

R. 1368J
T. 1017

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA

**EFFECTO DE LA DISMINUCIÓN DE
LA CAPACIDAD DE PROTECCIÓN
FRENTE A OXIDACIONES SOBRE
EL SISTEMA DOPAMINÉRGICO
NIGRO-ESTRIADO**

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARÍA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral
al folio 162 número 88 del libro
Correspondiente a 04 OCT. 1999
Sevilla,

El Jefe del Negociado de Tesis, P.A.



TESIS DOCTORAL

MARINA ROMERO RAMOS

Sevilla, 1999.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Depositado en
de la
de esta Universidad desde el día
hasta el día

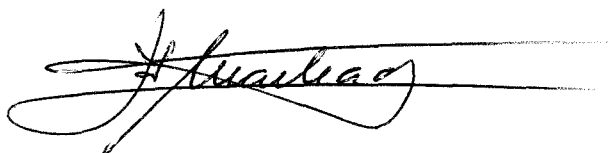
Sevilla de de 19
EL DIRECTOR DE

CS 1254358

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

CERTIFICA: Que la tesis doctoral titulada "Efecto de la disminución de la capacidad de protección frente a oxidaciones sobre el sistema dopaminérgico Nigro-Estriado", presentada por la **LDA. MARINA ROMERO RAMOS** para optar al grado de Doctora en Farmacia, ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica, Bromatología, Toxicología y Medicina Legal de la Universidad de Sevilla, reuniendo los requisitos exigidos.

Y para que así conste, firmo la presente en
Sevilla, Septiembre de 1999.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'A. Machado', written over a horizontal line.

Fdo. Alberto Machado de la Quintana

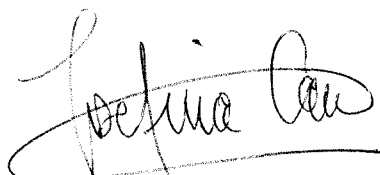
**ALBERTO MACHADO DE LA QUINTANA Y JOSEFINA CANO GARCÍA,
CATEDRATICOS DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA, BROMATOLOGIA,
TOXICOLOGIA Y MEDICINA LEGAL DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA.**

CERTIFICAN : Que la tesis doctoral titulada "Efecto de la disminución de la capacidad de protección frente a oxidaciones sobre el sistema dopaminérgico Nigro-Estriado", presentada por la **LDA. MARINA ROMERO RAMOS** para optar al grado de Doctora en Farmacia, ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica, Bromatología, Toxicología y Medicina Legal de la Universidad de Sevilla, reuniendo los requisitos exigidos.

Y para que así conste, firmamos la presente en
Sevilla, Septiembre de 1999.



Fdo. Alberto Machado de la Quintana

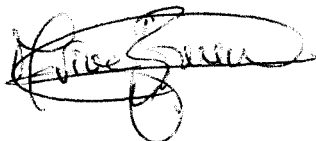


Fdo: Josefina Cano García.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA

**DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA, BROMATOLOGIA,
TOXICOLOGIA Y MEDICINA LEGAL**

Tesis que presenta la Lda. Marina Romero Ramos
para optar al grado de Doctor en Farmacia.



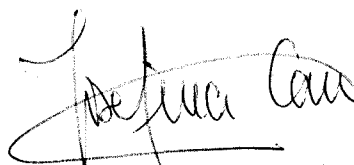
Fdo: Marina Romero Ramos

Director



Fdo: Dr. Alberto Machado
de la Quintana

Directora



Fdo: Dra. Josefina Cano
García

Harman define el envejecimiento como la acumulación de cambios en las células y en los tejidos con el aumento progresivo de las posibilidades de muerte (Harman, 1956). A pesar de que existen numerosas observaciones clínicas y biológicas, aun no se han esclarecido las causas y los mecanismos por los cuales se produce el envejecimiento. Así, se pueden implicar en la etiología del envejecimiento a las alteraciones genéticas, del desarrollo, los procesos patológicos, las toxinas medioambientales o explicarse como un proceso innato de la célula.

Pero una de las hipótesis mas aceptadas en la actualidad es la **Teoría de los Radicales Libres**, la cual postula que el envejecimiento es causado por reacciones mediadas por radicales libres, las cuales ocurren al azar y de manera no específica, originando un cúmulo de daños en las moléculas biológicas (Harman, 1956).

La literatura biomédica esta repleta de afirmaciones sobre la relación existente entre los llamados "radicales libres" y distintas enfermedades humanas. Así se ha podido comprobar su intervención en mas de 100 desordenes diferentes entre lo que se incluyen enfermedades tan distintas como la artritis reumatoide, la fibrosis quística, la isquemia gastrointestinal o el SIDA. Durante mucho tiempo se ha considerado que el daño causado por los radicales libres es un factor de riesgo en los procesos neurodegenerativos que acompañan al envejecimiento en una amplia variedad de especies animales desde los insectos a los humanos (Ames y col., 1993). Desde que la teoría de los radicales libres fue propuesta por Harman, se han llevado a cabo una gran cantidad de estudios para hallar una correlación entre el estrés oxidativo, los sistemas de defensa antioxidantes, el envejecimiento y la esperanza de vida. Aunque *in vivo* solo se han observado unas modestas correlaciones, se intenta demostrar una relación causa-efecto directa usando

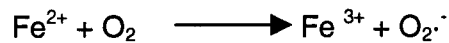
INTRODUCCIÓN

antioxidantes en animales y cultivos celulares como tentativa para aumentar la esperanza de vida. Dichos estudios han dado resultados definitivos y además han demostrado la ubicuidad de los radicales libres y su considerable potencial destructivo en tejidos vivos. Por esto, una mejora en la comprensión de los procesos en los que intervienen los radicales libres nos conducirá al desarrollo de posibles intervenciones dirigidas a una mejora de la salud y un aumento de la esperanza de vida.

I.1. RADICALES LIBRES.

Los radicales libres (RL) son átomos o moléculas que tienen un orbital con un electrón desapareado, lo que les hace ser inestables y, por lo tanto, **altamente reactivos**, siendo capaces de extraer un electrón de otros átomos o moléculas para así estabilizarse completando la vacante en su orbital. Los radicales libres derivados del oxígeno o especies reactivas de oxígeno (ERO), como el radical hidroxilo (OH·) y en especial el **anión superóxido**, $O_2^{\cdot-}$, se producen de manera constante en el organismo (Yu y Yang, 1996). Otros tipos de RL son los tioles (RS), el óxido nítrico (NO·) y el dióxido de nitrógeno ($N O_2\cdot$). Aunque los radicales libres intervienen en funciones beneficiosas para el organismo (por ejemplo, poder bactericida) su extremada reactividad hace que ocasionen importantes alteraciones moleculares siendo altamente perjudiciales tanto a nivel celular como molecular.

La fosforilación oxidativa es el principal mecanismo fisiológico de generación RL en célula, ya que el $O_2^{\cdot-}$ aparece como subproducto de la reducción del O_2 por el sistema de transporte de electrones en la mitocondria ((Ambrosio y col., 1993) (Guidot y col., 1993). Este anión se genera también mediante la reducción de iones de Fe^{2+} y otros metales de transición.



Por lo que una alteración de la fosforilación oxidativa puede dar lugar a una producción elevada de los RL, los cuales pueden actuar sobre la misma cadena respiratoria aumentando aun más la producción de dichas especies. Así, la disfunción del proceso de fosforilación puede ser el paso inicial de un proceso que conduciría a la amplificación de un déficit inicialmente pequeño y que podría llevar a una situación extrema que supondría una degeneración progresiva de la función celular.

El $\text{O}_2^{\cdot-}$ mediante reacciones enzimáticas de las que hablaremos más tarde se transforma en H_2O_2 , que se suma al H_2O_2 generado por el metabolismo neuronal. Tanto el $\text{O}_2^{\cdot-}$ como el H_2O_2 son poco reactivos y sin embargo pueden causar daño al generar radicales hidroxilos (Warner y col., 1994), mediante las reacciones de Haber Weiss (1) y Fenton (2):



De entre todos los RL, el $\text{OH}\cdot$ es una de las especies más reactivas en la química orgánica, con una vida media muy corta en los sistemas biológicos, atacando a casi todas las moléculas de la célula (Anbar y Neta, 1967). Como se deduce de las reacciones arriba indicadas, la concentración citosólica de iones metálicos como Fe^{2+} , Cu^{1+} o Mn^{2+} constituye así, en uno de los factores clave que establecen la tasa de producción de radicales libres por los tejidos (Aust y Morehouse, 1985).

Las Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) constituyen un colectivo que incluye no sólo los a RL con átomos de oxígeno, si no también derivados de oxígeno no radicales como H_2O_2 y el singlete de oxígeno. Un termino similar

INTRODUCCIÓN

se ha empezado a usar para los relacionados con el nitrógeno: Especies reactivas de Nitrógeno (ERN). Esta serie de EROs y ERNs inician una amplia variedad de reacciones de oxidación, incluyendo oxidaciones de bases en el ADN (Kasai y col., 1986), oxidaciones de los aminoácidos de las cadenas laterales de las proteínas (Stadman, 1992) y peroxidaciones de los enlaces dobles de los ácidos grasos insaturados en los lípidos (Pacifci y Davies, 1991). La cuestión más importante desde el punto de vista gerontológico es como estos procesos contribuyen al envejecimiento, así como al desarrollo de las patologías relacionadas con el mismo, tales como las enfermedades neurodegenerativas de Alzheimer y Parkinson. Es necesario introducir ahora el termino que se ha hecho ya tan popular en Neurociencia: "Estrés oxidativo"

I.2. ESTRES OXIDATIVO

El termino estrés oxidativo (EO) define aquella situación en la que hay un serio desequilibrio entre la producción de EROs y ERNs y los sistemas de defensa antioxidantes. El EO puede aparecer por:

1. **Disminución de antioxidantes** por causas tan distintas como **mutaciones** que afectan a la expresión de las enzimas antioxidantes, la actuación de **toxinas** que producen una disminución de dichas enzimas, o disminución de antioxidantes debido a defectos en la **dieta**. Estos procesos disminuyen los antioxidantes de tal manera que aunque no son productores directos de RL, finalmente generan EO.

2. **Producción de EROs y ERNs**, como puede ocurrir si hay una exposición prolongada a concentraciones elevadas de O₂, en presencia de **toxinas** que son por si especies reactivas (como el NO₂), o son metabolizados para generarlas, o por una acumulación excesiva de **sistemas naturales** que generan EROs y ERNs.

Este aumento del EO conduce a:

1. **Adaptación por activación** de los sistemas de defensa lo que puede conducir a:

- a) una protección no completa contra el daño.
- b) una protección completa.
- c) una superprotección, por lo que las células serán resistentes a situaciones de EO elevados impuestas posteriormente.

2. **Daño en los tejidos.** Entre los desórdenes moleculares ocasionados por los radicales libres se pueden citar los cambios en la función, estructura y fluidez de la membrana debidos a la **peroxidación lipídica** (Alvarez y col., 1993). Dichos hidroperóxidos lipídicos y sus productos de degradación son altamente citotóxicos, causan daños a enzimas y membranas dando lugar a una pérdida de la resistencia eléctrica y fluidez de la membrana y, finalmente, a una pérdida de la integridad de la misma (Putvinsky y col., 1979) (Pauls y Thompson, 1980), provocando alteraciones en el **flujo de calcio** (Bast y Goris, 1989), pudiendo causar incluso efectos mutagénico (Pietronigro y col., 1977).

Como sucede con otros radicales, la oxidación *in vitro* de ácidos grasos y de lípidos puros es un proceso lento, pero en presencia de iones metálicos de transición (especialmente hierro y cobre) y de compuestos con grupos hemo, está acelerado (Brown y Wuthrich, 1977; Allen y col., 1979). Una vez iniciada, la peroxidación es un proceso autocatalítico. Los radicales $\cdot\text{OH}$ son iniciadores de la peroxidación de lípidos por captación de un H^\bullet de la molécula de ácido graso y, por ello, el peróxido de hidrógeno, que en presencia de metales de transición da lugar a radicales hidroxilos, causa importantes daños a las membranas celulares (Lai y col., 1979).

