debida a una proceso de inactivación producido por la oxidación de la proteína.

Para confirmar esta suposición hemos demostrado que el daño oxidativo en la proteína TH produce una inactivación de la enzima.

En la Tabla 17 se describe el resultado de la medida de los grupos carbonilos en la proteína enzimática TH, separada por técnicas inmunológicas, y se demuestra que durante el proceso del envejecimiento esta enzima sufre un proceso de oxidación aún mas marcado que el descrito para el conjunto de proteínas del homogenado. El homogenado sufre un incremento en la concentración de grupos carbonilos del 69 % y este incremento en la enzima TH es del 214 %. Lo que significa un alto grado de daño oxidativo.

En la figura 20 se expresan los resultados del estudio efectuado de oxidación "in vitro" de los homogenados de estriado. En ellos se demuestra que a pesar de no producirse un marcado aumento en la concentración de grupos carbonilos de las proteínas totales, el proceso oxidativo produce la inactivación de la enzima TH (45%) lo cual va acompañado de un aumento de los grupos carbonilos (60%). Esto demuestra nuestros resultados obtenidos "in vivo" en la sustancia negra, los cuales ponen de manifiesto que la inactivación sufrida por la enzima TH durante el proceso de envejecimiento es debida a daño oxidativo.

5.6. IMPORTANCIA DEL PROCESO DEL ENVEJECIMIENTO EN SUSTANCIA NEGRA.

Nuestros resultados indican que de entre las estructuras cerebrales estudiadas la que parece más sensible al proceso del envejecimiento es la sustancia negra. Se sabe que esta estructura se encuentra afectada en numerosas enfermedades degenerativas, relacionadas con el proceso del envejecimiento, tales como enfermedad de Parkinson (Riederer y Wuketich, 1976), enfermedad de Alzheimer (Uchihara y col.,1992), enfermedad de Pick (Uchihara y col.,1990) y Corea de Huntington (Oyanagi y col., 1989).

La sustancia negra (especialmente las neuronas pigmentadas) es un área cerebral en la cual se dan una serie de características bioquímicas que favorecen los procesos oxidativos y la muerte neuronal. Entre estas estarían: actividad MAO, autooxidación; acumulación de hierro, presencia de neuromelanina, etc.

Como ya hemos mencionado, la MAO cataliza la desaminación oxidativa de la DA, reacción en la que se forma péroxido de hidrógeno. Se ha observado un aumento de la actividad MAO-B con el envejecimiento, en diversas áreas cerebrales (Fowler y col., 1990), con lo cual la producción de peróxido de hidrógeno se ve incrementada. Por otra parte, el aumento de la actividad MAO-B podría estar asociado al aumento de glía observado en el envejecimiento (Oreal y col., 1980). Lo que estaría de acuerdo con nuestros resultados, los cuales muestran un aumento de glía en sustancia negra y estriado durante el proceso de envejecimiento.

Al mismo tiempo, se sabe que las catecolaminas pueden reaccionar de forma no enzimática con el oxígeno y sufrir reacciones de autooxidación con formación de quinonas y semiquinonas, proceso en el que también se generan radicales de oxígeno que pueden provocar muerte celular (Graham, 1978).

Otro hecho importante es que la sustancia negra es rica en hierro (Youdim, 1988). También se han observado elevadas concentraciones de hierro en otras estructuras cerebrales como el globo pálido y el núcleo dentado, pero estas áreas no presentan elevados niveles de monoaminas. En la sustancia negra la presencia conjunta de un elevado contenido en hierro, DA y alta actividad MAO provoca que el peróxido de hidrógeno formado por acción de la MAO reaccione con el hierro y mediante reacción de Fenton genere radicales hidroxilos.

Además la sustancia negra es rica en neuromelanina, formada en la autooxidación de la DA (Graham, 1978; 1979), a la cual puede unirse el hierro generando más radicales hidroxilos (Pilas y col., 1988)

Numerosas investigaciones ponen de manifiesto la existencia de un estado de estrés oxidativo en sustancia negra de enfermos de Parkinson (Dexter y col., 1989; Youdim y col., 1990). Este estado de estrés está asociado al aumento en los niveles de hierro observado en el cerebro de

estos pacientes, el cual, como hemos mencionado, puede interaccionar con peróxido de hidrógeno y neuromelanina, dando lugar a la formación de radicales hidroxilos que provocan peroxidación lipídica y muerte celular. También es conocido que el turnover de hierro en el cerebro es extremadamente bajo en comparación con hígado (Ben-Shachar y col., 1986). La posible implicación del hierro en la destrucción de neuronas dopaminérgicas está apoyada por el hecho de que agentes quelantes de hierro como la desferroxamina, poseen capacidad de retardar las lesiones producidas en estas neuronas por toxinas como la 6-OHDA (Ben-Shachar y col., 1991). El daño aparente en las neuronas dopaminérgicas se manifiesta por un aumento en el turnover de DA, demostrado por un incremento de la razón (DOPAC + HVA)/DA, que compensaría la pérdida de neuronas dopaminérgicas.

La presencia de neuromelanina es otro hecho que puede contribuir a la aparición de esta enfermedad, ya que son las neuronas pigmentadas de la sustancia negra las que se encuentran más afectadas. El contenido en neuromelanina puede ser un reflejo de la producción de especies tóxicas ya que el primer paso de su síntesis, a partir de dopamina, produce grandes cantidades de radicales libres (Graham, 1978). Por otro lado, es interesante destacar que el MPTP, neurotoxina que provoca Parkinson en modelos animales, puede unirse a la neuromelanina provocando la formación de radicales libres.

También se ha observado una relación inversa entre la actividad glutatión peroxidasa y la muerte neuronal (Damier y col., 1991). En sustancia negra de enfermos de Parkinson se ha observado una disminución en la cantidad de glutatión (tanto oxidado como reducido) (Perry y col., 1982; 1986), la cual parece ser selectiva de este centro. Esto sugiere una relación entre la enfermedad de Parkinson y una deficiencia de glutatión o sea una disminución de la capacidad de protección frente a los daños oxidativos. Por otra parte, en sustancia negra de parkinsonianos se ha visto un aumento de la peroxidación lipídica y de los niveles de SOD mitocondrial (Dexter y col., 1989; Saggu y col., 1989), lo cual sugiere daños por radicales libres en esta estructura.

Otra observación interesante es la disminución de actividad del complejo I mitocondrial (enzima NADH CoQ1 reductasa) en la sustancia negra de enfermos de Parkinson y que ésta es específica de esta estructura

(Schapira y col., 1990). No se han encontrado diferencias en caudado, lo cual indica que son los cuerpos neuronales y no las terminales los dañados en esta enfermedad. Esto podría relacionarse con nuestros resultados ya que es en la sustancia negra y no en el estriado donde se observan los cambios. El aumento en la producción de radicales libres puede estar asociado con la deficiencia en el complejo I, ya que el DNA mitocondrial es especialmente susceptible a los efectos mutagénicos provocados por radicales libres puesto que carece de enzimas reparadores de DNA mitocondrial (Ritcher y col., 1988), hecho confirmado por la observación de deleciones en el DNA mitocondrial de la sustancia negra de enfermos de Parkinson.

El complejo I mitocondrial está constituido por 26 polipéptidos, 7 de los cuales son codificados por DNA mitocondrial (Chomyn y col., 1985)., luego cualquier alteración en el DNA afectaría directamente la actividad de dicho complejo.

Al realizar la autopsia de cerebros de enfermos de Alzheimer, se han encontrado alteraciones en los mecanismos que controlan la homeostasis de hierro (Richardson y col., 1990), lo cual sugiere que el hierro podría actuar de manera similar a como actúa en el Parkinson, favoreciendo la degeneración neuronal. Además se ha observado que se encuentran afectadas las neuronas pigmentadas de la sustancia negra, en las que aparece un gran número de "tangles" neurofibrilares, característicos de esta enfermedad. En la introducción ya hemos hablado de como los radicales libres están implicados en la formación de los mismos. Esto está apoyado por el hecho de que procesos como el trauma cerebral, que constituye un factor de riesgo de Alzheimer, aumenten la producción de radicales libres.

Esto pone de manifiesto la estrecha relación existente entre las enfermedades degenerativas y el daño oxidativo (Halliwell, 1992; Ames y col., 1993). Otro hecho que estaría de acuerdo con la relación entre desórdenes neurológicos y daños producidos por el aumento en la formación de radicales de oxígeno sería la fuerte asociación encontrada entre la esclerosis lateral amiotrófica y la mutación en el gen de la SOD Cu/Zn, sugiriendo que los radicales de oxígeno podrían ser responsables de la degeneración selectiva de las neuronas motoras que ocurre en esta fatal enfermedad (Rosen y col., 1993). A pesar de que en esta

enfermedad tiene lugar principalmente la muerte de neuronas motoras de la médula espinal, existen numerosos datos que muestran una acusada degeneración del sistema dopaminérgico de la sustancia negra (Kato y col.,1993; Wol y col.,1991).

Estos resultados sugieren que la sustancia negra puede ser una de las estructuras del cerebro más vulnerable al daño oxidativo. El presente estudio muestra una gran inactivación de la TH de sustancia negra en ratas viejas, la cual parece estar relacionada con el daño oxidativo en neuronas dopaminérgicas. Este daño oxidativo puede ser causado por el metabolismo normal en el proceso de envejecimiento. En la sustancia negra puede verse incrementado por diferentes causas en el curso de enfermedades degenerativas propias de la edad. Esto sugiere la posibilidad de una terapia con antioxidantes en el tratamiento de enfermedades degenerativas en las cuales está dañada la sustancia negra.