Los RL también actúan sobre **polisacáridos** (despolimerización de ácido hialurónico), producen modificaciones en moléculas como el **colágeno** (LaBella y Paul, 1965; Dunn y col., 1991). Sobre el **ADN** inducen la formación

INTRODUCCIÓN

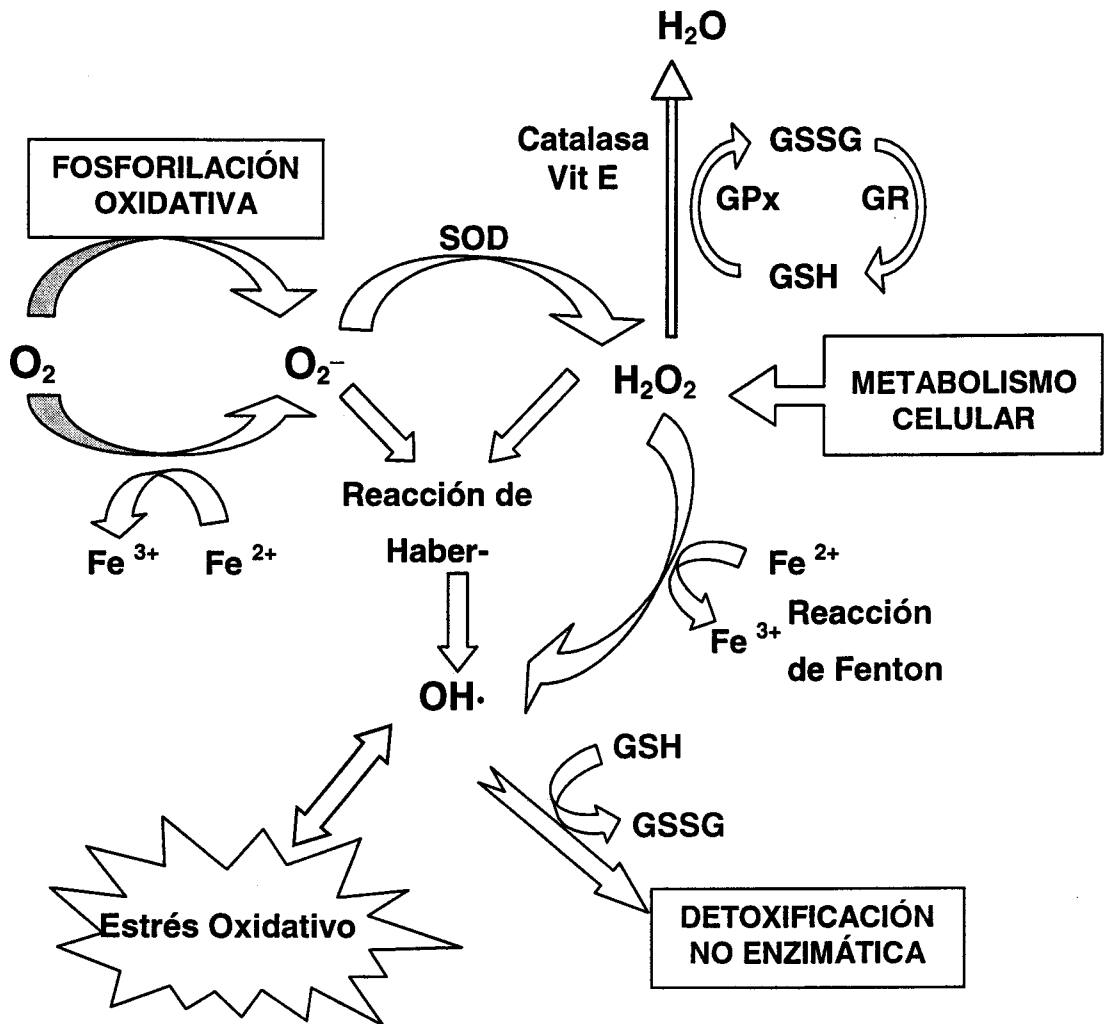
de 8-hidroxi-2-deoxiguanosina (8OH-dG) y pueden dar lugar también a deleciones cromosómicas o a una expresión génica alterada que conduzca a la **muerte celular** (Freeman y Crapo, 1982). Sobre las **proteínas**, dan lugar a la formación de grupos carbonilos por oxidación directa de los residuos aminoacídicos o mediante glicosilación (Stadman, 1992). Además, pueden formar puentes y fragmentar cadenas polipeptídicas.

Queda aún por dilucidar cual es la diana inicial atacada por los RL. Al parecer esto depende del tejido que sufre el daño, aunque en cierto momento estos se superponen (Halliwell, 1995).

3. Muerte celular. A la que se puede llegar a través de múltiples mecanismos, como la ruptura de membranas por un desequilibrio en la producción de ATP, lo que lleva a la célula a iniciar una respuesta suicida al no ser capaz de reparar eficientemente los daños sufridos en su ADN (Nicotera y Orrenius, 1994).

La muerte celular puede ocurrir por necrosis o por apoptosis, siendo ambas formas resultado de la aparición de EO (Nicotera y Orrenius, 1994). En la **necrosis** la célula se hincha y se rompe, liberando su contenido en el área circundante y afectando a las células próximas. El contenido puede incluir antioxidantes como catalasa y GSH así como prooxidantes como cobre e hierro. Por lo tanto, incluso si la célula no muere debido a procesos de oxidación, la necrosis conduce a un EO del tejido cercano. En la **apoptosis** la célula activa su propio mecanismo de suicidio. Las células apoptóticas, por lo general, no causan alteración de las células circundantes. La muerte por apoptosis puede verse acelerada en ciertas enfermedades donde parecen

Figura I.1. Representación esquemática de los procesos de generación de radicales libres y la cascada de generación y realimentación desencadenada por los mismos.



INTRODUCCIÓN

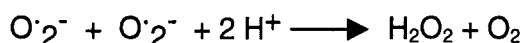
estar implicado el EO, como son las enfermedades neurodegenerativas (Olanow y col., 1996).

I.3. ANTIOXIDANTES

Halliwell y Gutteridge definieron como **antioxidantes** a cualquier sustancia que presente a concentraciones más bajas que las de un sustrato oxidable son capaces de retrasar significativamente o prevenir la oxidación de dichos sustratos (Halliwell y Gutteridge, 1989). El término **sustrato oxidable** incluye todo tipo de moléculas encontradas *in vivo*. Según como, donde y sobre que ejerzan el daño los RL, el organismo reacciona con distintos sistemas antioxidantes.

I.3.1. Superóxido dismutasa y Catalasa.

La Superóxido dismutasa (SOD) engloba una familia de metaloenzimas que catalizan la conversión:



Hay tres formas de esta enzima en mamíferos: CuZn-SOD, Mn-SOD y una tercera que contiene cobre y que se considera la SOD extracelular, la cual está ampliamente distribuida en tejidos y principalmente en plasma.

Esta enzima juega un papel fundamental en la protección frente a las altas concentraciones de oxígeno (Fridovich, 1974). Por ejemplo, la SOD inhibe a la enzima indolamina dioxigenasa, enzima que cataliza la ruptura del anillo indol de triptófano, triptamina y serotonina produciendo radical superóxido.

La Catalasa cataliza la conversión del H_2O_2 en H_2O y O_2 . Esta enzima esta confinada en los peroxisomas (Cotgrave y col., 1988), lo cual puede explicar porque en cerebro, donde no hay peroxisomas (Boveris y Chance, 1973) el contenido en catalasa es tan bajo. La afinidad de esta enzima por su sustrato es muy baja, de forma que sólo elimina el peróxido formado en el interior de los peroxisomas. Por lo tanto el, peróxido que se forma en la mitocondria o en el citosol es eliminado por el sistema glutatión.

I.3.2. Glutatión.

El glutatión es un tripéptido descubierto por J. de Rey Pailhade hace cien años; su estructura (Glu-Gly-Cys) se dedujo en 1930. (ver (Meister, 1989) para perspectivas históricas). Este compuesto está presente en el cerebro de mamíferos en concentraciones del orden de 2 a 3mM (Cooper y Kristal, 1997).

El glutatión ejerce varias funciones en el organismo:

1- Es un **depósito y transportador no tóxico de cisteína**. Unos valores elevados de la razón cisteína/cistina posiblemente origina interacciones con el receptor NMDA. Además la cisteína también puede ejercer una acción tóxica, más general al disponer de un grupo sulfidrilo que reacciona con los cetoácidos y los aldehidos originando tóxicos que pueden afectar a enzimas. En cambio el grupo sulfidrilo del GSH es menos reactivo, permitiendo así concentraciones 10 o 100 veces mayores en el cerebro de las permitidas para la cisteína (Cooper y Kristal, 1997).

2- Funciona como **cofactor** para una serie de enzimas entre las que se incluyen formaldehído deshidrogenasa, glioxilasa, dehidroclorinasa, maleiloacetato isomerasa, y prostaglandina endoperoxidasa isomerasa. En estas reacciones no se consume GSH pero este presumiblemente juega un papel crítico en el mecanismo catalítico (Meister, 1989)

INTRODUCCIÓN

3- Pero sobre todo el papel fundamental del GSH se desarrolla a nivel del cerebro como **protector frente al estrés oxidativo** que sufre este órgano, interaccionando directamente con los RL o participando en la defensa mediante reacciones redox catalizadas por enzimas. En estas reacciones dos moléculas de GSH se reducen formándose un puente disulfuro entre ambas dando glutatión disulfuro (glutatión oxidado, GSSG).

I.3.2.1. Glutatión y mitocondria.

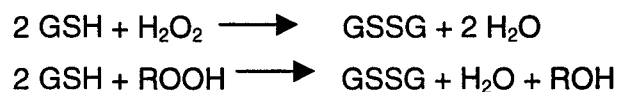
La mitocondria mantiene constata un deposito relativamente importante de GSH a través del sistema específico de transporte de GSH (Martensson y col., 1990). La disminución de este depósito en ratas destetadas prematuramente conduce a daños en las mitocondrias cerebrales y finalmente a la muerte (Jain y col., 1991) Meister, 1995). Es bien conocido el papel crucial que juega el GSH en el mantenimiento de la estructura y el funcionamiento mitocondrial (Gunter y col., 1994). Si la mitocondria no es capaz de defenderse de los daños sufridos (incluidos los generados por los EROs) sufre daños irreversibles y este proceso culmina con lo que se denomina un **periodo de permeabilidad mitocondrial (PPM)**. Como resumieron (Gunter y col., 1994), el PPM se caracteriza por un aumento repentino en la permeabilidad mitocondrial a pequeños iones y moléculas. Este aumento se asocia con el colapso total del potencial de membrana mitocondrial y un hinchamiento osmótico coloidal de la matriz mitocondrial. Entre los agentes capaces de desencadenar este fenómeno se encuentran aquellos compuestos capaces de disminuir el deposito de GSH de la matriz mitocondrial (Gunter y col., 1994); (Reed y Savage, 1995) o aumentar la razón GSSG/GSH (Beatrice y col., 1984) creando así estrés en la misma.

Experimentos llevados a cabo por Kristal y Dubinsky han demostrado que este proceso lo sufren tanto las mitocondrias de las células cerebrales como cultivos primarios de astrocitos (Kristal y Dubinsky, 1997). Hay evidencias de que la disfunción mitocondrial es el inicio de la cascada de la excitotoxicidad de glutamato, otra de las causas reconocidas de neurodegeneración (White y Reynolds, 1996)(Schinder y col., 1996). En resumen, todos estos descubrimientos sugieren que la homeostasis del GSH juega un papel importante en el mantenimiento de la integridad mitocondrial y por tanto celular en el cerebro y otros órganos.

1.3.2.2. Sistema antioxidante glutatión.

En este sistema de protección se incluyen dos enzimas esenciales en el cerebro: glutatión peroxidasa y glutatión reductasa.

La **glutatión peroxidasa** (GPx) cataliza la conversión de H_2O_2 en H_2O o peróxidos lipídicos ROOH en un grupo ROH usando para ello el GSH que será a su vez oxidado a GSSG.



Aunque la Catalasa también convierte H_2O_2 en H_2O , no está presente en las mitocondrias (a excepción del corazón) y además no es capaz de detoxificar peróxidos lipídicos. Por lo tanto, la GPx es esencial en la protección frente al H_2O_2 originado por la oxidación incompleta del O_2 (Benzi y Moretti, 1995a).

La importancia de la GPx ha sido recientemente apuntada por Zeevalk y col, (1997) que han mostrado que ratones que sobreexpresan GPx son resistentes al estrés oxidativo que resulta del tratamiento con malonato (un inhibidor de la succinato deshidrogenasa). Por el contrario, la adición de

INTRODUCCIÓN

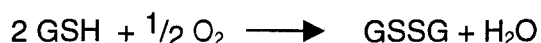
malonato a medios de cultivos de células mesencefálicas en las que se había disminuido los niveles de GSH supuso una respuesta tóxica (Zeevalk y col., 1997).