5.7. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON DEPRENILO

El deprenilo, como se ha mencionado en la introducción, es un compuesto que se utiliza como fármaco de elección en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Esta enfermedad se caracteriza por una deficiencia de DA. La principal acción conocida del deprenilo es su efecto inhibitor de la enzima MAO- B, con lo cual produce un marcado aumento de la concentración de DA. A esta acción se le atribuye el efecto beneficioso en el tratamiento del Parkinson. También se ha observado que el deprenilo protege de la acción tóxica del MPP⁺ (metabolito activo de la toxina MPTP producido por la acción del la MAO-B) (Vizuet y col., 1994). Sin embargo, algunas de las acciones descritas para el deprenilo no parecen estar justificadas por su efecto inhibitor de la MAO-B. Se ha comprobado que si esta droga es administrada después de que se haya metabolizado todo el MPTP, es capaz de tener un "efecto de rescate" o recuperación de las neuronas dañadas por el MPTP (Tatton y Greenwood, 1991; Tatton, 1993).

Por otra parte, se ha demostrado que el tratamiento con dosis bajas de deprenilo mejora la actividad sexual y el aprendizaje de ratas viejas, y asimismo alarga su vida (Knoll y col., 1994). Todo esto nos ha llevado a estudiar el efecto del deprenilo sobre el daño oxidativo que tiene lugar en

la sustancia negra de la rata con el proceso de envejecimiento, lo cual es de gran interés puesto que los daños en el sistema dopaminérgico de la vía negro-estriada podría durante el proceso de envejecimiento podrían estar relacionados con el aumento de la incidencia del Parkinson con la edad.

En nuestro estudio observamos que después de la administración de deprenilo a una dosis de 2 mg/Kg de peso/día, tres días a la semana, durante dos meses a ratas viejas, (22 a 24 meses), se produce realmente un fuerte rejuvenecimiento de la rata. El tratamiento con deprenilo produce un mantenimiento de la actividad TH de sustancia negra. Por el contrario, produce una disminución del 36 % de la actividad en el estriado. En cuanto a la cantidad de enzima, la sustancia negra sufre un fuerte aumento del 115 %. La cantidad de enzima TH encontrada en los animales controles, de 24 meses de edad, y tratados con solución salina es semejante a la encontrada en nuestro estudio durante el envejecimiento. Sin embargo, el tratamiento con deprenilo produce un elevado aumento de la cantidad de enzima TH superando los valores encontrados en animales jóvenes. Por el contrario, no produce cambios significativos en la cantidad de enzima en el estriado. Estos cambios hacen que se produzca una variación en la "actividad molecular" de esta enzima fundamentalmente en la sustancia negra. Esta tiene un valor de 123, (semejante al encontrado en nuestro estudio anterior), sin embargo, el tratamiento con deprenilo hace que esta "actividad molecular" descienda hasta un valor de 60. Este parámetro también sufre un significativo cambio en el estriado, de 133 a 80 en las ratas tratadas. Estos resultados indican que el deprenilo provoca una disminución de la "actividad molecular" de la enzima TH, producida en sustancia negra por un fuerte incremento de la cantidad de enzima y en estriado por una disminución significativa de la actividad.

Este efecto podría estar producido por el método de medida de la actividad enzimática. Al medir la actividad TH "in vivo", ésta puede verse influenciada por diferentes compuestos y de manera importante por la concentración de DA. La DA actúa como un inhibidor de la enzima TH (). Este efecto inhibitor es realmente visible en estudios efectuados en animales transgénicos, al los que se les ha introducido una nueva dotación genética de TH humana (). Estos animales presentan la misma actividad TH que los animales de partida, medida "in vivo". Sin embargo, se observa que la actividad es mayor medida por métodos "in vitro" y que

se corresponde con la cantidad de enzima medida por métodos inmunológicos (). Esto parece demostrar la existencia de un mecanismo muy específico que afecta a la actividad de la enzima TH y que se pone de manifiesto cuando ésta se mide "in vivo". Además parece ser dependiente de la concentración intracelular de DA. Por ello, en nuestro caso, y debido a que no podemos efectuar la medida por métodos "in vitro" tenemos que suponer que el deprenilo lo que produce en la sustancia negra es una fuerte inducción de la actividad TH, medida en forma de cantidad de enzima, la cual contrarresta el efecto del envejecimiento. Recordemos que el envejecimiento provocaba pérdida de la cantidad de proteína enzimática TH e inactivación de la misma. Según esto, podríamos decir que el deprenilo provocaría un efecto contrario al producido por el envejecimiento o una disminución del mismo.

El tratamiento con deprenilo no afecta la cantidad de neurofilamentos de 68 kDa en ninguna de estas dos estructuras. Sin embargo, disminuye la gliosis encontrada en la sustancia negra. Esto no ocurre en estriado donde observamos un aumento significativo de glía en las ratas tratadas. Estos resultados apuntan a que el deprenilo tiene una marcada acción sobre la sustancia negra, actuando sobre el proceso de gliosis. Además es posible que al menos parte de la pérdida de neurofilamentos observada en la sustancia negra con el envejecimiento pueda tener lugar durante los 22 primeros meses de vida de la rata.

El posible efecto "anti-envejecimiento" del tratamiento con deprenilo es más visible en el daño oxidativo de las proteínas. La cantidad de grupos carbonilos de las proteínas de estriado no cambia con el tratamiento con deprenilo, pero tampoco cambiaba durante el proceso del envejecimiento estudiado (ver resultados anteriores). Sin embargo, los grupos carbonilos sufren una fuerte disminución por el tratamiento con deprenilo en la sustancia negra (48%), llegando a alcanzar un valor semejante al encontrado en los animales de 4 meses y significativamente menor al que muestran los animales de 12 meses. Estos mismos resultados se encuentran cuando se miden los grupos carbonilos específicos de la proteína enzimática TH en esta estructura. Estos resultados indican que el tratamiento con deprenilo protege del daño oxidativo producido durante el envejecimiento. Este tratamiento no solo es capaz de proteger del proceso oxidativo, sino también de revertirlo, ya que la cantidad de

grupos carbonilos se asemeja a la encontrada en animales de 4 y de 12 meses.

Este efecto protector del deprenilo estaría de acuerdo con el hecho de que se ha descrito para este compuesto un efecto anti-envejecimiento, ya que aumenta la expectativa máxima de vida (). Por otra parte, su acción protectora frente a daños oxidativos podría ser debida a un aumento de la actividad de enzimas protectores frente a las oxidaciones. Ha sido descrito que el tratamiento con deprenilo produce un marcado aumento de las actividades SOD y catalasa en diferentes centros del sistema nervioso central entre los que se encuentran el estriado y la sustancia negra (Carrillo y col.,1992). Datos semejantes han sido obtenidos por nosotros para el estriado de rata (Vizuet y col., 1994). Por otra parte trabajos recientes, también demuestran un aumento en la expectativa de vida de diferentes roedores.()

El efecto anti-envejecimiento del deprenilo y la protección frente a daños oxidativos pueden estar relacionados con otras acciones protectoras frente a procesos de degeneración neuronal. Se ha comprobado su efecto en el tratamiento del Parkinson. También se ha visto que previene síntomas de la enfermedad de Alzheimer, enfermedades relacionadas con el envejecimiento. Parece que también puede ser una droga importante en el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica (ALS) () y además aumenta la supervivencia de las neuronas después de una axotomía (). Todos estos efectos hacen pensar en que la actuación del deprenilo podría estar relacionada con el aumento de algún tipo de factor de crecimiento, como ha sido propuesto (). Actualmente se ha descrito un aumento de neurotrofinas producido por el tratamiento de deprenilo. Sin embargo, también se considera la posibilidad de que estos efectos sean debidos a una actuación más generalizada del efecto anti-envejecimiento del deprenilo. Desde este punto de vista, todas estas acciones podrían estar relacionadas con su principal efecto, aumento de la concentración de DA, producido por su acción inhibidora de la MAO B. El aumento de la concentración de DA debe ser generalizado en todas las estructuras cerebrales, aunque lógicamente mayor en aquellas que tengan una mayor concentración y metabolismo de DA. Una de estas estructuras es el hipotálamo. Se sabe que durante el envejecimiento se produce una disminución de las catecolaminas en el hipotálamo, principalmente en DA y NA (Meites y col.,1987; Meites, 1988). Esta disminución conlleva una menor liberación

en el hipotálamo de la hormona liberadora de la gonadotropina (GnRH), de la hormona liberadora de hormona de crecimiento y de la hormona liberadora de tirotropina (TRH). Esto produce una disminución de la secreción en la pituitaria de las hormonas gonadotrópicas, hormona de crecimiento (GH), hormona tirotrópica biológicamente activa (TSH) y un aumento de la secreción de prolactina (PRL) (Meites y col.,1987; Meites, 1988; Klug y Adelman, 1979). La disminución de las hormonas gonadotrópicas conduce a la pérdida del ciclo estral en ratas hembras y reduce la secreción de testosterona en machos. La disminución en la secreción de GH produce la disminución en la secreción de somatomedina (IGF-I) y la reducción de la síntesis de proteínas. La disminución de la secreción de TSH disminuye la secreción de hormona tiroidea y provoca una caída en el metabolismo corporal.

La administración de drogas que aumenten la actividad catecolaminérgica en el hipotálamo inhibe o revierte muchos procesos del envejecimiento. La inyección de epinefrina conduce a la ovulación en ratas viejas (Clemens y col., 1969), lo que sugiere que las catecolaminas podrían estar implicadas en la disminución de las funciones reproductoras. La administración de L-DOPA, precursor de catecolaminas, retrasa la pérdida del ciclo estral de las ratas viejas y reinicia el ciclo en ratas viejas que ya lo han perdido. Un efecto semejante se ha visto por la administración de iproniazida, inhibidor de la MAO, el cual disminuye el catabolismo de las catecolaminas (Quadri y col.,1973).

La GH es el agente anabolizante de las proteínas más importante, y se cree que su disminución durante el envejecimiento es la principal responsable de la disminución de la síntesis de proteínas. Se ha comprobado que dos inyecciones diarias de L-DOPA durante 8 días, aumentan la secreción pulsátil de GH en ratas macho viejas y promueven la síntesis de proteínas del músculo diafragma (Sonntag y Meites, 1988). Inyecciones de GH durante 10 días en ratas o ratones viejos también producen un aumento significativo del peso del corazón, riñones, hígado, timo y bazo (Sonntag y Meites, 1988).

Esto nos permite suponer que muchos de estos efectos podrían ser producidos por la administración de deprenilo, inhibidor de la MAO-B, ya que produce como es sabido un fuerte aumento de las catecolaminas, DA y NA. Nosotros hemos medido la concentración plasmática de IGF-I,

lo cual es una medida indirecta de la concentración de GH. Las ratas con deprenilo presentan una concentración de IGF-I significativamente mayor que las ratas con la misma edad no tratadas. La concentración en las ratas tratadas con deprenilo es semejante a la observada en ratas jóvenes. Esto nos hace pensar que al menos uno de los efectos producidos por el tratamiento con deprenilo es el aumento en la concentración de catecolaminas hipotalámicas, restaurando la función de esta estructura, con el consiguiente aumento de GH que como se sabe es un factor de extraordinaria importancia en el proceso del envejecimiento ().

6. CONCLUSIONES

- 1.** La enzima Tirosina hidroxilasa sufre una inactivación en sustancia negra durante el proceso de envejecimiento, la cual no se debe únicamente a pérdida de enzima ni a un proceso de muerte neuronal
- 2.** Esta inactivación es debida a un proceso oxidativo, como se pone de manifiesto por el aumento de grupos carbonilos de la enzima en esta estructura.
- 3.** La enzima Tirosina hidroxilasa es susceptible a procesos oxidativos, mostrando una inactivación y aumento de grupos carbonilos cuando es oxidada "in vitro".
- 4.** De entre todas las estructuras cerebrales estudiadas, la sustancia negra se presenta como la más vulnerable a daños oxidativos producidos por radicales libres durante el proceso de envejecimiento.
- 5.** El tratamiento con deprenilo en ratas viejas produce un aumento de la cantidad de enzima Tirosina hidroxilasa en sustancia negra.
- 6.** El tratamiento con deprenilo protege del daño oxidativo que sufre la enzima Tirosina hidroxilasa durante el proceso de envejecimiento en sustancia negra, como se pone de manifiesto por la disminución de grupos carbonilos.
- 7.** El tratamiento con deprenilo provoca un aumento en los niveles plasmáticos de IGF-I.

7.BIBLIOGRAFIA

- Adams, J.D. and Odunze, I.N. Oxygen free radicals and Parkinson's disease. *Free Rad. Biol. Med* **10**: 161-169; 1991.
- Agnati, L.F., Fuxe, K., Benfenati, F., Toffano, G., Cimino, M., Calza, L., Battistone, N. and Pich, E.M. Computer-assisted morphometry and microdensitometry of transmitter-identified neurons with special reference to the mesostriatal dopamine pathway. III Studies on aging processes. *Acta. Physiol. Scand. Suppl* **352**: 45-64; 1984.
- Ahn, B. Rhee, S.G. and Stadtman, E. R. Use of fluorescein hydrazide and fluorescein thiosemicarbazide reagents for the fluorometric determination of protein carbonyl groups and for the detection of oxidized protein on polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **161**: 245-257; 1987.
- Almas B., Le Bourdelles B., Flatmark T., Mallet J. and Haavik J. Regulation of recombinant human tyrosine hydroxylase isoenzymes by catecholamine binding and phosphorylation. *Eur. J. Biochem.* **209**: 249-255; 1992.
- Almassy R.J., Janson C.A., Hamlin R., Xuong N.H. and Eisenberg D. *Nature* **323**: 304 1986.
- Alousi A. and Weiner N. The regulation of norepinephrine synthesis in sympathetic nerves. Effect of nerve stimulation, cocaine, and catecholamine-releasing agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **56** : 1491-1496; 1966.
- Alvarez E., Ruiz-Gutierrez V., Santa María C. and Machado A. Age-dependent modification of lipid composition and lipid structural order parameter of rat peritoneal macrophage membranes. *Mech. Ageing Dev.* **71** : 1-12 ; 1993.
- Ambani L.A., Van Woert M.H. and Murphy S. Brain peroxidase and catalase in Parkinson's disease. *Arch. Neurol.* **32**: 114-116, 1975.
- Ames B.N., Cathcart R., Schirrsers E. and Hochstein P. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical

- caused ageing and cancer: a hypothesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 7772-7776; 1981.
- Ames, B.H., Shigenaga, M.K. and Hagen, T.M. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**: 7915-7922; 1993.
- Andersson K.K., Cox D.D., Que L.J., Flatmark T. and Haavik J. Resonance Raman studies on the blue-green-colored bovine adrenal tyrosine 3-monooxygenase (tyrosine hydroxylase). Evidence that the feedback inhibitors adrenaline and noradrenaline are coordinate to iron. *J. Biol. Chem.* **263** : 18621-18626; 1988.
- Andersson K.K., Vassort C., Brennan B.A., Que L., Haavik J., Flatmark T., Gros F. and Thibault J. Purification and characterization of the blue-green rat pheochromocytoma (PC12) tyrosine hydroxylase with a dopamine-Fe(III) complex. *Biochem. J.* **284**: 687-695; 1992.
- Ariens E.J. Stereochemistry: A source of problems in medicinal chemistry. *Med. Res. Rev.* **6**: 451-466; 1986.
- Aust S.D., Morehouse L.A. and Thomas C.E. Role of metals in oxygen radical reactions. *J. Free Radic. Biol. Med.* **1**: 3-25; 1985.
- Ball M.J., Hachinski V., Fox A., Kirshen A.J., Fisman M., Blume W., Kral V.A., Fox H. and Merskey M. A new definition of Alzheimer's disease: a hippocampal dementia. *Lancet.* **1**: 14-16; 1985.
- Barbeau A. Lecture at 8th International Symposium on Parkinson's Disease. New York, June 1985.
- Baum J.A. and Scandalios J.G. Developmental expression and intracellular localization of superoxide dismutases in maize. *Differentiation.* **13**: 133-140, 1979.
- Ben-Shachar D. and Youdim M.B.H. Intranigral iron injections induces behavioral and Biochemical "Parkinsonism" in rats. *J. Neurochem* **57** : 2133-2135; 1991.
- Ben-Shachar D., Ashkenazi R. and Youdim M.B.H. Long-term consequences of early iron deficiency on dopaminergic neurotransmission in rats. *Int. J. Dev. Neurosci.* **4** : 81-88; 1986.

- Ben-Shachar, D., Riederer, P. and Youdim, M.B.H. Iron-melanin interaction and lipid peroxidation: implication for Parkinson's disease. *J. Neurochem.* **57**: 1609-1614; 1991.
- Bernheimer, H., Birkmayer, W., Hornykiewicz, O., Jellinger, K. and Seitelberger, F. Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington: clinical, morphological and neurochemical correlation. *J. Neurol. Sci.* **20**: 415-455; 1973.
- Besson M.J., Graybiel A.M. and Quinn B. Co-expression of neuropeptides in the cat's striatum : an immunohistochemical study of substance P, dynorphin B and Enkephalin. *Neuroscience* **39**: 33-58 ; 1990.
- Bolam J.P. and Izzo P. N. The postsynaptic targets of substance P-immunoreactive terminals in the rat neostriatum with particular reference to identified spiny striatonigral neurons. *Exp. Brain Res.* **70**: 361-377 ; 1988.
- Bosman G.J.C.G.M., Bartholomeus I.G.P. and de Grip W.J. Alzheimer's disease and cellular aging : membrane- related events as clues to primary mechanisms. *Gerontology.* **37** : 95-112. 1991.
- 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.
- Calne D.E. and Langston J.W. Aetiology of Parkinson's disease. *Lancet* **2**: 1457-1459 ; 1983.
- Campbell D.G., Hardie D.G. and Vulliamy P.R. Identification of four phosphorylation sites in the N-terminal region of tyrosine hydroxylase. *J. Biol. Chem.* **261** : 10489-10492 ; 1986.
- Carlsson, A., Davis, J.N., Kehr, W., Lindqvist, M. and Atack, C.V.A. Simultaneous measurement of tyrosine and tryptophan hydroxylase activities in brain in vivo using an inhibitor of the aromatic amino acid decarboxylase. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **275**: 153-168 ;1972.

- Carney J.M., Starke-Reed P.E., Oliver C.N., Landum R.W., Cheng M.S., Wu J.F. and Floyd R.A. Reversal of age-related increase in brain protein oxidation, decrease in enzyme activity, and loss in temporal and spatial memory by chronic administration of the spin-trapping compound N-tert-butyl-a-phenylnitron. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**: 3633-3636; 1991.
- 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.
- Carrillo M.C., Kanai S., Sato Y., Nokubo M., Ivy G.O. and Kitani, K. The optimal dosage of (-)Deprenyl for increasing superoxide dismutase activity in several brain regions with age in male Fisher-344 rats. *Life Sci.* **52**: 1925-1934; 1993.
- Carrillo M.C., Kitani K., Kanai S., Sato Y. and Ivy G.O. The ability of (-) Deprenyl to increase superoxide dismutase activity in the rat is tissue and brain region selective *Life Sci.* **50**: 1985-1992 ;1992.
- Carrillo M.C., Kitani K., Kanai S., Sato Y., Miyasaka K and Ivy G.O. The effect of a long-term (6 months) treatment with (-)Deprenyl on antioxidant enzyme activities in selective brain regions in old female Fisher-344 rats. *Biochem. Pharmacol.* **47**: 1333-1338 ; 1994.
- Cataldo A.M., Hamilton D.J. and Nixon R.A? Lysosomal abnormalities in degenerating neurons link neuronal compromise to senile plaque development in Alzheimer disease. *Brain Res.* **640** : 68-80 ; 1994.
- Cerami A. and Crabb M.J.C. *Trends. Pharmacol. Sci.* **7**: 271, 1986.
- Cerami A., Vlassara M. and Brownlee M. Glucose and aging. *Sci. Am.* **256** : 90, 1987.
- Cerami A., Vlassara M. and Brownlee M. *J. Cell. Biochem.* **30**: 111, 1986.
- Chambers K.C. and Phoenix C.H. Apomorphine , deprenyl and yohimbine fail to increase sexual behavior in rhesus males. *Behav. Neurosci.* **103**(4): 816-823. 1989.