La otra enzima esencial en el papel protector del GSH es la **glutación reductasa** (GR) localizada en las mitocondrias, que completa el ciclo redox del GSH



Una de las propuestas para explicar la toxicidad del oxígeno es la inactivación de enzimas por el mismo (Haugaard, 1968). La inhibición de enzimas se debe fundamentalmente a la oxidación de sus grupos tioles (SH). En estos casos, el mecanismo de defensa frente a este tipo de oxidaciones es la presencia de concentraciones milimolares del GSH en el interior de las células. Éste es más asequible al oxígeno que los grupos -SH de las enzimas, protegiendo a éstas del daño. Asimismo, el GSH puede reaccionar con las enzimas regenerando los grupos -SH oxidados.

La reacción del GSH con el oxígeno también da lugar a la forma oxidada GSSG, según la reacción:

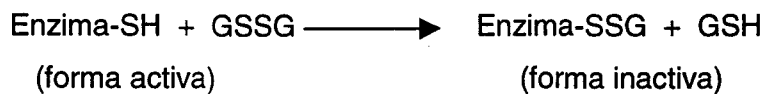


Esta reacción es lenta *in vitro*, pero es catalizada por trazas de iones metálicos de transición y en extractos de tejidos, los cuales contienen grandes cantidades de estos iones, es una reacción rápida (Ranade y col., 1979).

Bajo condiciones normales, el estrés oxidativo crea poca tensión en el ciclo redox del glutación y las concentraciones de GSSG normalmente se mantienen a niveles bajos en todos los tejidos. En realidad, en ratas la concentración de GSSG (en equivalentes de GSH) en el cerebro anterior es

normalmente <1% del GSH (Cooper y col., 1980)). La razón GSSG/GSH es tan baja debido a la actividad de la enzima GR y a la síntesis tan rápida de NADPH desde el ión NADP⁺ a través de la vía de las pentosas fosfato.

Dado la dependencia de NADPH, este sistema puede presentar problemas. Así a muy altas concentraciones de O₂, el NADPH puede no llegar a ser suficiente para regenerar todo el GSSG, bajando la razón GSH/GSSG y el GSSG en exceso puede inactivar a las enzimas:



Esta inhibición se ha visto, por ejemplo, en la adenilato ciclasa y en la fosforilasa fosfatasa (Ernst y col., 1978) Kosower y Kosower, 1978).

I.3.2.3. Glutación, Lípidos y Selenio.

Como ya hemos indicado también la GPx constituye un sistema de defensa celular frente a la acción de los peróxidos lipídicos. Existen dos tipos de enzimas con actividad glutación peroxidasa, una es seleno-dependiente, contiene selenio, como selenocisteína (Forstrom y col., 1978), y actúa, como vimos anteriormente, sobre el H₂O₂ y sobre los peróxidos lipídicos reduciéndolos a hidroxácidos estables y evitando así la formación de compuestos tóxicos como los aldehídos; la reacción es la siguiente:



Esta enzima está presente en la mayoría de los tejidos de la rata, si bien en los testículos existe una enzima independiente de selenio y cuya contribución a la actividad total glutación peroxidasa en tejidos como el hígado, es mínima.

INTRODUCCIÓN

La actividad de esta primera isoforma decrece en algunos tejidos de animales alimentados con dieta deficiente en selenio. Esto coincide con estudios de células en cultivo que mostraron ser Se deficientes con respecto a los requerimientos para la síntesis de GPx. Por el contrario al añadir Se hubo un aumento en estabilidad y/o traducción de los mRNA de GPx (Leist y col., 1996) (Jornot y Junod, 1995; Baker y col., 1993; Chang y Reddy, 1991). También se ha encontrado un aumento de la actividad de GPx tras incubación de neuroblastomas SH-SY5Y con Se. Esta regulación a la alza aumenta también la GR, probablemente para compensar la elevada formación de GSSG (Cassarino y col., 1997).

El segundo tipo de enzimas actúa sobre peróxidos lipídicos pero no sobre el H_2O_2 . En ciertas especies, incluyendo el hombre, este segundo tipo representa un alto porcentaje de la actividad total presente en hígado (Sies y col., 1978; Flohe, 1979)

En algunos casos, animales alimentados con dietas deficientes en selenio incrementan los peróxidos lipídicos en ciertos tejidos, así como la susceptibilidad a los efectos tóxicos del oxígeno (Sies y col., 1981).

Los lípidos también se protegen de los RL mediante la vitamina E que detiene la propagación de los RL mediante la formación del radical alfa-tocoferil y otros captadores de radicales. El radical alfa-tocoferil no se acumula, en parte porque este puede ser reducido no enzimáticamente a alfa-tocoferol mediante el GSH (Meister, 1989). Estas reacciones catalizadas por la GPx, la transferasa y transhidrogenasa resultan finalmente en la formación de GSSG. Un aumento de vitamina E en la dieta puede moderar la deficiencia en Se y viceversa (Nishiki y col., 1976). Alimentar con exceso de vitamina E lleva a una bajada en la actividad GPx en los tejidos de ratas (Yang y Desai, 1978).

I.3.3. Vitamina E

La vitamina E (alfa-tocoferol) es una vitamina liposoluble esencial para el funcionamiento neurológico normal (Muller y col., 1983)). Es importante para el mantenimiento de la integridad de la membrana, actuando tanto como captador de RL como estabilizador estructural (McCay y King, 1980) (Bauernfeind, 1984) (Niki y col., 1984) y detiene reacciones encadenadas que dañan a las células (Halliwell y Gutteride, 1985).

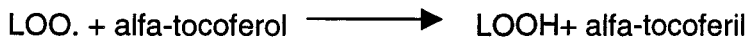
En humanos, la deficiencia en Vit E ocurre después de un periodo prolongado de malabsorción de grasas en enfermedades como colestasis hepáticas crónicas o abetalipoproteinemias. Dicha deficiencia conduce a una inmunodeficiencia y a desórdenes neurológicos caracterizados por una destrucción neuronal y una infiltración de astrocitos. Los desordenes neurológicos asociados a estas deficiencias incluyen degeneración cerebro espinal, ataxia, oftalmoplegia y miopatías (Satya-Murti y col., 1986). Síntomas similares aparecen en modelos animales de deficiencia en esta vitamina ((Nelson, 1980)y (Goss-Sampson y col., 1988)

En modelos animales, la vitamina E reduce la neurodegeneración de las células hipocampales después de un daño isquémico (Hara et al., 1990), intensifica la recuperación de la función motora tras un daño en la columna vertebral (Anderson y Means, 1988)y retrasa el avance de la enfermedad de Alzheimer (Sano y col., 1997). En células hipóxicas de cultivos, la vitamina E inhibe la peroxidación lipídica (Yoshida y col., 1985) y reduce la muerte neuronal asociada con el beta-amiloide (Behl y col., 1992).

Como ya hemos apuntado, parece que la vitamina E inhibe la peroxidación lipídica mediante la donación de un átomo de hidrógeno al radical peroxilo formando un lípido hidroperóxido y convirtiéndose en alfa-tocoferil. También es capaz de retirar el oxígeno singlete inhibiendo así el inicio de la peroxidación (Foote y col., 1978)Además del Sistema GSH,

INTRODUCCIÓN

también el ácido ascórbico (vitamina C) ayuda a mantener la vitamina E en su forma activa mediante su reducción desde el alfa-tocoferil y también reaccionando directamente con los radicales peróxido (Niki y col., 1984)



La vitamina E es también un regulador del metabolismo intermediario y como hemos dicho, actúa de manera sinérgica con el GSH y el ácido ascórbico como antioxidante y promueve la formación de anticuerpos humorales (Wefers y Sies, 1988)

Experimentos con liposomas y eritrocitos han demostrado que la protección ejercida es más efectiva cuando la vitamina E se encuentra en el interior de las membranas (Gutteridge, 1978) Experimentos en microsomas han puesto de manifiesto que el glutatión reducido es usado para mantener la concentración de alfa-tocoferol reduciendo el alfa-tocoferil (Leedle y Aust, 1990)



Por otra parte la regeneración del alfa-tocoferil por la vitamina C mediante la donación de un hidrogeno esta ampliamente demostrada (Mukai et al 1991, Packer et al 1979).



Aunque los niveles de la vitamina E no están alterados en los enfermos de Parkinson (Dexter y col., 1992) se ha visto que en pacientes con deficiencia en vitamina E por problemas de malabsorción, el numero de terminales dopaminérgicas esta disminuido (Dexter y col., 1994). En ratas, tras

52 semanas de dieta sin vitamina E, hubo una disminución en los cuerpos neuronales en SN que son las que se afectan en la enfermedad de Parkinson (Dexter y col., 1994a)

I.3.4. Vitamina C

La vitamina C o ácido ascórbico es una vitamina hidrosoluble, que participa en una gran cantidad de procesos fisiológicos. Interviene en la absorción de Fe^{3+} en el intestino reduciéndolo a Fe^{2+} que se absorbe más fácilmente; interviene también en la detoxificación de los RL (Burns, 1970; Levine, 1986) Quizás su función más conocida sea la de cofactor para la hidroxilación de prolina y lisina en la síntesis de colágeno, la proteína del tejido conectivo que está deteriorada en enfermos de escorbuto (Englard y Seifter, 1986)

Todas estas acciones derivan de su capacidad para actuar como donante de electrones, es decir, como agente reductor. Su oxidación es un proceso reversible, de dos pasos, que conlleva la formación del radical semidehidroascorbato, el cual al ser inestable se convierte en dehidroascórbico perdiendo un protón. Tras esto, por una serie de procesos enzimáticos se convierte en oxalato y l-treonato, que se excretan por orina.

En muchos casos, el ascorbato es oxidado al reaccionar rápidamente con O_2^- , $H O_2$. y el oxígeno singlete. Como estos radicales ejercen un efecto tóxico, el ascorbato ejerce un efecto protector frente a ellos. Sin embargo, el ascorbato puede ejercer también un efecto pro-oxidante, ya que, al favorecer la reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} permite que se inicie la reacción de Fenton. Así se han utilizado las mezclas de hierro y ascorbato para estimular la peroxidación lipídica (Wills, 1969). Recientemente se ha demostrado en humanos que dietas suplementadas con vitamina C aumentan los niveles de los parámetros que se usan como marcadores del daño oxidativo de ADN

INTRODUCCIÓN

(Podmore y col., 1998) También ejerce el mismo efecto reductor sobre Cu^{2+} generando OH (Auroma y Halliwell, 1989).

Se sabe que la vitamina C interviene en la formación de mielina (Eldridge et al. 1987), en la actividad Na^+ , K^+ ATPasa (Ng y col., 1985) en la síntesis de catecolaminas y neuropéptidos (Diliberto y Allen, 1981) (Glembotski y col., 1986), en la liberación de acetilcolina y norepinefrina (Kuo y col., 1979), en la unión de neurotransmisores a sus receptores (Leslie y col., 1980), en la distribución y número de receptores (Knaack y col., 1986) y en el aclaramiento de neurotransmisores (Wilson y Walz, 1988). A nivel del SNC se están descubriendo acciones del ascorbato como modulador de la transmisión en las sinapsis dopaminérgicas y glutamatérgicas (Rebec y Pierce, 1994). Tanto la dopamina como el glutamato están implicados en la liberación de ácido ascórbico y a su vez, ambos son regulados por la liberación del otro.

I.4. DOPAMINA: METABOLISMO

La Dopamina (DA) se incluye en el grupo de las catecolaminas que, como su nombre indica son compuestos que poseen un grupo catecol (anillo bencénico con dos sustituyentes hidroxilos adyacentes) y un grupo amino. Su síntesis se inicia a partir del aminoácido L-tirosina (Tyr). Este se encuentra disponible en los depósitos tisulares y llega al cerebro con el flujo sanguíneo, atravesando la barrera hematoencefálica mediante el sistema transportador de grandes aminoácidos neutros. En las neuronas catecolaminérgicas se hidroxila formando 3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA). Esta reacción está catalizada por la enzima **Tirosina hidroxilasa** (Tirosina-3-monooxigenasa, TH) (EC.1.14.16.2). La tasa de hidroxilación *in vivo* de la Tyr depende de la concentración y de la disponibilidad de sustratos específicos e inhibidores endógenos. Bajo condiciones fisiológicas, la concentración de Tyr

posiblemente satura a la enzima y, por tanto, no parece ser un factor limitante en la síntesis de DA (Murrin y col., 1976).