- Cheramy A., Leviel V. and Glowinski J. Dendritic release of dopamine in the substantia nigra. *Nature*. **289**: 537-542, 1981.
- Chomyn A., Mariottini P., Cleeter M.J., Ragan C.I., Doolittle R.F., Yagi M.A., Hatefi Y. and Attardi G. Functional assignment of the unidentified reading frames of human mitochondrial DNA, in *Achievements and Perspectives in Mitochondrial Research*, Vol. II (Quagliariello E., Slater E.C., Palmieri F., Saccone C. and Kroon E.M., eds) pp. 259-275, Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- 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.
- Climent I., Tsai L. and Levine R.L. *Anal. Biochem.* **182**: 226 1989
- 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.
- Condé H. Organization and physiology of substantia nigra. *Exp. Brain Res.* **88**: 233-248 ;1992.
- Coté L.J. and Kremzner L.T. Biochemical changes in human brain. *Advances in neurology* **38** : 19-30 ; 1983.
- Cutler R.G. Antioxidants and aging. *Am. J. Clin. Nutr.* **53**: Suppl. 1, 373S-379S.
- Dalh H-H.M., Mercer J.F.B. Isolation and sequence of a cDNA clone wich contains the complete coding region of rat phenylalanine hydroxylase. Structural homology with tyrosine hydroxylase, glucocorticoid regulationm and use of alternate polyadenylation sites. *J. Biol. Chem.* **261**: 4148-4153 ; 1986.
- Damier P., Hirsch E., Javoy-Agid F., Hang P. and Agid Y. Glutathione peroxidase, glial cells and Parkinson's disease (Abstr.) in *Abstracts from the 10th International Symposium on Parkinson's Disease* p. 230. Tokyo. 1991.

- Davies C.A., Mann D.M.A., Sumpter P.Q. and Yates P.O. A quantitative morphometric analysis of the neural and synaptic content of the frontal and temporal cortex in patients with Alzheimer's disease. *J. Neurol. Sci.* **78** : 151-164; 1987.
- Davis R.J., Johnson G.L., Kelleher D.J., Anderson J.K., Mole J.E. and Czech M.P. Identification of serine 24 as the unique site on the transferrin receptor phosphorylated by protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **261**: 9034-9041 ; 1986.
- de Duve C. and Hayaishi O. (Eds.) Tocopherol, oxygen and biomembranes, Elsevier/ North Holland, New York. 1978.
- Del Maestro R.F. An approach to free radicals in medicine and biology. *Acta Physiol. Scand.* **492**: 153-168. 1980.
- Dexter D.T., Carter C.J., Weeks F.R., Agid F., 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; 1989b.
- Dexter D.T., Wells F.R., Agid F., Agid Y., Lees A., Jenner P. and Marsden C.D. Increased nigral iron content and alteration in other metals occurring in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* **52**: 1830-1836; 1989a.
- Di Monte D.A., Chan P. and Sandy M.S. Glutathione in Parkinson's disease: a link between oxidative stress and mitochondrial damage? *Ann Neurol.* **32**: S111-S115. 1992.
- Dix T.A., Kuhn D.M. and Benkovic S.J. Mechanism of oxygen activation by tyrosine hydroxylase. *Biochemistry* **26** : 3354-3361; 1987.
- 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.
- Duffy P.E., Rapport M. and Graf L. Glial fibrillary acidic protein and Alzheimer-type senile dementia. *Neurology* **30** : 778-782; 1980.
- Dunn J.A. McChance D.R. Thropew S.R. Lyons T.J. and Baynes J.W. Age-dependent accumulation of N^ε-(carboxymethyl)lysine and N^ε-

- (carboxymethyl)hydroxy-lysine in human skin collagen. *Biochemistry*. **30**: 1205-1210. 1991.
- Ehringer, H. and Hornykiewicz, O. Verteilung von noradrenalin und dopamin (3-Hydroxytyramin) im gehirn des menschen und ihr verhalten bei erkrankungen des extrapyramidalen systems. *Klin. Wochenschr.* **38**: 1236-1239; 1960.
- Eldridge R. and Rocca W.A. The clinical syndrome of striatal dopamine deficiency: parkinsonism induced by MPTP. *N Engl. J. Med.* **313**: 1159-1160. 1985.
- Eng L.F. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes. *J. Neuroimmunol.* **8** : 203-214 ; 1985.
- Eng L.F. Regulation of glial intermediate filaments in astrogliosis. In Norenberg M. Hertz L. Schousboe A (eds): Regulation of glial intermediate filaments. New York: Alan R. Liss Inc., pp 1-12. 1987.
- Fando, J. L., Salinas, M. and Wasterlain, C.G. Age-dependent changes in brain protein synthesis in the rat. *Neurochem. Res.* **5**: 373-383; 1980.
- Fanh S. and Cohen G. The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it. *Ann Neurol.* **32**: 804-812 ; 1992.
- Fanh S. The endogenous toxin hypothesis of the etiology of Parkinson's disease and a pilot trial of high dosage antioxidants in an attempt to slow the progression of the illness. *Ann NY Acad. Sci.* **570**: 186-196 ; 1989.
- Farber J.M. and Levine R.L. *ibid* 261: 4574 1986.
- Farooqui A.A., Liss L. and Horrocks L.A. Neurochemical aspects of Alzheimer's disease: involvement of membrane phospholipids. *Metab. Brain. Dis.* **3** : 19-35 ; 1988.
- Fearnley J.M. and Lees A.J. Agin and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain* **114**: 2283-2302, 1991.
- Fernández-Ruiz J. De Miguel R, Hernández M.L., Cebeira M. and Ramos J.A. Comparisons between brain dopaminergic neurons of juvenile and

- aged rats: sex-related differences. *Mech. Ageing. Dev.* **63** : 45-55 ; 1992.
- Finch C.E., Randall P.K. and Marshall J.F. Aging and basal ganglia functions. *Annu. Rev. Gerontol. Griatr.* **2**: 49-87 ; 1981.
- Finch, C. E. Age-related changes in brain catecholamines: a synopsis of findings in C57BL/6J mice and other models. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology, Parkinson's Disease-II, Aging and Neuroendocrine Relationships.* edited by C.E. Finch, D.E. Potter and A.D. Kenny. Plenum, New York, vol 113. 1981 pp. 15-39.
- Finch, C.E. and Morgan, D.G. RNA and protein metabolism in the aging brain. *Annu. Rev. Neurosci.* **13**: 75-87; 1990.
- Fine, M. I., Masserano, J. M. and Weiner, N. The effects of reserpine and haloperidol on tyrosine hydroxylase in the brains of aged rat. *Life Sciences* **39**: 235-241; 1986.
- Fisher R.S., Buchwald N.A., Hull C.D. and Levine M.S. The GABAergic striatonigral neurons of the cat: demonstration by double peroxidase labeling. *Brain Res* **398**: 148-156 ; 1986.
- Florini J.R., Harned J.A., Richman R.A. and Weiss J.P. Effect of rat age on serum levels of growth hormone and somatomedins. *Mech. Ageing. Dev.* **15** : 165-176 ; 1981.
- Fowler C.J. Selective inhibitors of MAO types A and B and their clinical usefulness. *Drugs Future* **7**: 501-517 ; 1982.
- Fowler C.J., Wiberg A., Oreland L., Marcusson 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.
- Fowler C.J., Wiberg A., Oreland L., Marcusson J. and Winblad B. The effect of age on the activity and molecular properties of human brain monoamine oxidase. *J. Neural. Transm* (Suppl **32**) ;1990.
- Garland D., Russell P., Zigler J.S. in *Oxygen Radicals in Biology and Medicine*, M.G. Simic, K.S. Taylor, J.F. Ward , C. von Sonntag Eds (Plenum, New York 1988) pp. 347-353.

- 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.
- Gershon H. and Gershon D. *Nature* **227**: 1214. 1970.
- Glass B.D. and Krebs E.G. Comparison of the substrate specificity of AMPc and GMPc dependent protein kinases. Kinetic studies using synthetic peptides corresponding to phosphorylation sites in histone H2B. *J. Biol. Chem.* **254**: 9728-9738; 1979.
- 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. and Iversen L.L. Regional studies of catecholamines in the rat brain. Subcellular distribution of endogenous and exogenous catecholamines in various brain regions. *Biochem. Pharmacol.* **15** : 977-987 ; 1966.
- 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.
- Gordillo, E., Ayala, A., Bautista, J. and Machado, A. Implication of lysine residues in the loss of enzymatic activity in rat liver 6-phosphogluconate dehydrogenase found in aging. *J. Biol. Chem.* **264**: 17024-17028; 1989.
- Gordillo, E., Ayala, A., F-Lobato, M., Bautista, J. and Machado, A. Possible involvement of histidine residues in the loss of enzymatic

- activity of rat liver malic enzyme during aging. *J. Biol. Chem.* **263**: 8053-8057; 1988.
- Graham D.G. On the origin and significance of neuromelanin. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **103**: 359-362. 1979.
- 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.
- Greene L.A., Seeley P.J., Rukenstein A., DiPiazza M. and Howard A. Rapid activation of tyrosine hydroxylase in response to nerve growth factor. *J. Neurochem.* **42**: 1728-1734 ; 1984.
- Grenet H.E., Ledley F.D., Reed L.L. and Woo S.L. Full-length cDNA for rabbit tryptofan hydroxylase: functional domains and evolution of aromatic aminoacid hydroxylases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 5530-5534 ; 1987.
- Grima B., Lamouroux A., Blanot F., Faucon- Biguet N. and Mallet J. A single human gene encoding sequence of rat tyrosine hydroxylase mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82** : 617-621; 1985.
- Haavik J. and Flatmark T. Isolation and characterization of tetrahydrobiopterin oxidation products generated in the tyrosine 3-monooxygenase (tyrosine hydroxylase) reaction. *Eur. J. Biochem.* **168** : 21-26; 1987.
- Haavik J., Le Bourdelles B, Martinez A., Flatmark T. and Mallet J. Recombinant human tyrosine hydroxylase isoenzymes. Reconstitution with iron and inhibitory effect of other metal ions. *Eur. J. Biochem.* **199** : 371-378 ; 1991
- Halliwell B. and Gutteridge J.M.C. Oxygen toxicity, oxygen radicals transition metals and disease. *Biochem J.* **219**: 1-14, 1984.
- Halliwell, B. Reactive oxygen species and central nervous system. *J. Neurochem.* **29**: 1609-1623; 1992.

- Hansen L.A., Armstrong D.M. and Terry R.D. An immunohistochemical quantitation of fibrous astrocytes in the aging human cerebral cortex. *Neurobiol. Aging* **8** : 1-6; 1987.
- Harding J.J. *Adv. Protein. Chem.* **37**: 247, 1985.
- Harman D. Aging: A theory based on free radicals and radiation biology. *J. Geront.* **11**: 298-300 ; 1956.
- Harman D. Free radical theory of aging : a hypothesis on pathogenesis of senile dementia of Alzheimer's type. *Age* **16** : 23-30; 1993.
- Harman D. The free radical theory of aging. In H.R. Warner, R.N. Butler, R.L. Sprott and E.L. Schneider (Eds.) *Modern biological theories of aging*. pp. 81-87. New York, Raven Press. 1987.
- Harman, D. The aging process. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**: 7124-7128; 1981.
- Haycock J.W. and Haycock D.A. Tyrosine hydroxylase in rat brain dopaminergic nerve terminal. Multiple-site phosphorylation in vivo and in synaptosomes. *J. Biol. Chem.* **266** : 5650-5657; 1991.
- Haycock J.W. Multiple signaling pathways in bovine chromaffin cells regulate tyrosine hydroxylase phosphorylation at Ser19, Ser31 and Ser40. *Neurochem. Res.* **18** : 15-26 ; 1993.
- Haycock J.W. Phosphorylation of tyrosine hydroxylase in situ at serine 8, 19, 31 and 40. *J. Biol. Chem.* **265** : 11682-11691 ; 1990.
- Hayflick L. Origins of longevity, in: M.R. Warner, R.N. Butler, R.L. Sprott and E.L. Schneider (Eds.), *Modern Biological Theories of Aging*, Raven Press, New York, pp. 21-34. 1987.
- Heikkila 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.
- Hess A. Neuropathological changes in the caudate nucleus elicited by MPTP and their prevention by monoamine oxidase inhibition. *Brain Res.* **499**: 393-396. 1989.

- Hirsch E., Graybiel A.M. and Agid Y. Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. *Nature* **334**: 345-348. 1988.
- Hoeldtke R. and Kaufman S. Bovine adrenal tyrosine hydroxylase : purification and properties. *J. Biol. Chem.* **252**: 3160-3169 ; 1977.
- Horn A.S. Characteristics of dopamine uptake. In: Horn A.S., Korf J. and Westerink B.H.C. (Eds) *The neurobiology of dopamine*. Academic Press, London-New York- San Francisco. pp. 217-235 ; 1979.
- House C., Wettenhal R.E.H. and Kemp B.E. The influence of basic residues on the substrate specificity of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **262**: 772-777; 1987.
- Ichitani Y., Morimoto N., Okuyama I., Hasegawa M., Nagatsu I. and Iyata Y. Fine structure of tyrosine hydroxylase-like immunoreactive neurons and terminals of the hypothalamic arcuate nucleus and median eminence in young and aged rats. *J. Electron. Microsc.* **39** : 396-403 ; 1990.
- Jarrot B. and Iversen L.L. Noradrenaline metabolising enzymes in normal and sympathetically denervated vas deferens. *J. Neurochem.* **18** : 1-6 ; 1971.
- 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.
- Jellinger K. Overview of morphological changes in Parkinson's disease. *Adv. Neurol* **45**: 1-18 ; 1986.
- Jenner P. Oxidative stress as a cause of Parkinson's disease. *Acta Neurol. Scand.* **84**: 6-15 ; 1991.
- Jocelyn P.C. Biochemistry of the thiol group. *Academic Press*. London. 1972.
- Joh T.H., Park D.H. and Reis D.J. Direct phosphorylation on brain tyrosine hydroxylase by cyclic AMP-dependent protein kinase : mechanism of enzyme activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75** : 4744-4748; 1978.

- 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.
- Kaakola S., Männistö P.T. and Nissinen E. Striatal membrane-bound and soluble catechol-O-methyl-transferase after selective neuronal lesions in the rat. *J. Neural. Trans.* **69** : 221-228 ;1987.
- Kalasz H., Kerecsen L., Knoll J. and Pucsok J. Chromatographic studies on the binding, action and metabolism of (-)-deprenyl. *J. Chromatogr.* **499**: 598-599; 1990.
- Kato, S., Oda, M. and Tanabe, H. Diminution of dopaminergic neurons in the substantia nigra of sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathology and Applied Neurobiology.* **19**: 300-304; 1993.
- Kaufman S. and Fisher D.B. Pterin-requiring aromatic amino acid hydroxylases. In *Molecular Mechanisms of Oxygen Activation.* ed. O. Hayaishi, pp, 285-369. New York; Academic. 1974.
- Kaufman S. Mixed function oxygenases . General considerations . IN *Structure and Function of Monoamine Enzymes.* ed. E. Usdin, N. Weiner, M.B.H. Yodium. pp 3-22. New York: Dekker.1977.
- Kish S.J., Morito C. and Hornykiewicz D. Glutathione peroxidase activity in Parkinson's disease brain. *Neurosci. Lett.* **58**: 343-346 ;1985.
- 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., Dallo J. and Yen T.T. Striatal dopamine, sexual activity and lifespan. Longevity of rats treated with (-)deprenyl. *Life Sci.* **45**: 415-420 ; 1989.
- 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., Yen T.T. and Miklya I. Sexually loe performing male rats die earlier than their high performing peers and (-)Deprenyl treatment eliminates this difference. *Life Sci.* **54**: 1047-1057 ; 1994.
- Kohn R.R. Aging and age-related diseases: normal processes, in : H.A. Johnson (Ed.) Relation between normal aging and disease. *Raven Press New York* pp. 1-44 ,1985.
- Konradi Ch., Svoma E., Jellinger K., Riederer P. and Thibauli J. Topografic immunocytochemical mapping of monoamine oxidase A, monoamine oxidase B and tyrosine hydroxylase in human post mortem brain stem. *Neuroscience* **267**: 791-802 ; 1988.
- Korf J., Zielemann M. and Westerink B.H.C. Dopamine release in substantia nigra?. *Nature.* **260**: 257-258 ; 1976.
- Korf, J. Turnover rate assessments of cerebral neurotransmitter amines and acetylcholine. In: *Neuromethods*. vol. 2. edited by A.A. Boulton, and J.M. Baker. Humana Press, Clifton, New Jersey, pp. 407-456; 1985.
- Kornhuber J., Kim J.S., Kornhuber M.E., Kornhuber H.H. The cortico-nigral projection: reduced glutamate content in the substantia nigra

- following frontal cortex ablation in the rat. *Brain Res* **322**: 124-126 ; 1984.
- Kosik K.S. Joachim C.L. and Selkoe D.J. Microtubule associated protein tau (τ) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83** : 4044-4048 ; 1986.
- Krebs E. G., Bravo J.A. Phosphorilation-dephosphorilation of enzymes. *Ann. Rev. Biochem.* **48** : 923-959 ; 1979.
- Kuczenski R.T. and Mandell A.J. Regulatory properties of soluble and particulate rat brain tyrosine hydroxylase. *J. Biol. Chem.* **247** : 3114-3122 ; 1972.
- Kwok S.C., Ledley F.D., DiLella A.G., Robson K.J. and Woo S.L. Nucleotide sequence of a full-length cDNA clone and amino acid sequence of human phenylalanine hydroxylase. *Biochemistry* **24** : 556-561. FALTA AÑO
- LaBella F.S. and Paul G. Strucyure of collagen from human tendon as influenced by age and sex. *J. Gerontol.* **20**: 54-59 ; 1965.
- Laemmli U.K. Cleavage of struvtural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685 ; 1970
- Langston J.W., Ballard P. and Tetrud J.W. and Irwin I. Chronic parkinsonism in humans due to a product of mepertedine-analogue syntesis. *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 substancia nigra in the squirrel monkey. *Brain Res.* **298**: 390-394 ; 1984.
- 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.
- Levine L.R. Oxidative modification of glutamine synthetase. *J. Biol. Chem.* **258** : 11828-11833 ; 1983.
- Levine R.L. et al *Methods Enzymol.* **186**: 464, 1990.

- Levine R.L., Oliver C.N., Fulks R.M. and Stadman E.R. Turnover of bacterial glutamine synthetase: oxidative inactivation precedes proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 2120-2124; 1981.
- Lo W.D. and Betz A.L. Oxygen free-radical reduction of brain capillary rubidium uptake. *J. Neurochem.* **46**: 394-398 ; 1986.
- Lovenberg W., Bruckwick E.A. and Hanbauer I. ATP, cyclic AMP and magnesium increase the affinity of rat striatal tyrosine hydroxylase for its cofactor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72** : 2955-2958. ;1975.
- Lovenberg W., Weissbach H. and Udenfriends S. Aromatic L-aminoacid decarboxylase. *J. Biol. Chem.* **237** : 89-93 ; 1962.
- 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.
- Machado, A., Ayala, A., Gordillo, E., Revilla, E. and Santa Maria, C. Relationship between enzymatic activity loss and post-translational protein modification in aging. *Arch. Gerontol. Geriatr.* **12**: 187-197; 1991.
- Machado, A., Cano, J. and Santiago, M. The change with age in biogenic amines and their metabolites in the striatum of the rat. *Arch. Gerontol. Geriatr.* **5**: 333-342; 1986.
- Magyar K. and Tothfalusi L. Pharmacokinetic aspect of deprenyl effects. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.* **36**: 373-384 ; 1984.
- Mállly J. Some new aspects of the effect of (-) Deprenyl in Parkinson's disease - a retrospective study. *J. Neural Transm.* **4**: 155-164 ; 1992.
- Mancardi G.L., Liwnicz B.H. and Mandybur T.I. Fibrous astrocytes in Alzheimer's disease and senile dementia Alzheimer's type. *Acta Neuropathol (Berl)* **61** : 76-80 ; 1983.
- Mann D.M.A., Yates P.O. and Marcyniuk B. Correlation between senile plaques and neurofibrillary tangle counts in cerebral cortex and neuronal counts in cortex and subcortical structures in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* **56** : 51-55; 1985.