El segundo paso de esta ruta es la conversión de L-DOPA en DA mediante descarboxilación, reacción catalizada por la enzima L-aminoácido aromático descarboxilasa (L-AADC) (EC.4.1.1.28). Esta enzima es piridoxal fosfato-dependiente pero no es específica ni con respecto a los sustratos que utiliza, ni con respecto a su localización, ya que también puede encontrarse en neuronas serotoninérgicas y en otros órganos como riñón e hígado. La actividad de esta enzima es bastante superior a la de la TH, por lo que se considera al paso de la hidroxilación del aminoácido como el limitante de la síntesis de la DA.

Una vez sintetizada, la DA se almacenan en vesículas sinápticas a cuyo interior es transportada activamente a través de **transportador vesicular de DA (TVDA)**, quedando protegida de la degradación intraneuronal, siendo posteriormente liberada en respuesta a un potencial de acción. Una vez que la DA actúa sobre los receptores correspondientes es recaptado por la propia neurona presináptica o por la célula glial para ser degradado o difunde hacia lugares lejanos donde puede seguir ejerciendo su acción (Blackburn y col., 1967). El proceso de recaptación lo lleva a cabo una proteína que se agrupa en la familia de transportadores Na^+/Cl^- dependientes que transporta selectivamente esta catecolamina, por lo que se ha venido en llamar **Transportador de Dopamina (TDA)**.

La DA puede degradarse por dos rutas diferentes. En cada una de estas dos vías participan las mismas enzimas, la **monoamino oxidasa (MAO)** (EC. 1.4.3.4.) y la **catecol-O-metiltransferasa (COMT)** (EC.2.1.1.6.), aunque en orden diferente.

INTRODUCCIÓN

La MAO cataliza su desaminación oxidativa dando lugar al 3,4-dihidroxifenilacetaldehído (DHFA) mediante la siguiente reacción:



En dicha reacción, el metabolismo de DA está estequiométricamente ligado a la formación de peróxido de hidrógeno, el cual, como veremos posteriormente, puede generar radicales hidroxilos.

Se distinguen dos isoenzimas de la MAO, A y B. Identificadas por Johnston en 1968, se diferencian en base a la preferencia por el sustrato, especificidad del inhibidor, distribución tisular y celular, propiedades inmunológicas y las secuencias aminoacídica y la correspondiente nucleotídica (Westlund y col., 1985). Esta enzima se encuentra unida a la membrana externa de la mitocondria y tanto la MAO A como la B son capaces de metabolizar la DA. EL DHFA formado por acción de la MAO es muy inestable y es oxidado por la aldehído deshidrogenasa dando lugar al ácido 3,4-dihidroxifenil acético (DOPAC), el cual a continuación sale de la neurona y es tomado por la glía actuando sobre él la COMT.

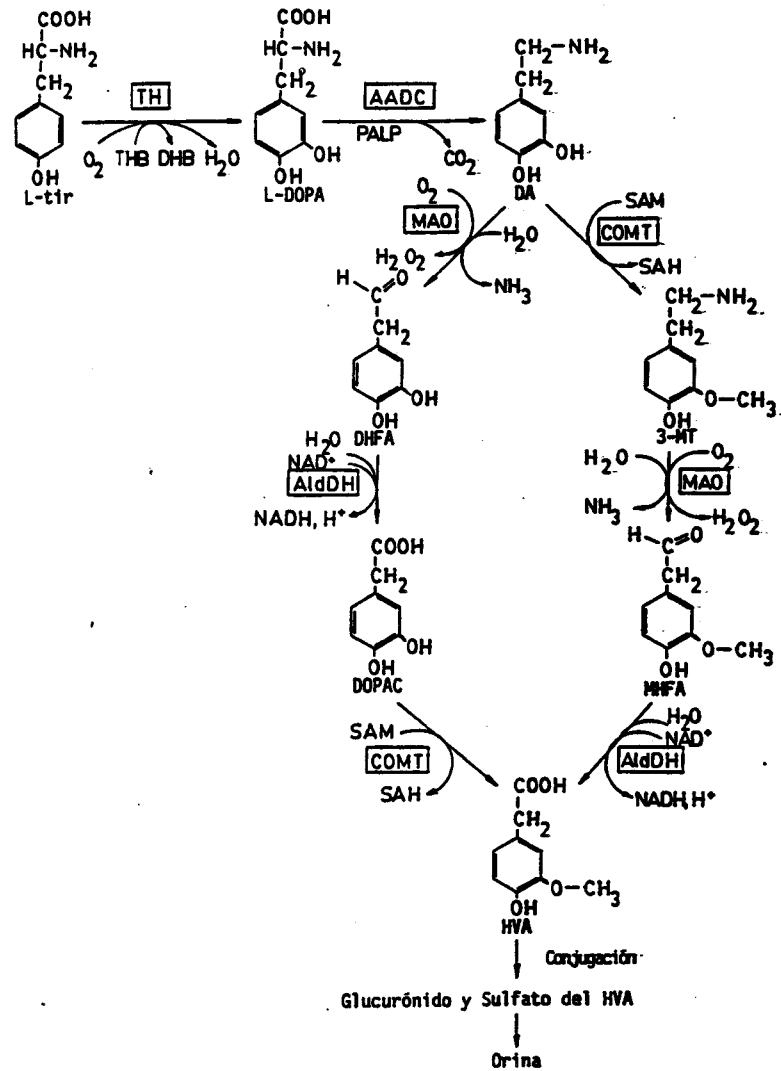


FIGURA I.2. Síntesis y degradación de DA. Abreviaturas: TH, tirosina hidroxilasa; AADC, aminoácido aromático decarboxilasa; MAO, monoamino oxidasa; COMT, catecol-O-metiltransferasa; AldDH, aldehído deshidrogenasa; Tyr, tirosina; L-DOPA, L-hidroxifenilalanina; DHFA, 3,4-dihidroxifenilacetaldehído; DOPAC, ácido dihidroxifenilacético; 3-MT, 3-metoxitiramina; MHFA, 3-metoxi-4-hidroxifenilacetaldehído; HVA, ácido homovanílico; THB, tetrahidrobiopterina; DHB, dihidrobiopterina; SAM, S-adenosilmetionina; SAH, S-adenosilhomocisteína; PALP, piridoxalfosfato.

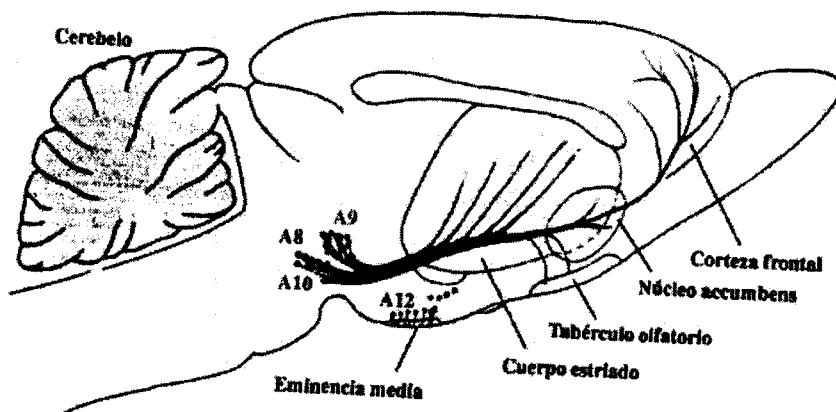


FIGURA I.3. Vías de proyección dopaminérgica desde la Sustancia Nigra en el cerebro de la rata expuestas en un corte sagital

Esta enzima cataliza la transferencia de grupos metilos a grupos catecoles a partir de S-adenosilmetionina (SAM), para lo que requiere cationes divalentes. Se han caracterizado dos formas distintas de la COMT: una soluble (S-COMT) y otra unida a membranas (MB-COMT), apuntándose la posibilidad de que la S-COMT se localice principalmente en células gliales. La acción de esta enzima sobre el DOPAC genera ácido homovanílico (HVA).

La DA, además de ser recaptada por la neurona puede ser tomada directamente por la glía, con lo que actuará sobre ella la COMT formando 3-metoxitiramina (3-MT), la cual es metabolizada por la MAO dando lugar al 3-metoxi-4-hidroxifenilacetaldehído (MHFA) que es rápidamente oxidado hasta ácido homovanílico (HVA) por la aldehído deshidrogenasa. El HVA es conjugado como sulfatos y glucuronatos lo que facilita su eliminación del SNC para ser después expulsados por la orina. La sulfatación de este compuesto está catalizada por la enzima fenol sulfotransferasa (PST; EC.2.8.2.1.) que sulfata en la posición 3 del anillo aromático.

En cerebro humano el 70% de la actividad total de la MAO es del tipo B, mientras que en rata ésta sólo es de un 5% (Riederer y col., 1978); (Oreland y col., 1983). La MAO-A es de localización intraneuronal y la MAO-B se encuentra mayoritariamente en la glía; (Yu, 1986)). Así, en el cuerpo estriado la desaminación oxidativa de la DA ocurre mayoritariamente a través de la isoforma B extraneuronalmente ((Oreland y col., 1983) (Glover y Sandler, 1986), también existe el mismo porcentaje en cobayas, mientras que en la rata tiene lugar principalmente por la isoforma A de manera intraneuronal (Azzaro y col., 1985); (Butcher y col., 1990).

I.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 llegó hasta 10 años más tarde (Nagatsu y col., 1964).

Como ya hemos dicho la tirosina hidroxilasa es una monooxigenasa que cataliza la formación de L-DOPA a partir de L-tirosina en neuronas

INTRODUCCIÓN

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 :



La enzima utiliza tirosina como sustrato, requiere oxígeno molecular para su actividad y el 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 dihidropterina reductasa (Kaufman, 1977). Además de los sustratos mencionados, la enzima necesita el ión ferroso (Fe²⁺) para su actividad (Haavik y col., 1991) el cual coordina en el residuo His³³¹ (Ramsey y col., 1995). La actividad máxima se da a pH 6.

Varios autores sugieren que la concentración de cofactor en células adrenérgicas está por debajo de la saturación para la enzima. Los valores de la constante de Michaelis (Km) 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.

Los trabajos dirigidos a estudiar la localización subcelular de la enzima sugieren que ésta 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 DA. En el estriado, la forma unida a membrana tiene valores de Km y Ki 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).

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., 1988) y en *E. coli* (Haavik y col., 1991).

1.5.1. Regulación de la Tirosina Hidroxilasa.

Los niveles de actividad y cantidad de la enzima TH se controlan por casi todos los mecanismos regulatorios fisiológicos que existen con la excepción de la activación por zimógeno. Se dividen en dos amplias categorías (Para revisión ver (Kumer y Vrana, 1996):

- a). Regulación a **corto plazo** de la actividad enzimática
 - a.1- Inhibición por retroalimentación negativa
 - a.2- Regulación alostérica.
 - a.3- Los mecanismos de fosforilación-desfosforilación.

- b). Regulación a **medio-largo plazo** de la expresión génica
 - b.1- Control de la actividad traductora.
 - b.2- mecanismos que controlan la estabilidad de la enzima.

INTRODUCCIÓN

b.3- Regulación transcripcional.

b.4- Regulación de la estabilidad del ARNm.

b.5- Distintas alternativas de procesado del ARNm, el denominado "splicing".

I.5.1.a.1- Inhibición por retroalimentación negativa.

Se han propuesto dos mecanismos posibles para la inhibición de la TH: el primero, por unión **reversible** de catecolaminas a la enzima, que actuaría como un sensor de las concentraciones locales de estas, y el segundo de manera casi **irreversible**, mediante el secuestro de la enzima en una forma más estable pero menos activa al formar un complejo con el ión férrico (Fe^{3+}) en el sitio activo de la enzima.

I.5.1.a.2- Regulación alostérica.

Los efectores alostéricos de la TH no parecen estar relacionados con la reacción de hidroxilación de la tirosina ni con los productos formados. Se ha implicado a la heparina, a los fosfolípidos y a los polianiones en la interacción con la TH de una manera **reversible** para aumentar la actividad enzimática. Parece ser que este efecto se lleva a cabo disminuyendo la K_m de la enzima para el cosustrato pterínico.