- Mann J.J., Frances A., Kaplan R.D., Kocsis J., Peselow E.D. and Gershon S. The relative efficacy of L- deprenyl, a selective monoamine oxidase type B inhibitor, in endogenous and nonendogenous depression. *J. Clin Psychopharmacol.* **2**: 54-57 ; 1982.
- Markey K.A., Kondo S., Shenkman L. and Goldstein M. Purification and characterization of tyrosine hydroxylase from a clonal pheochromocytoma cell line. *Mol. Pharmacol.* **17** : 79-85 ; 1980.
- Martignoni E., Bono G., Blandini F., Sinforiani E., Merlo P. and Nappi G. Monoamines and related metabolites levels in the cerebrospinal fluids of patients with dementia of Alzheimer type. Influence of treatment with L-Deprenyl. *J. Neural Transm.* **3**: 15-25 ; 1991.
- 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.
- Masliah E., Mallory M., Hansen L., DeTeresa R. and Terry R.D. Quantitative synaptic alterations in the human neocortex during normal aging . *Neurology.* **43** : 192-197 ; 1993.
- McGeer E. and McGeer P.L. Neurotransmitter metabolism in the aging brain. In: *Neurobiology of aging* . edited by R.D. Terry, and S. Gerson. Raven Press, New York, 1976b, pp. 389-403.
- McGeer E.G., Fibiger H.C., McGeer P.L. and Wickson V. Aging and brain enzymes. *Exp. Gerontol.* **6**: 391-396 ; 1971.
- McGeer P.L. and McGeer E. Enzymes associated with the metabolism of catecholamines, acetylcholine, and GABA in human controls and patients with Parkinson's disease and Huntington's chorea. *J. Neurochem.* **26** : 65-76; 1977a.
- McGeer P.L., Itagaki S., Akiyama H. and McGeer E.G. Comparison of neuronal loss in Parkinson's disease and aging. IN D.B. Calne, G. Comi, and R. Horoswki. (Eds.), *Parkinsonism and aging*, Plenum, New York, 1989, pp. 25-34.

- McGeer, E. and McGeer, P.L. Neurotransmitter metabolism in the aging brain. In: *Neurobiology of Aging*. edited by R.D. Terry, and S. Gerson. Raven Press, New York, 1976, pp. 389-403.
- McGeer, P.L., Itagaki, S., Akiyama, H. and McGeer, E.G. Rate of cell death in Parkinsonism indicates active neuropathological process. *Ann. Neurol.* **24**: 574-576; 1988.
- McGeer, P.L., McGeer, E.G. and Suzuki, J.S. Aging and extrapyramidal function. *Arch. Neurol.* **34**: 33-35; 1977.
- McNeill, T.H., Koek, L. and Haber, S.N. Differential effects of aging on neurotransmitter cell loss of the substantia nigra and striatum in mouse and human brain. *Soc. Neurosci: Abstrs.* **14**: 1292 ;1988.
- McTigue M., Cremins J., and Haleboua S. Nerve growth factor and other agents mediate phosphorylation and activation of tyrosine hydroxylase. A convergence of multiple kinase activities. *J. Biol. Chem.* **260** : 9047-9056; 1985.
- Meeker J.E. and Reynolds P.C. Postmortem tissue methamphetamine concentrations following selegiline administration. *J. Anal. Toxicol.* **14**: 330-331; 1990.
- Meites J. Neuroendocrine basis of aging in the rat. In : Everitt A.V., Walton J.R., eds. *Regulation of neuroendocrine aging*. Basel : Karger A.G., pp 37-50. 1988.
- Meites J., Goya R. and Takahashi S. Why the neuroendocrine system is important in aging processes. *Exp. Gerontol.* **22** : 1-15; 1987.
- Mendis N., Pare C.M.B., Sandler M., Glover V and Stern G.M. Is the failure of (-)deprenyl, a selective monoamine oxidase type B inhibitor, to alleviate depression related to freedom from the cheese effect? *Psychopharmacology* **73**: 87-90 ; 1981.
- Mendlewicz J. and Youdin M.B.H. L- Deprenyl, a selective monoamine oxidase type B inhibitor, in the treatment of depression: a double blind evaluation. *Br J. Psychiatry* **142**: 508-511 ; 1983.
- Mendlewicz J. and Youdin M.B.H. Monoamine-oxidase inhibitors and prolactin secretion. *Lancet.* **11**: 507; 1977.

- Mogi, M., Harada, M., Kojima, K., Kiuchi, K., Nagatsu, I. and Nagatsu, T. Effects of repeated systemic administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on striatal tyrosine hydroxylase activity in vitro and tyrosine hydroxylase content. *Neurosci. Lett.* **80**: 213-218; 1987.
- Monnier V.M. Nonenzymatic glycosylation, the Maillard reaction and the aging process. *J. Gerontol. Biol. Sci.* **45**: B105-B111 ; 1990.
- Morgenroth V.H., Hegstrand L.R, Roth R.H. and Geengard P. Evidence for involvement of protein kinase by AMP of brain tyrosine 3-monooxygenasa. *J. Biol. Chem.* **250** : 1946-1948. FALTA AÑO
- Morita K., Teraoka K. and Oka M. Interaction of cytoplasmic tyrosine hydroxylase with cromaffin granule. In vitro studies on association of soluble enzyme with granule membranes and alteration in enzyme activity. *J. Biol. Chem.* **262** : 5654-5658 ; 1987.
- Myllyla V.V., Sotaniemi K.A., Vuorinen J.A. and Heinonen H.E. Selegiline as primary treatment in de novo parkinsonian patients. *Neurology* 1991.
- Nagatsu T., Levitt M. and Udenfriend S. Tyrosine hydroxylase : the initial step in norepinephrine biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **239** : 2910-2917; 1964.
- Nagatsu T., Mizutani K., Nagatsu K., Matasuura S. and Sugimoto T. Pteridine as cofactor or inhibitor of tyrosine hydroxylase. *Biochem. Pharmacol.* **21** : 1945-1953.; 1972.
- 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.
- Nixon R.A., Cataldo A.M., Paskevich P.A., Hamilton D.J., Wheelock T.R. and Kanaley-Andrews L. The lysosomal system in neurons: involvement at multiple stages of Alzheimer's disease pathogenesis. *Ann. NY Acad. Sci.* **674** : 65-88 ; 1992.

- O'Callaghan, J. P. and Miller, D. B. The concentration of glial fibrillary acidic protein increases with age in the mouse and rat brain. *Neurobiol. Aging*. **12**: 171-174; 1991.
- O'Regan D., Kwok R.P.S., Yu P.H., Bailey 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.
- Olanow C.W. Oxidation reactions in Parkinson's disease. *Neurology* **40** (suppl 3): 32-37, 1990.
- Oliver C.N., Ahn B.W., Moerman E.J. Goldstein S. and Stadman E.R. Age-related changes in oxidized proteins. *J. Biol. Chem.* **262**: 5488-5491; 1987.
- Oliver C.N., Levine R.L. and Stadman E.R. A role of mixed function oxidation reactions in the accumulation of altered enzyme forms during aging *J. Am. Geriatr. Soc.* **35**: 947 ; 1987.
- Oliver C.N., Levine R.L. and Stadman E.R. in *Metabolic Interconversion of Enzymes*. H. Holzer Ed.(Springer-Verlag, Berlin) pp. 259-268. 1981
- 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 hemitranssection. *Life Sci.* **26**: 139-146 ; 1980.
- Oreland L., Johansson F and Ekstedt J. Dose regimen of Deprenyl (selegiline) and platelet MAO activities. *Acta Neurol. Scand. Suppl.* **95**: 87-89 ; 1983.
- Orgel L.E. The maintenance of the accuracy of protein synthesis And its relevances to aging. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, **49**: 517-521; 1963.
- Oyanagi, K., Takeda, S., Takahashi, H., Ohama, E. and Ikuta, F. A quantitative investigation of the substantia nigra in Huntington's disease. *Ann. Neurol.* **26**: 13-19; 1989.

- 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.
- Pasqualini C., Guibert B., Frain O. and Leviel V. Evidence for protein kinase C involvement in the short-term activation by prolactine of tyrosine hydroxylase in tuberoinfundibular dopaminergic neurons. *J. Neurochem.* **62**: 967-977; 1994.
- Paxinos, G. and Watson, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* Academic Press, New York. 1986.
- Peden D.B., Hohman R.H., Brown M.E., Mason R.T., Berkebile C., Fales H.M. and Kaline M.A. Uric acid is a major antioxidant in human nasal airway secretions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 7638-7642; 1990.
- Pérez-Campo R., López-Torres M., Paton D., Sequeros E. and Barja de Quiroga G. Lung antioxidant enzymes, peroxidation, glutathione system and oxygen consumption in catalasa inactivated young and old *Rana perezi* frogs. *Mech. Ageing Dev.* **56**: 281-292; 1990.
- 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- 274 ; 1986.
- Piccinin G.L., Finali G. and Piccirilli M. Neuropsychological effects of L-deprenyl in Alzheimer's dementia. *Clin. Neuropharmacol.* **2**: 147-163 ; 1990.
- Pigeon D., Ferrera P., Gros F. and Thibault J. Rat phaeochromocytoma tyrosine hydroxylase is phosphorylated on serine 40 by an associated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **262** : 6155-6158 ; 1987.
- Pilas B., Sarna T., Kalyanarman B. and Swartz H.M. The effect of melanin on iron-associated decomposition of hydrogen peroxide. *Free Radic. Biol. Med.* **4**: 285-293 ;1988.
- Poirier L.J., Giguère M. and Marchand R. Comparative morphology of the substantia nigra and ventral tegmental area in the monkey, cat and rat. *Brain Res Bull.* **11**: 371-397 ; 1983.