I.5.1.a.3- Mecanismos de fosforilación-desfosforilación.

- Fosforilación.

Este parece ser el principal mecanismo que controla la actividad TH a corto plazo, estando implicados siete sistemas distintos de proteínas quinasas que son capaces de fosforilar la proteína en distintos residuos específicos para cada una. Debido a que estos sistemas de mensajero/quinasa comparten algunos de sus efectores es factible que la estimulación de una vía

conduza a la activación (o inhibición) de otra paralela, dándose un fenómeno de "cross-talking".

Es generalmente aceptado que la fosforilación por la proteína quinasa dependiente de AMPc (en la Ser⁴⁰) produce una reducción en el valor de la Km de la enzima por el cosustrato de pterina y un aumento en la constante inhibitoria (Ki) para inhibidores por retroalimentación negativa como la dopamina. Pero la significación fisiológica de los otros puntos de fosforilación está aún por determinar.

- Desfosforilación.

La TH fosforilada es sustrato de la fosfoproteína fosfatasa tipo 2A, la cual es sensible al ácido okadaico. Así, la fosforilación del residuo de Ser⁸ en las terminales dopaminérgicas se intensifica por tratamiento con ácido okadaico.

I.5.1.b.1- Control de la actividad traductora.

Hay evidencias de que la expresión génica de la TH puede ser regulada en el paso de traducción de la información del ARNm a la proteína, aunque los cambios en los niveles de ARNm de la enzima no tienen que implicar necesariamente variaciones en la cantidad o en la actividad de esta y viceversa.

En la literatura hay múltiples ejemplos que dan cuenta de la disociación entre los niveles del ARNm y los de la proteína. Así, por ejemplo, Kaneda y col. usaron un ratón transgénico que contenía varias copias extras del gen de TH humano y que dio lugar a que el ARNm transgénico se expresara en la SN 50 veces más que el gen endógeno, entanto que la inmunoreactividad y la

INTRODUCCIÓN

actividad de la TH en el estriado o en la SN se incrementó sólo de 3 a 4 veces (Kaneda y col., 1991). Otro caso es el de la inyección directa en la SN de forskolina, activador de la adenilato ciclasa, que aumentó los niveles de ARNm de TH pero no indujo cambio alguno en el contenido de la enzima. El mismo efecto se observó tras la administración crónica del antagonista del receptor dopaminérgico D2 haloperidol, así como en médula adrenal de rata expuesta a estrés por frío y en cultivos de células tratadas con 8-bromo-AMPC o dexametasona.

Como posible explicación a estos hechos, en análisis posteriores de la fracción de ARNm que estaba siendo traducida por los ribosomas (la fracción de polisomas), mostraron que el ARNm inducido no estaba siendo "cargado" para su traducción en los ribosomas.

1.5.1.b.2- Estabilidad de la enzima.

La presencia de tirosina y oxígeno, o de inhibidores, como las catecolaminas, estabilizan la enzima. Esta última observación puede ser directamente atribuible al fenómeno de estabilización por catecolaminas descrito anteriormente. El papel de la estabilidad de la enzima en el esquema general de regulación de la biosíntesis de catecolaminas es desconocido.

1.5.1.b.3- Regulación de la transcripción.

Cambios en el estado fisiológico del animal, como la administración de glucocorticoides o el estrés producido por inmovilización o por frío, así como la administración de drogas activas sobre los sistemas catecolaminérgicos, se han mostrado como fenómenos capaces de modificar los niveles de ARNm de TH. Aunque se asume que estos cambios en el ARNm son mediados por modificaciones en la tasa de transcripción, es importante señalar que pocos estudios miden realmente esta función, ya que los niveles de ARNm pueden también verse alterados por cambios en la estabilidad de la molécula.

La inyección de reserpina, un agente que vacía los depósitos de catecolaminas, se ha mostrado capaz de aumentar los valores de actividad TH en las glándulas adrenales, las células simpáticas periféricas o las células noradrenérgicas del locus coeruleus, mientras que las células dopaminérgicas de la SN no se vieron afectadas. Estudios posteriores mostraron que estos efectos estaban mediados por incrementos en los niveles de ARNm de la proteína.

Estudios llevados a cabo con el deprenilo, uno de las drogas de elección para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, que inhibe la MAO y el TDA, produjo un aumento del ARNm de esta enzima. Por otra parte, el tratamiento con otro inhibidor selectivo del TDA, la nomifensina, también mostraron una elevación en los niveles del mensajero de ARN de la TH con un aumento del contenido y la actividad de la enzima en la SN. (Rodríguez-Gómez y col., 1997).

La cocaína, agente que afecta la disponibilidad y cantidad de DA mediante el bloqueo de su recaptación, aumenta los niveles de ARNm de la TH, así como la cantidad y actividad de enzima en ciertas áreas cerebrales. Esta droga induce también la expresión de genes de respuesta inmediata como el *c-fos* o el *jun-B* en la región terminal del estriado, así como las proteínas de unión a los denominados elementos de respuesta al AMPc (CREB), habiéndose demostrado que estos factores de transcripción aumentan la transcripción de la TH uniéndose, respectivamente a los sitios AP-1 y CRE de la región del promotor del gen de la TH. Otros moduladores farmacológicos de la expresión del gen incluyen al diacepan, nicotina y antagonistas dopaminérgicos como el haloperidol y el SCH23390.

Un estudio ha mostrado incluso que puede haber selectividad en la respuesta del ARNm de células con cierto grado de analogía, como son las

INTRODUCCIÓN

neuronas dopaminérgicas del área ventral tegmental frente a las de la SN induciéndose la proteína sólo en las primeras. Varios ejemplos adicionales de esta selectividad farmacológica han sido aportados apoyando la flexibilidad en la respuesta de las células catecolaminérgicas a determinados estímulos.

Finalmente, se han observado también incrementos en la actividad y en el contenido de ARNm de la TH con agentes como el factor de crecimiento nervioso (NGF) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF).

Por lo tanto podemos ver que tanto drogas externas, extrañas en principio al sistema nervioso, como sustancias naturales propias del cerebro, son capaces de alterar de diferente modo al ARNm de la TH, aunque como hemos dicho no está claro si estos cambios suponen variaciones en la tasa de transcripción, o en la estabilidad de la molécula.

I.5.1.b.3- Regulación de la estabilidad del ARNm.

Aunque se asume que los cambios en la transcripción producen cambios en la cantidad de ARNm, ésta se puede ver también modificada postranscripcionalmente por variaciones en la estabilidad de la molécula. Fossom y col. han demostrado que condiciones estimulantes de la transcripción génica también aumentan la vida media del ARNm (Fossom y col., 1992).

I.5.1.b.4- Procesamiento alternativo del ARNm o splicing.

En tejido humano se han encontrado cuatro formas diferentes de ARNm y sus correspondientes proteínas, en base a las diferentes posibilidades a la hora de transcribir la información del ADN al ARN según los distintos puntos de corte entre intrones y exones. Denominadas como hTH-1, 2, 3 y 4, la forma 1 es la más semejante a la única encontrada en rata. Los puntos de corte

(splicing) se encuentran en el dominio regulatorio amino terminal, con lo cual las proteínas difieren de modo notorio en sus posibilidades de regulación y levemente en sus propiedades catalíticas. La significación funcional de las distintas isoformas de TH como resultado del splicing alternativo está todavía por ser establecida.

I.6. TRANSPORTADOR DE DOPAMINA.

El gen del transportador de DA ha sido recientemente clonado en rata (Shimada y col., 1991), vaca (Usdin y col., 1991) y humano (Giros y col., 1992), habiéndose determinado que es una proteína con 12 dominios transmembranales. Pertenece a la familia de transportadores Na^+/Cl^- -dependientes en la que se encuentran también el de noradrenalina (67% de homología de secuencia), serotonina (49%), GABA (45%), glicina (41%) y prolina (44%) entre otros (Miller y col., 1997). Posee un peso molecular de 69.000 daltons con cuatro sitios posibles de *N*-glicosilación; si bien no se tiene aún absoluta certeza sobre el papel de estos carbohidratos, parecen estar implicados en la regulación de su actividad (Meiegerd y Schenk, 1994).

Asociado al proceso de neurotransmisión dopaminérgica, el ARNm del transportador de DA se expresa de manera intensa en las neuronas mesencefálicas de la SNc y en menor medida en el área ventral tegmental (AVT), regiones donde se encuentran densidades apreciables de unión al transportador, así como en las respectivas áreas de proyección, el estriado y el núcleo accumbens (Giros y col., 1991) (Usdin y col., 1991). En el hipotálamo se ha hallado también expresión en las neuronas dopaminérgicas de la región dorsomedial del núcleo arcuato (Meister y Elde, 1993), localizándose la

INTRODUCCIÓN

proteína tanto aquí como en el área de proyección situada en la eminencia media.

El mantenimiento del equilibrio iónico entre el espacio intra- y extracelular juega un papel determinante en el proceso de transporte. En una primera etapa el Na⁺ es cotransportado con la DA al interior de la célula; a continuación el Na⁺ y la DA se disocian y al transportador se une al K⁺ que es liberado al exterior produciéndose a la vez la reorientación de la proteína (White y Paton, 1972) (Krueger, 1990). El restablecimiento de los gradientes iónicos lo lleva a cabo la bomba de Na⁺/K⁺ (Holz y Coyle, 1974).

Dependiendo de las condiciones celulares, el transportador puede funcionar como mediador de la entrada de DA en la célula (recaptación), o bien produciendo de manera reversa la liberación de ésta. Esta salida del neurotransmisor se produce a partir de la DA que se encuentra libre en el citosol sin mediar impulso nervioso (Westerink y col., 1987).

I.7. CONTROL DE LA DOPAMINA SINÁPTICA.

La concentración de DA presente en la sinapsis depende de varios factores, como son su contenido intracelular, su liberación al espacio sináptico, su recaptación y su degradación (Figura I.4.).

I.7.1. Contenido de DA intracelular:

El nivel de DA sináptica es regulado indirectamente por su contenido vesicular en el interior de la neurona, el cual es afectado por su síntesis, almacenamiento y metabolismo (Keller, Jr. y col., 1988).

Justice fue el primero que sugirió la existencia de tres almacenes intraneuronales de DA, los cuales se encuentran en equilibrio; de estos, dos son vesiculares (Justice, Jr. y col., 1988). En uno se encuentra la DA que acaba de ser sintetizada, que es la DA que se libera por el proceso de exocitosis a consecuencia del potencial de acción; muestra por tanto ser calcio- y sodio-dependiente. Si la DA no es inmediatamente requerida se vesicula y permanece en la neurona a modo de reserva, constituyendo este el segundo almacén vesicular de DA. Si la tasa de liberación excede la capacidad de síntesis se acude a esta DA que se encuentra en reserva. El tercer almacén corresponde a la DA que se encuentra sin vesicular, libre en el citoplasma y parece ser que es la que se libera a través del sistema de transporte reverso. Este es el mecanismo que usa la amfetamina para producir la salida de la DA de la terminal, después de haber producido la liberación masiva del neurotransmisor de las vesículas (probablemente por alteración del pH vesicular) (Butcher y col., 1988)

I.7.2. Liberación de DA:

La liberación de DA es regulada por una variedad de factores como la densidad de terminales activadas, la tasa del impulso nervioso y la actividad de los autorreceptores.

La regulación de la liberación de DA es llevada a cabo principalmente por la propia DA. Se acepta que altas concentraciones de DA extracelular inhiben la liberación y bajas concentraciones la aumentan. Esto se apoya en la acción de los autorreceptores presinápticos localizados tanto en el cuerpo celular como en las terminales (Cheramy y col., 1981) (Roth y Elsworth, 1995). Los autorreceptores situados en el cuerpo, entre otras acciones, aumentan la conductancia de potasio al ser estimulados por la DA y con ello

INTRODUCCIÓN

disminuyen la frecuencia de disparo, con lo que decrece la liberación y el metabolismo de DA en la terminal, ya que se ha demostrado que la cantidad de DA liberada por ésta es función de la tasa y del patrón de disparo (Bean y Roth, 1991). Estos cambios en el metabolismo de DA llevan asociados cambios en la actividad TH (Masserano y Weiner, 1983). Los autorreceptores localizados en la región terminal juegan también un importante papel sobre los niveles de DA extracelulares, ya que su estimulación provoca la inhibición de la liberación y/o de la síntesis del neurotransmisor (Banon y Roth, 1983) (Wolf y Roth, 1990). Mediante la perfusión local de agonistas dopaminérgicos del receptor D2 se ha demostrado la implicación directa de este subtipo de receptor en el mecanismo regulatorio descrito. Se pudo observar la disminución de la concentración extracelular de DA en el estriado (Timmerman y col., 1989a) (Santiago y Westerink, 1991), en la SN (Santiago y Westerink, 1991) y en la corteza prefrontal medial (Santiago y col., 1993). La administración de antagonistas del receptor D2, como el haloperidol, produjo el efecto opuesto sobre la actividad dopaminérgica aumentando la tasa de disparo, lo que se correlacionaba con un aumento de la síntesis, la liberación y el recambio de DA (Banon y Roth, 1983) y también de la actividad TH (Masserano y Weiner, 1983).

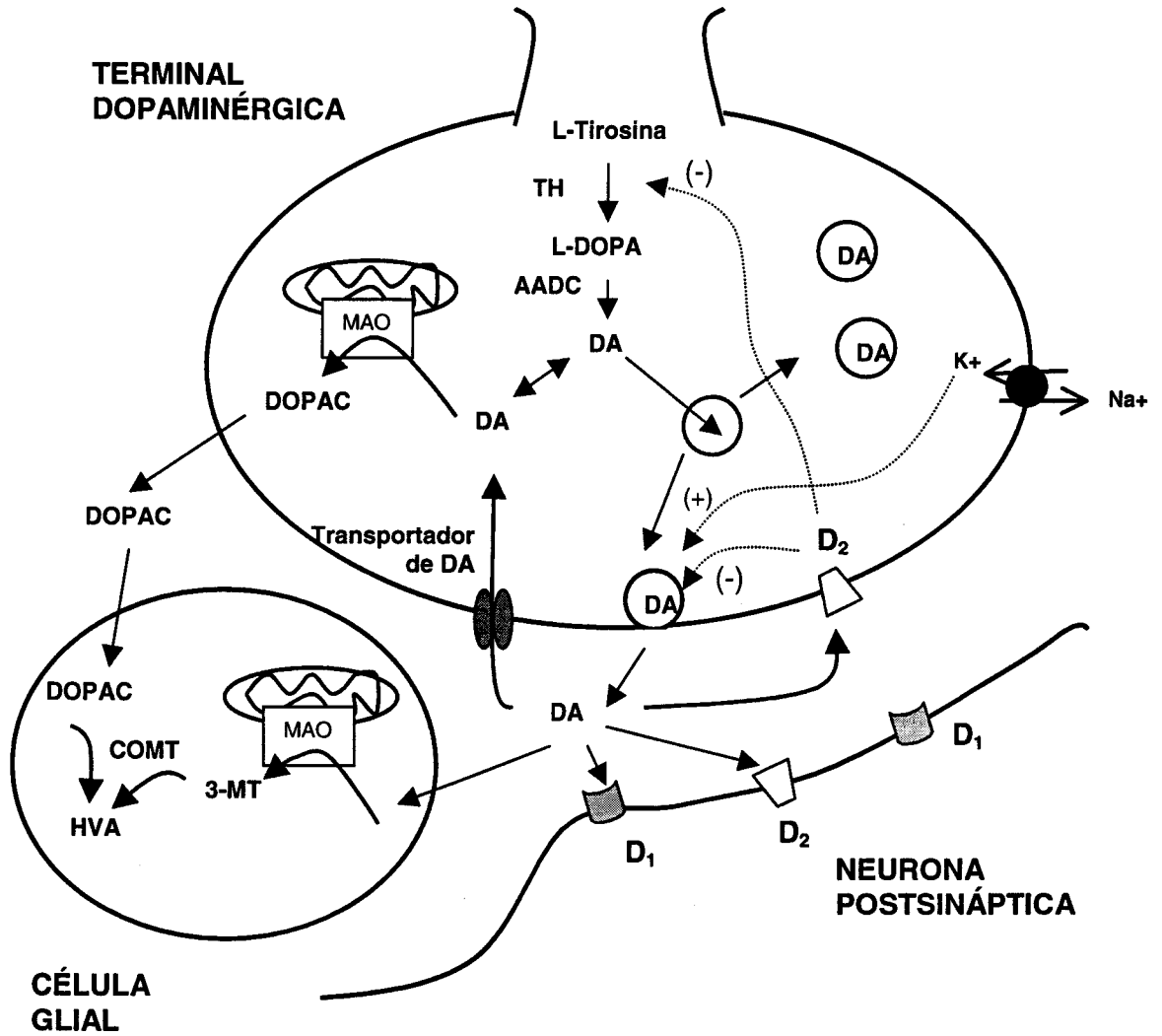


FIGURA 1.4. Representación de la sinapsis dopaminérgica y de los procesos que controlan la concentración sináptica de Dopamina y por lo tanto, la neurotransmisión dopaminérgica.

INTRODUCCIÓN

Estudios con inyecciones en el estriado y sistémicas de agonistas D2 sugieren que la activación concurrente de los receptores D2 terminales y somatodendríticos es más efectiva que la exclusiva de los receptores terminales para modular la liberación de DA por el estriado (Timmerman y col., 1989a; Timmerman y col., 1989b). Se deduce por tanto que la inhibición de la liberación de DA por los agonistas D2 es causada por dos mecanismos aditivos y similares: autorreceptores que controlan el impulso nervioso en el cuerpo celular y autorreceptores que controlan la síntesis y/o liberación de DA en la terminal.

I.7.3. Recaptación de DA:

Junto con la difusión, el principal mecanismo que interviene en la inactivación fisiológica de la DA es su eliminación del espacio sináptico a través de transportadores localizados pre- y postsinápticamente, así como en las células gliales que rodean la sinapsis. La mayoría de la DA estriatal es recaptada por la neurona, donde luego es reincorporada principalmente en las vesículas a través del TVDA (Nissbrandt y col., 1991), siendo el resto catabolizada por la MAO. La que es tomada por la glía se degrada a través de la COMT.

Así, mientras que la intensidad de la señal química es definida por la tasa de liberación del neurotransmisor, la duración de ésta viene determinada principalmente por la cinética de recaptación. La importancia del mecanismo de recaptación neuronal se pone de manifiesto en estudios que demuestran que los efectos fisiológicos de la DA son intensificados por los agentes que bloquean su transportador (Williams y Lacey, 1989) (Lacey y col., 1990), (Mercuri y col., 1991). Un ejemplo de la importancia crítica que juega la recaptación de DA en la señalización y en el tono de la actividad neuronal ejercida por esta ha sido mostrado recientemente por Giros y col. con el hallazgo de un ratón mutante carente del transportador de DA, en el que la

falta del mismo incrementó de modo considerable el tiempo de permanencia del neurotransmisor en la sinapsis (Giros y col., 1996).

La recaptación de DA tiene lugar tanto en el área terminal como en la región somatodendrítica, habida cuenta de la presencia del transportador en ambas zonas, aunque no parece ocurrir con la misma velocidad, ya que en preparaciones somatodendríticas la recaptación de [³H]-DA es más lenta que en la terminal, para las densidades de transportador encontradas en ambas regiones (Chen y col., 1996). Se puede inferir así que la dinámica de liberación-recaptación es más lenta en el cuerpo que en la terminal. Parece también que la regulación del proceso de recaptación exhibe diferencias considerables cuando se examina en regiones discretas del cerebro. Así, la recaptación de DA se ha mostrado regionalmente distinta en cuanto a la tasa, afinidad y sensibilidad a la inhibición competitiva (Hitri y col., 1994); (Jones y col., 1995). En concreto, se ha mostrado cómo en el sistema de los ganglios basales la liberación y recaptación de DA provocada eléctricamente exhibe heterogeneidad en la SN, el estriado y el AVT debido fundamentalmente al mayor o menor grado de glicosilación del transportador (Cragg y col., 1997);(Lewy y col., 1992).

Los patrones heterogéneos de recaptación de DA en la SN y en el AVT resultaron acordes con el patrón de degeneración neuronal en la enfermedad de Parkinson, si como postulan algunos autores esta enfermedad es producida por alguna toxina medioambiental (Tanner, 1989; Mizuno y col., 1999), ya que las células de esta última región resultan ser menos vulnerables por tener una menor capacidad de recaptación de la supuesta neurotoxina que las de la SNc.

Por todo esto, el reciente hallazgo de un ratón alterado genéticamente que pierde la capacidad de expresar el transportador de DA (Giros y col.,

INTRODUCCIÓN

1996) proporciona una herramienta única para estudiar los mecanismos que regulan la transmisión dopaminérgica.

I.7.4. Actividad MAO:

El metabolismo de DA es otro factor que influye en el contenido de la DA extracelular. El papel de la MAO es esencial; su inhibición resulta en un aumento de la cantidad de DA y por tanto supone un aumento de la disponibilidad del neurotransmisor.

I.8. ASPECTOS ANATOMICO-FUNCIONALES DE LOS GANGLIOS BASALES.

En sentido estricto, el término **ganglios basales** agrupa a los núcleos telencefálicos subcorticales; estos núcleos son el **cuerpo estriado** y el **núcleo amigdalóide**. Sin embargo, la **sustancia negra**, los **núcleos subtalámicos** e importantes partes del tálamo, como la **formación reticular**, operan en estrecha asociación con aquellos y, en consecuencia, se consideran parte del sistema de los ganglios basales para el control motor (Para revisión ver (Gerfen, 1992)). Estos cinco núcleos subcorticales participan en el control del movimiento, pero al contrario que la mayoría de los componentes del sistema motor no reciben ni envían ninguna conexión directa con la médula espinal. Su entrada principal proviene de la corteza cerebral y su salida es dirigida a través del tálamo de vuelta a la corteza, concretamente a las regiones prefrontal, premotora y motora. Por tanto, junto con el cerebelo, los ganglios basales constituyen el más importante **círculo subcortical del sistema motor**. La diferencia entre ambos estriba en que si bien el cerebelo regula directamente la ejecución del movimiento, los ganglios basales están implicados en aspectos cognitivos y de orden superior del control motor. Además debido a las extensas conexiones con la corteza

asociativa y estructuras límbicas, los ganglios basales participan en aspectos no relacionados con el movimiento como la **función afectiva y cognitiva**.

El cuerpo estriado se divide a su vez en **paleoestriado** o **globo pálido** y **neoestriado**. Este último está dividido en dos núcleos, el **caudado** y el **putamen**. Ambos provienen de la misma estructura telencefálica por lo que están constituidos del mismo tipo de células, fusionándose además en la parte anterior; al conjunto se le conoce como cuerpo estriado, nombre que se le da también en la rata, especie anatómicamente menos diferenciada, donde ambas estructuras constituyen un núcleo único. El globo pálido (GP) se divide en dos segmentos, el externo y el interno; en la rata este último se denomina núcleo entopeduncular.

La sustancia negra (SN) también se divide en tres zonas: a) la **parte reticulada** (SNr) que citológicamente se parece al globo pálido y a donde van la mayor parte de las aferencias que llegan a esta estructura; b) una más dorsal, pigmentada, debido a la presencia de cuerpos neuronales ricos en neuromelanina y que da nombre a esta región, que es la **parte compacta** (SNc) y c) la **parte lateral**.

La figura I.5. muestra las vías de conexión de los ganglios basales, que como se observa es un circuito **córtico-estrio-negro-tálamo-cortical**. De todas las vías de los ganglios basales, la **vía nigro-estriada** es la que más nos interesa pues la que se ve afectada en la Enfermedad de Parkinson.