- Poirier, J., Kogan, S. and Gauthier, S. Environment, genetics and idiopathic Parkinson's disease. *Can. J. Neurol. Sci.* **18**: 70-76; 1991.
- Pryor W.A. The free radical theory of aging revisited : A critique and a suggested disease-specific theory. In H.R. Warner, R.N. Butler, R.L. Sprott and E.L. Schneider (Eds.) *Modern biological theories of aging.* pp. 89-112. New York, Raven Press. 1987.
- 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.,and Singer T.P. Inhibition of mitochondrial NADH dehydrogenase by pyridine derivates and its possible relation to experimental and idiopathic parkinsonism. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **135**: 269-275; 1986.
- Rao G., Xia E. and Richarson A. Effect of age on the expression of antioxidant enzymes in male Fischer F344 rats. *Mech. Ageing Dev.* **53**: 49-60: 1990.
- Reinhard J.F. jr., Smith G.K. and Nichol C.A. A rapid and sensitive assay for tyrosine-3-monooxygenase based upon the release of ³H₂O and adsorption of (³H)tyrosine by charcoal. *Life Sci.* **39** : 2185-2189; 1986
- Reinier A. and Anderson K.D. The patterns of neurotransmitter and neuropeptide co-occurrence among striatal projection neurons: conclusion based on recent findings. *Brain Res.* **15**: 251-265 ;1990.

- Reinier A. The co-occurrence of substance P-like immunoreactivity and dynorphin-like immunoreactivity in striatopallidal and striatonigral projection neurons in birds and reptiles. *Brain Res.* **371**: 155-161 ; 1986.
- Reis D.J., Ross R.A. and Joh T.H. Changes in activities and amounts of enzymes synthesizing catecholamines and acetylcholine in brain, adrenal medulla sympathetic ganglia of aged rat and mouse. *Brain. Res.* **136** : 465-474 ;1977.
- Richardson J.S., Subbarao K.V. and Ang L.C. Autopsy Alzheimer's brain show increased peroxidation to an in vitro iron challenge. *Neurobiol. Aging* **11**: 286. 1990.
- Richelson E. and Pfenning M. Blockade by antidepressants and related compounds of biogenic amine uptake into rat brain synaptosomes : most antidepressants selectively block norepinephrine uptake. *Eur. J. Pharmacol.* **104** : 277-286 1984.
- Richter C., Park J.W. and Ames B.N. Normal oxidative damage and nuclear DNA is extensive. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85** : 6465-6467; 1988.
- Richter C., Park J.W. and Ames B.N. Normal oxidative damage and nuclear DNA is extensive. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85** : 6465-6467 ; 1988.
- 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., 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., Youdim 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.

- Riederer, P., and Wuketich, S. Time course of nigrostriatal degeneration in Parkinson's disease *J. Neural. Transm.* **38**: 277-301; 1976.
- Rinne J.O., Røyttä M., Paljärvi., Rummukainen J. and Rinne U.K. Selegiline (deprenyl) treatment and death of nigral neurons in Parkinson's disease. *Neurology* **41**: 859-861 ; 1991.
- Ritcher C., Park J.W. and Ames B.N. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear-DNA is extensive. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 6465-6467; 1988.
- Rivett A.J. The effect of mixed function oxidation of enzymes on their susceptibility to degradation by a nonlysosomal cysteine proteinase. *Arch. Biochem. Biophys.* **243**: 624; 1985.
- Roberson B.C., Hommer D.W. and Skirboll L.R. Electrophysiological evidence for a non opioid interaction between dynorphin and GABA in the substantia nigra of the rat. *Neuroscience* **23**: 483-490 ; 1987.
- Robinson D.S., Nies A., Davis J.N., et al. Ageing, monoamines, and monoamine-oxidase levels. *Lancet.* **1**: 290-291 ; 1972.
- Rosen, D.R., Siddique, T. et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* **362**: 59-62; 1993.
- Ross S.B. Pharmacological and toxicological exploitation of amine transporters. *Trends Pharmacol. Sci.* **8** : 227-231 ; 1987.
- Roth J.A. Phenol sulfotransferase. In: *Neuromethods 1: Neurochemistry.* Boulton A.A., Baker G.B. and Yu P.H. (Eds) Humana Press, Clifton, New Jersey, pp. 575-604 ;1984.
- Rudman D. Occasional hypothesis: Growth hormone, body composition and aging. *J. Am. Geriatr. Soc.* **33** : 800-807 ; 1985.
- Rudman D., Kutner M.H., Roger C.M., Lubin M.F., Fleming G.A. and Bain R.P. Impaired growth hormone secretion in the adult population: relation to age and adiposity. *J. Clin. Invest.* **67** : 1361-1369 ; 1981.
- 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.
- Sahakian J.A., Shames B.D., Levine R.L. *FASEB J.* **5**: A1177. 1991.
- Sakai S.T. Corticonigral projections from area 6 in the raccoon. *Exp. Brain Res* **73** : 498-504 ; 1988.
- 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.
- Scachter M., Marsden C.D. Parkes J.D., Jenner P. and 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.
- 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., Mann V.M., Cooper J.M., Dexter D., Daniel S.E., Jenner P., Clark J.B. and Marsden C.D. Anatomic and disease specificity of NADH CoQ1 reductase (Complex I) deficiency in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* **55** : 2142-2145 ; 1990.
- Smith C.D et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**: 10540. 1991.
- Sohal R., Arnold L. A. and Sohal B.H. Age-related changes in antioxidant enzymes and peroxidant generation in tissues of the rat with special reference to parameters in two insect species. *Free Radical Bio. Med.* **10**: 495-500 ; 1990b.
- Sohal R., Arnold L.L. and Orr W.C. Effect of age on superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase, inorganic peroxides, TBA-reactive material, GSH/GSSG, NADPH/NADP⁺ in *Drosophila melanogaster*. *Mech. Ageing Dev.* **56**: 223-235 ; 1990a.
- Sonntag W.E., Forman L.J., Miki N., Trapp J.M., Gottschall P.E. and Meites J. L-DOPA restores amplitude of growth hormone pulses in old

- male rats to that observed in young male rats. *Neuroendocrinology* **34** : 163-168 ; 1982.
- Sonntag W.E., Steger R.V., Forman L.J. and Meites J. Decreased pulsatile release of growth hormone in old male rats. *Endocrinology*. **107** : 1875-1879 ; 1980.
- Sontag W.E. and Meites J. Decline in growth hormone secretion in aging animals and man. In : Everitt A.V., Walton J.R., eds. Regulation of neuroendocrine aging. Basel : Karger A.G., pp 111-124. 1988.
- Spector S., Gordon R., Sjoerdsma A. and Udenfriend S. End-product inhibition of tyrosine hydroxylase as a possible mechanism for regulation of norepinephrine synthesis. *Mol. Pharmacol.* **3** : 549-555 ; 1967.
- Stadman E.R. Oxidation of proteins by mixed-function system: implication in protein turnover, aging and neutrophil function. *Trends Biochem. Sci.* **11**: 11-12 ; 1986.
- Stadman E.R. Protein oxidation and aging. *Science* **257**: 1220-1224 ; 1992.
- Stanley E.F. and Ehrenstein G. A model for exocytosis based on the opening of calcium activated potassium channels in the vesicles. *Life. Sci.* **37** : 1985-1995 1985.
- Starke-Reed P.E. and Oliver C.N. Protein oxidation and proteolysis during aging and oxidative stress. *Arch. Biochem. Biophys.* **275**: 559 ; 1989.
- Starke-Reed P.E., Oliver C.N. and Stadman E.R. *FASEB J.* **1**: 36, 1987.
- 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.
- Stenström A., Hardy J. and Orelund L. Intra- and extra-dopamine-synaptosomal localization of monoamine oxidase in striatal homogenates from four species. *Biochem. Pharmacol.* **36**: 2931-2935 ; 1987.

- Stephen J.K., Masserano J.M., Vulliet P.R., Weiner N. and Nakane P.K. Immunocytochemical localization of tyrosine hydroxylase in rat adrenal medulla by the peroxidase labeled antibody method: Effect of enzyme activation on ultrastructural distribution of the enzyme. *Brain. Res.* **209** : 339-354; 1981.
- Sun Y. Free radicals, antioxidants enzymes and carcinogenesis. *J. Free Radic. Biol. Med.* **8**: 583-599; 1990.
- Szoco E., Kalasz H., Kerecsen L. and Magyar K. Binding of (-) deprenyl to serum proteins. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.* **36**: 413-421; 1984.
- Takahashi S. and Meites J. GH binding to liver in young and old female rats: relation to somatomedin-C secretion. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **186** : 229-233 ; 1987.
- Takahashi S., Gottschall P.E., Quigley K.L., Goya R.G. and Meites J. Growth hormone secretory patterns in young, middle -aged and old female rats. *Neuroendocrinology.* **46** : 137-142 ; 1987.
- Tanner C.M. The role of environmental toxins in the etiology of Parkinson's disease. *Tins* **12**: 49-54 ; 1989.
- Tariot P.N., Sunderlat T., Cohen R.M., Newhouse P.A., Yount D., Mellow A., Weingartner H., Mueller A. and Murphy D.L. L-deprenyl in Alzheimer's disease. Preliminary evidence for behavioral change with monoamine oxidase inhibition. *Arch. Gen. Psychiatry.* **44**: 427-433 ; 1987b.
- Tariot P.N., Sunderlat T., Weingartner H., Murphy D.L., Welkowitz J.A., Thompson K. and Cohen R.M. Cognitive effects of L-deprenyl in Alzheimer's disease. *Psychopharmacology* **91**: 489-495 ; 1987a.
- Tatton W.G., Greenwood C.E., Salo P.T. and Seniuk N.A. Transmitter synthesis increases in substantia nigra neurons on aged mouse. *Neurosci. Letters.* **131** : 179-182 ; 1991.
- Tatton W.G., Greenwood C.E., Verrier M.C., Holland D.P., Kwan M.M. and Biddle F.E. Different rates of age-related loss for four murine monoaminergic neuronal populations. *Neurobiol. Aging.* **12** ;1991.

- Tatton, W.G., Greenwood, C.E., Salo, P.T. and Seniuk, N.A. Transmitter synthesis increases in substantia nigra neurons of the aged mouse. *Neurosci. Letters*. **131**: 179-182 ; 1991.
- Terry R.D., Masliah E., Salmon D.P., Butters N., DeTeresa R., Hill R., Hansen L.A. and Katzman R. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease : synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann. Neurol.* **30** : 572-580 ; 1991.
- Teychenne P.F. and Parker S. Double-bind, crossover, placebo controlled trial of selegiline in Parkinson's disease - an interim analysis. *Acta Neurol. Scand.* **126**: 119-125 ; 1989.
- Tomlinson B.E. and Corsellis J.A.N. Ageing and the dementias. In J.H. Adams, J.A.N. Corsellis and L.W. Duchen, (Eds.) Greenfield's Neuropathology, 4th edn., Edward Arnol, London. pp 951-1025, 1984.
- Traystman R.J., Kirsh J.R. and Koehler R.C. Oxygen radical mechanisms of brain injury following ischemia and reperfusion. *J. Appl. Physiol.* **71**(4) : 1185-1195 ; 1991.
- Tyler D.D. Polarographic assay and intracellular distribution of superoxide dismutase in rat liver. *Biochem. J.* **147**: 493-504 ; 1975.
- Uchihara, T., Kondo, H., Kosaka, K. and Tsukagoshi, H. Selective loss of nigral neurons in Alzheimer's disease: a morphometric study. *Acta Neuropathol.* **83**: 271-276; 1992.
- Uchihara, T., Tsuchiya, K. and Kosaka, K. Selective loss of nigral neurons in Pick's disease: a morphometric study. *Acta Neuropathol.* **81**: 155-161; 1990.
- Udenfriend S., Zaltzman-Nirenberg P. and Nagatsu T. Inhibitor of purified beef tyrosine hydroxylase. *Biochem. Pharmacol.* **14** : 837-845; 1965.
- Upton A.C. Pathobiology, in: C.E. Finch and L. Hayflick (Eds.). The Biology of Aging, Van Nostrand Reinhold, New York, pp. 523-535. 1977.
- Uvnas B. and Aborg C.H. Concomitant release by ion exchange of catecholamines (CA) and adenosine triphosphate (ATP) from bovine

- chromaffin granules superfused with isotonic sodium or potassium salt solutions. *Acta Physiol. Scand.* **129** : 585-586 ; 1987.
- 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.
- Vega J.A., Del Valle M. and Amenta F. Expression of neurofilament proteins in the rat cerebellar cortex as a function of age : an immunohistochemical study. *Mech. Ageing Dev.* **73** : 9-16 ; 1994.
- Venero J.L., Machado A. and Cano J. Turnover of dopamine and the serotonin and their metabolites in striatum of aged rats. *J. Neurochem.* **56**: 1940-1948; 1991.
- Venero, J.L., Machado, A. and Cano, J. Age affects on monoamine turnover of the rat substantia nigra. *Brain Res.* **557**: 109-114; 1991.
- Venero, J.L., Machado, A. and Cano, J. Changes in monoamines and their metabolites in substantia nigra of aged rats. *Mech. Ageing. Dev.* **49**: 227-233; 1989.
- Vicent S., Höckfelt T., Christenson I. and Terenius L. Immunohistochemical evidence for a dynorphin immunoreactive striatonigral pathway. *Eur. J. Pharmacol.* **85**: 251-252. 1982.
- Villacara A., Zanchin G. and Spatz M. Effect of arachidonic acid on cultured cerebrovascular endothelium: permeability, lipid peroxidation and membrane fluidity. *Acta Neuropathol.* **78** : 310-316 ; 1989.
- Volicer L. and Crino, P.B. Involvement of free radicals in dementia of the Alzheimer type: a hypothesis. *Neurobiol. Aging*, **11**: 567-571; 1990.
- Vrana K.E., Allhiser C.L. and Roskoski R. Jr. Tyrosine hydroxylase activation and inactivation by protein phosphorylation conditions. *J. Neurochem.* **36** : 92-100 ; 1981.
- Vulliet P.R., and Weiner N.A schematic model for the allosteric activation of tyrosine hydroxylase. See Usdin et al. pp. 15-24. 1981.

- Vulliet P.R., Langan T.A., and Weiner N. Tyrosine hydroxylase a substrate of cAMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77** : 92-96 ; 1980.
- Wajsbordt 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.
- Ward C.D., Duvoisin R.C., Ince S.E. et al. Parkinson's disease in 65 pairs of twins and in a set of cuadruplets. *Neurology* **33**: 815-824 ; 1983.
- Weiner N., Cloutier G., Bjur R. and Pfeffer R.I. Modification of norepinephrine syntesis in intact tissue by drugs and during short-term adrenergic nerve stimulation. *Pharmacol. Rev.* **24** : 203-221; 1972.
- Whitehouse P.J., Price D.L., Struble R.D., Clark A.W., Coyle J.T. and DeLong M.R. Alzheimer's disease and senile dementia : loss of neurons in the basal forebrain. *Science.* **215** : 1237-1239 ; 1982.
- Wisniewski H.M. and Iqbal K. Aging of the brain and dementia. *TINS* **3** : 226-228.
- Wisniewski H.M. and Terry R.T. Reexamination of the pathogenesis of the plaque. In HM Zimmerman (ed) " Progres in Neuropathology" Vol. 2 pp 1-26. New-York Grune and Stratton. 1973.
- Wol, H.K., Crain, B.J. and Siddique, T. Degeneration of substantia nigra in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Clin. Neuropath.* **10**: 291-296; 1991
- Wolf M.E. and Roth R.H. Dopamine autoreceptors. In: Creese I. and Fraser C.M. (Eds) Dopamine receptors. Alan R., Liss, Inc, New York pp. 45-96 .1987.
- Wolf M.E., Lewitt P.A., Bannon M.J., Dragovic L.J. and Kapatos G. Effect of aging on tyrosine hydroxylase protein content and the relative number of dopamine nerve terminals in human caudate. *J. Neurochem.* **56** : 1191-1200 ; 1991.

- Wolff S.P. and Dean R.T. Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of " autoxidative glycosylation" in diabetes. *Biochem. J.* **245**: 243-250; 1987.
- Yamauchi T. and Fujisawa H. Involvement of calmodulin in the Ca²⁺-dependent activation of rat brainstem tyrosine 3-monooxygenase. *Biochem. Int.* **1** : 98- 104 ; 1980.
- Yamauchi T., Nakata H. and Fujisawa H. A new activator protein that activate tryptophan 5-monooxygenase in the presence of Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase. Purification and characterization. *J. Biol. Chem.* **256** : 5404-5409; 1981.
- Yanagihara N., Tank A.W., Langan I.A. and Weiner N. Enhanced phosphorylation of tyrosine hydroxylase at more than one site is induced by 56 mM K⁺ in rat pheochromocytoma PC12 cells in culture. *J. Neurochem.* **46** : 562-568 ; 1986.
- Yanker B.A., Dawes L. R., Fisher S., Villa-Komaroff L., Oster-Granite M.L. and Neve R. Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease. *Science* **245** : 417-420 ; 1989.
- Yanker B.A., Duffy L.K. and Kirschner D.A. Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein : reversal by Tachykinin neuropeptides. *Science* **250** : 279-282 ; 1990.
- 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. Brain iron: neurochemical and behavioural aspects. London : Taylor and Francis. 1988.
- Youdim M.B.H., Ben-Shachar D. and Riederer P. The role of monoamine oxidase in iron-melanin interaction and intracellular calcium in Parkinson's disease. *J. Neural. Transm. Suppl.* **32** : 239-248 ; 1990.

- Yu P.H. Monoamine oxidase. In: *Neuromethods 5: Neurotransmitters enzymes*. Boulton A.A., Baker G.B. and Yu P.H. (Eds) Humana Press, Clifton, New Jersey, pp. 235-272 (1986).
- Zigmond R.E., Schwarzschild M.A. and Rittenhouse A. Acute regulation of tyrosine hydroxylase by nerve activity and by neurotransmitter via phosphorylation. *Ann. Rev. Neurosci.* **12** : 415-461 ; 1989.
- 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.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de D. CRISTINA PEREZ DE LA CRUZ titulada Inactivación por oxidación de la enzima tirosina hidroxilasa de rata durante el proceso de envejecimiento: efecto protector del tratamiento con deprevil acordó otorgarle la calificación de APTO CUM LAUDE

Sevilla, 21 de abril 1995

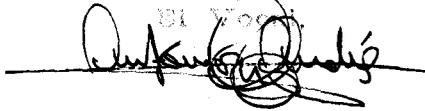
El Vocal,



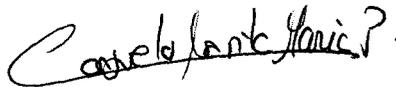
El Vocal,



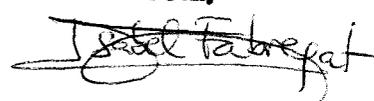
El Vocal,



El Secretario,



El Vocal,



El Doctorado,