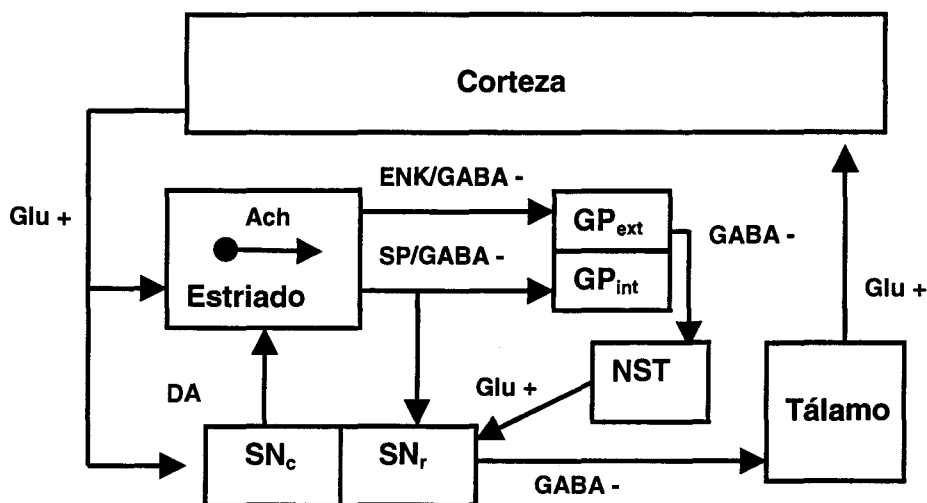


Figura I.5. Esquema que representa las principales conexiones de los ganglios basales. DA: dopamina. GP_{ext} y GP_{int}: segmento interno y externo, respectivamente, del globo pálido. Glu: glutamato. SN_c y SN_r: substantia nigra reticulada y compacta, respectivamente. NST: núcleo subtalámico

La proyección más importante que reciben los ganglios basales es la aferencia excitatoria que usa glutamato (Glu) como neurotransmisor, que llega de la corteza cerebral al estriado. En condiciones de reposo las neuronas estriatales están eléctricamente en estado quiescente y su actividad es generada por esta aferencia excitatoria. La gran mayoría de las neuronas del estriado (90-95%) son las denominadas neuronas espinosas de proyección de tamaño medio. En estas neuronas se distinguen dos subpoblaciones con aproximadamente igual número de células que alcanzan a la SN a través de vías diferentes. Se distingue por un lado la que proyecta directamente desde la matriz del estriado a la SN_r (en menor medida a la parte compacta) y al segmento interno del GP (**vía estriatonigral**), y por otro, la que alcanza a la SN_r desde los estriosomas mediante conexiones

polisinápticas (**vía estriatopalidal**), proyectando primero al segmento externo del GP, el cual proyecta por una parte a la SN y por otra al núcleo subtalámico, el cual a su vez proyecta también a la SN (Figura 1.5.) (Parent, 1990).

Todas estas conexiones que parten del estriado son inhibitorias, utilizando GABA como neurotransmisor. Los núcleos subtalámicos, por su parte, envían aferencias excitatorias a la SNr. Estas dos vías se diferencian por presentar distinta expresión peptidérgica y de receptores dopaminérgicos. Las vías estriatopalidal y palidonigral, contienen encefalina expresándose el receptor D₂ (efecto inhibitorio de la adenilato ciclasa), mientras que la vía estriatonigral expresa el receptor D₁ (activador), sustancia P y dinorfina (Vicent y col., 1982; Gerfen, 1992); (Reinier y Anderson, 1990; Reinier, 1986).

El circuito que comienza en la corteza innervando al estriado y que llega a la SN, bien a través de la vía estriatonigral o de la estriatopalidal, se cierra mediante las neuronas GABAérgicas (y por lo tanto inhibitorias) de la SNr y el segmento interno del GP que constituyen la mayor eferencia de los ganglios basales, innervando los núcleos talámicos. Estas neuronas son tónicamente activas y producirán, por tanto, la inhibición de las células talámicas que devuelven la proyección a las zonas de la corteza implicadas en el control motor. El movimiento, a nivel de los ganglios basales, se origina cuando las neuronas talámicas son liberadas de esta inhibición tónica con la consiguiente actividad motora de la corteza

Por lo tanto, la vía estriatonigral directa supone una inhibición de las neuronas de la SNc mediante la acción del GABA, mientras que la vía estriatopalidal indirecta produce la excitación de las neuronas nigrotalámicas, mediante la acción facilitadora del glutamato. El resultado de estas dos vías

INTRODUCCIÓN

sería opuesto si no mediara la actividad de la proyección dopaminérgica nigroestriatal. Ambas vías están reguladas por los axones dopaminérgicos que proyectan desde la SNc al estriado. La DA ejerce un efecto excitador sobre la vía directa debido a la activación de los receptores D₁ (fig. 1.5.) de las neuronas que expresan sustancia P (vía estriatonigral), mientras que sobre la vía indirecta el efecto es inhibitorio mediado por los receptores D₂ de las neuronas que expresan encefalina (vía estriatopalidal), cuyo resultado último es la desinhibición de las neuronas talamocorticales (fig. 1.5.). Así, la acción de la proyección dopaminérgica sobre el estriado a través de las dos vías descritas es una acción facilitadora del movimiento.

La pérdida de DA estriatal, posterior a la muerte de las células nigrales que ocurre en la enfermedad de Parkinson (una de las patologías mejor caracterizadas de los ganglios basales), da lugar al desequilibrio en la actividad de las dos vías de proyección estriatales, activándose la estriatopalidal con aumento de la expresión de encefalina y reprimiéndose la estriatonigral y con ello la expresión de sustancia P, lo que conduce a la activación de la vía nigrotalámica. Esta es la causa de la mayoría de los síntomas de esta enfermedad: temblor rítmico en reposo, rigidez muscular, lentitud en la ejecución del movimiento (bradiquinesia) y dificultad para iniciar el movimiento (aquinesia). La deplección de DA estriatal también produce la sobreactivación de interneuronas colinérgicas del estriado con repercusiones en el control motor. Algunos de los déficits cognitivos se consideran originados por la falta de DA cortical.

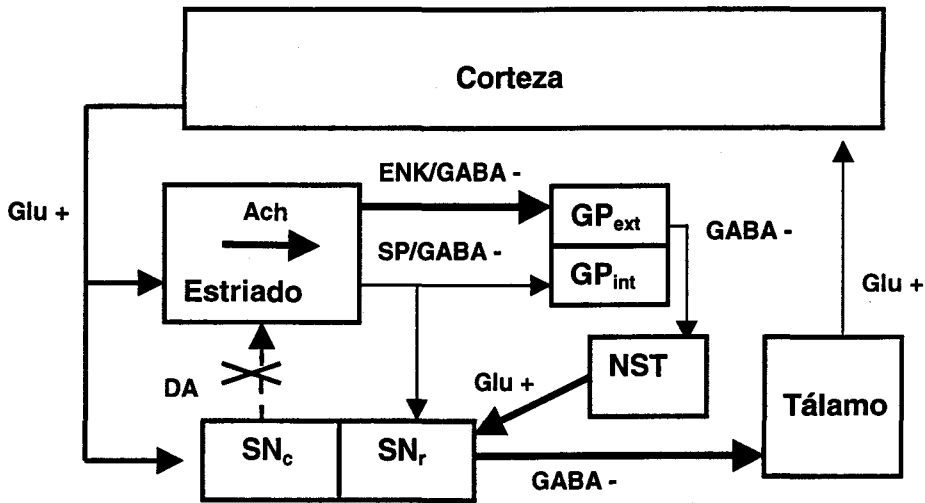


Figura I.6. Alteración del circuito de los ganglios basales en la Enfermedad de Parkinson. La anchura de las flechas indica la activación o inhibición en la neurotransmisión

La DA liberada dendríticamente en la SN está implicada en el procesamiento de la información proveniente del estriado en dirección al tálamo. Ello es posible debido a la particular disposición dendrítica de dicho núcleo (Fallon y Loughlin, 1995), las dendritas de las neuronas nigrotalámicas permanecen confinadas en la SNr. Las neuronas de la zona ventral de la SNc proyectan ventrolateralmente 1 ó 2 dendritas hacia la parte reticulada. Así, la DA liberada presinápticamente puede dar lugar, por una parte, a la autoinhibición de la actividad de la vía nigroestriada interaccionando con los receptores D2 de la propia neurona o de una vecina, y por otra, a la modulación a través del receptor D1 de la liberación de GABA y péptidos de la proyección estriatonigral, influyendo así indirectamente en la actividad de las neuronas nigro-talámicas. En la parte más dorsal se dispone un segundo

INTRODUCCIÓN

tipo de neurona dopaminérgica, fusiforme y con dendritas de orientación medio-lateral también provista del autorreceptor D2 (Cheramy y col., 1981).

I.9. NEURODEGENERACION DE EL SISTEMA NIGRO-ESTRIATAL.

De entre todos los procesos y fenómenos que engloba el envejecimiento humano, los de **neurodegeneración**, es decir los procesos que compondrían el llamado **envejecimiento cerebral** son los que parecen estar relacionados directamente con la aparición de RL y EO. Este cuadro de alteraciones por daño oxidativo parece tener una participación destacada en enfermedades ligadas al envejecimiento cerebral como las enfermedades de Parkinson, de Alzheimer, de Huntington y la esclerosis lateral amiotrófica, llegando algunos autores a hablar del envejecimiento como un factor de riesgo conducente a estas patologías (Lebel y Bondy, 1992; Bowling y Beal, 1995). Esto es debido a que varios factores hacen del cerebro el órgano más vulnerable a los daños originados por EO.

El cerebro llega a usar un 20% del oxígeno total inspirado, cantidad muy elevada si consideramos que constituye solo un 2% del peso total del individuo. A éste alto consumo de O₂ contribuye entre otros la **elevada tasa de metabolismo catecolaminérgico**.

Esto hace que la generación de radicales libres en el cerebro sea comparativamente mayor, especialmente porque es un tejido relativamente **deficiente en mecanismos protectores** (Bondy, 1997). Por ejemplo, posee menos cantidad de GSH, GPx y tocoferol comparado con el hígado.

Por otra parte el cerebro **es rico en los llamados PUFAS** (ácidos grasos poliinsaturados) que debido a las insaturaciones son especialmente

esencial en la catálisis del estrés oxidativo. Además el LCF contiene complejos de bajo peso molecular que contienen hierro y cobre, capaces de catalizar la generación de radicales libres.

El tejido neuronal es además **rico en hierro libre** (Yehuda y Youdim, 1988). lo cual unido a las altas concentraciones de ácido ascórbico, supone una alta probabilidad de que se genere estrés oxidativo ya que el ácido ascórbico en presencia de hierro actúa como prooxidante.

Finalmente, los **aminoácidos excitatorios** que actúan como neurotransmisores en el cerebro (como por ejemplo el glutamato), una vez liberados generan una reacción en cadena que activa vías intracelulares de generación de radicales libres.

El sistema dopaminérgico presenta una mayor degeneración con la edad que otros sistemas neuronales. Alrededor del 4% del conjunto de neuronas productoras de dopamina desaparece durante cada decenio de la vida adulta como consecuencia del envejecimiento

La SN es una estructura particularmente vulnerable a los procesos oxidativos, ya que en ella se dan una serie de circunstancias que los favorecen: elevadas concentraciones de hierro (Yehuda y Youdim, 1988) alta tasa de autooxidación, baja actividad de las enzimas con capacidad antioxidante y cantidad de GSH relativamente baja (Gerlach y col., 1994). La SN humana, que constituye el grupo neuronal mas vulnerable en la enfermedad de Parkinson, contiene solo bajo niveles de GPx (Damier y col., 1993). Además una moderada inmunoreactividad a GPX ha sido detectada en la SN de ratón (Trepanier y col., 1996).

La formación de radicales libres en las células dopaminérgicas no sólo tiene lugar mediante el metabolismo del neurotransmisor, produciéndose H_2O_2

INTRODUCCIÓN

1993). Además una moderada inmunoreactividad a GPX ha sido detectada en la SN de ratón (Trepanier y col., 1996).

La formación de radicales libres en las células dopaminérgicas no sólo tiene lugar mediante el metabolismo del neurotransmisor, produciéndose H_2O_2 a través de la actividad degradativa de la MAO. Por otro lado, la DA puede sufrir un proceso de autooxidación no enzimático catalizado por hierro por el que tiene lugar también la formación de H_2O_2 (Gerlach y col., 1994). La DA al autooxidarse genera quinonas, las cuales son intermediarias en la formación de conjugados de catecoles con proteínas (Ito y col., 1988) Las quinonas son compuestos deficientes en electrones, por lo que pueden sufrir el ataque nucleofílico del grupo sulfidrilo del aminoácido cisteína, que se encuentra presente formando parte del GSH o como integrante de las proteínas ((Tse y col., 1976). Los iones de hierro y cobre podrían también promover la formación de conjugados entre GSH y DA y/o L-DOPA, especialmente si H_2O_2 está presente (Spencer y col., 1998).

Los productos oxidativos de la DA, quinonas y radicales libres, dan lugar mediante su polimerización a la formación de neuromelanina, acumulándose en una especie de depósito de productos de deshecho (Knoll, 1993). En la neurona, el acúmulo de neuromelanina va aumentando con el tiempo, observándose un aumento lineal de la pigmentación de la SN en el hombre desde los 18 meses a los 60 años (Mann y col., 1977).

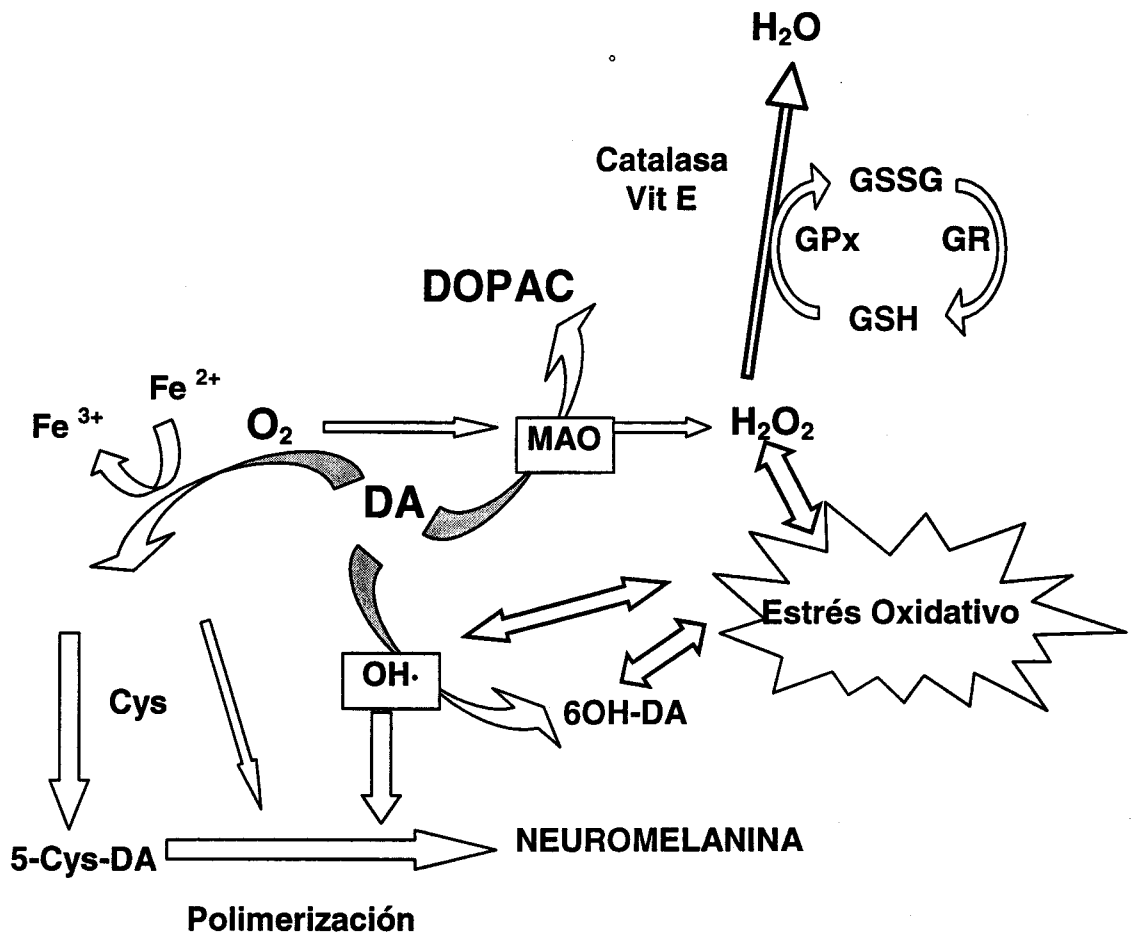


Figura I.7. Mecanismos de generación de radicales libres y subproductos de oxidación de la Dopamina. Mediante la oxidación enzimática o no enzimática de la DA^{\ominus} , se producen quinonas y 6-OH-DA que contribuyen a la polimerización de la melanina y a la generación de una cascada de estrés oxidativo.

I.10. ENFERMEDAD DE PARKINSON

La enfermedad de Parkinson (EP) es un desorden neurodegenerativo progresivo de los ganglios basales, que afecta a uno de cada 500 individuos (Jenner y col., 1992) o a 10 de cada 100.000 individuos con menos de 45 años y 140 de cada 100.000 hasta 75 años (Schoenberg, 1987).

Los exámenes "post-mortem" de los cerebros de los enfermos de Parkinson revelan un gran número de anomalías neuroquímicas e histológicas. La más importante es la degeneración de células pigmentadas de la SN compacta, junto con la aparición de los llamados Cuerpos de Lewy y la disminución de la liberación de DA en el estriado desde las terminales nerviosas del tracto nigroestriatal.

La DA estriatal actúa normalmente inhibiendo las interneuronas colinérgicas o contrarrestando de alguna otra manera su actividad. En ausencia de la secreción de DA, las vías colinérgicas se tornan excesivamente activas provocando una señalización anormal que conduce a una alteración del movimiento, apareciendo así los síntomas típicos de la enfermedad: rigidez muscular, bradiquinesia, pérdida de peso, depresión y disminución de la capacidad intelectual. Desde la aparición de los primeros síntomas, éstos se van agravando, llegando a la discapacitación (aquinesia completa) en el transcurso de 5 a 15 años. En etapas tardías aparecen problemas psicológicos que pueden llegar a convertirse en demencia.

Los síntomas del Parkinson sólo aparecen cuando la degeneración llega al 70 % (Riederer y Wuketich, 1976). Una aquinesia severa está asociada a una pérdida del 95 % de DA. No se sabe todavía cual es la causa que dispara esta mortalidad neuronal.

Los síntomas del Parkinson sólo aparecen cuando la degeneración llega al 70 % (Riederer y Wuketich, 1976). Una aquinesia severa está asociada a una pérdida del 95 % de DA. No se sabe todavía cual es la causa que dispara esta mortalidad neuronal.

Según una investigación epidemiológica, el 60% de la etiología de esta enfermedad corresponde a **factores genéticos** y el 40% a **factores medioambientales** (Kondo y col., 1973). La influencia de las toxinas ha sido sugerida tras una serie de estudios epidemiológicos que muestran un aumento en el riesgo a desarrollar la EP asociado a exposición medioambiental a factores como la industrialización, el uso de productos químicos en agricultura o los entornos rurales (Golbe y Langston, 1993). Aunque no se ha identificado un defecto genético singular, se ha de considerar un componente genético en la EP en base a la presencia de un factor de transmisión dominante en 5-10% de los casos de EP, y la posibilidad de que factores genéticos pueden generar una susceptibilidad elevada ante ciertas toxinas (Gasser y col., 1994)

1.10.1. La Enfermedad de Parkinson y el estrés oxidativo.

La formación de **radicales libres** ((Cohen, 1984); (Jenner y Olanow, 1996), una crisis energética **mitocondrial** (Mizuno y col., 1993), y **neurotoxinas exógenas y/o endógenas** (Naoi y col., 1993); (Ohta y col., 1987) entre otros factores, están implicados en los procesos de muerte celular producidos en esta enfermedad, aunque estos dos últimos podemos decir que están ligados íntimamente al primero aunque no está claro si de manera primaria (causa) o secundaria (consecuencia).

INTRODUCCIÓN

Estudios *postmortem* de cerebros de parkinsonianos mostraron un aumento de la peroxidación lipídica (Dexter y col., 1989) (Dexter y col., 1994b). Además parece haber un aumento del daño del DNA como parece indicar el aumento de 8-hidroxiguanidina, un producto del ataque de los RL sobre los restos de guanidina del DNA (Sanchez-Ramos y col., 1994) (Alam y col., 1999).

Esta evidencia del daño oxidativo en la EP sugiere una producción excesiva de los RL, una disminución de las defensas antioxidantes y un defecto de los sistemas de reparación de daños causados por RL. Lo cual se ve apoyado por la aparición de los subproductos de oxidación de DA, los compuestos cisteínicos de L-DOPA, DA, DOPAC en SN, sugiriendo así una aceleración de los procesos de oxidación de L-DOPA/DA. Es también bien conocida la disminución de los niveles de GSH, lo cual podría ser consecuencia de la formación de estos productos o quizás la causa de esta aceleración en los procesos oxidativos.

El hecho de que se hayan encontrado niveles elevados de hierro en la SN, junto con una disminución o niveles inalterados de ferritina, es indicativo de un mecanismo por el cual la producción de radicales libres podría estar aumentada (Dexter y col., 1992) Como ya hemos indicado los metales catalizan la formación del radical hidroxilo desde H_2O_2 Este radical podría ser la causa de la oxidación de los lípidos y de la alteración del DNA.

Así mismo, la sustancia negra de los enfermos de Parkinson contiene células de **microglía** en un estado **reactivo**. Por lo general, el cerebro controla y regula la microglía y evita que pase a un estado reactivo, porque sus células, cuando se encuentran en estimulación máxima, producen radicales libres y se comportan de modo que pueden dañar las neuronas. La

Muchos componentes del sistema antioxidante parecen ser normales en la SN de los parkinsonianos (Catalasa, GPx, Acido ascórbico y alfa-tocoferol), aunque los niveles de la Mg-SOD y Cu/Zn-SOD están por encima de lo normal (Martilla y col., 1988) (Saggu y col., 1989), lo cual podría ser un indicativo de adaptación del medio frente a una carga excesiva de radicales libres.

I.10.2. Sistema Glutati6n y La Enfermedad de Parkinson.

Los niveles de GSH en la SN de los enfermos de Parkinson est1n por debajo de lo normal, lo que podr1a ser importante para la producci6n del da1o oxidativo en la EP (Sian y col., 1994). Por ejemplo una Cu/zn SOD elevada junto con una actividad defectuosa de la GPx (debida a la disminuci6n en los niveles de GSH y no a la enzima en s1) podr1a producir un desequilibrio en las enzimas antioxidantes, lo cual podr1a ser cr1tico para la funci6n celular.

Esta disminuci6n en los niveles de GSH es especialmente importante en la EP ya que este cambio se restringe a la SN y no ocurre en las otras estructuras que componen los ganglios b1sales, y adem1s no parece ser debida al tratamiento farmacol6gico de la enfermedad (Dexter y col., 1994b). Los ratones tratados con MPTP, los cuales sufren EO, mostraron un aumento general en la actividad de GPx, siendo especialmente elevada en estriado y en el cerebro ventral medio (Cassarino y col., 1997). Adem1s, el disulfiram, una droga que en humano puede conducir a s1ntomas Parkinsonianos, es capaz de disminuir la actividad de GR en ratas (Loplane y col., 1992) (Nagendra y col., 1994). Todo ello corrobora la importancia del sistema GSH en el sistema dopamin6rgico y el control de movimientos.

Otro de los cambios que aparecen en la EP es la inhibici6n de la actividad del Complejo I de las mitocondrias en la SN (Schapira y col., 1990). Aunque la causa de esto es desconocida, parece que no existe relaci6n

INTRODUCCIÓN

una droga que en humano puede conducir a síntomas Parkinsonianos, es capaz de disminuir la actividad de GR en ratas (Loplane y col., 1992) (Nagendra y col., 1994). Todo ello corrobora la importancia del sistema GSH en el sistema dopaminérgico y el control de movimientos.

Otro de los cambios que aparecen en la EP es la inhibición de la actividad del Complejo I de las mitocondrias en la SN (Schapira y col., 1990). Aunque la causa de esto es desconocida, parece que no existe relación directa entre la enfermedad y las toxinas que afectan al complejo, como el MPTP, del que hablaremos mas tarde (Ikeda y col., 1992). Tampoco parece haber evidencia alguna de alteración en las subunidades del complejo I o alteración en el cifrado del DNA mitocondrial de los componentes del complejo. Pero una explicación alternativa a este cambio podría ser que el EO inhibe el complejo I, aunque *in vitro* los radicales libres son capaces de inhibir no solo al complejo I, si no tambien al III/IV. En este sentido trabajos recientes de Li y col. que probaron que la 5-S-cysteinil-DA (subproducto de oxidacion de DA presente en los enfermos de Parkinsones) es capaz de sufrir reacciones quimicas que incluye conjugacion con GSH, formando finalmente acido 7-(2-aminoetil)-3,4-dihidro-5-hidroxi-2H-1,4-benzotiazine-3-carboxilico, el cual provoca la inhibicion del complejo I, esto supondria la perdida irreversible del GSH y la disminucion de la actividad del complejo I mitocondrial, ambos fenomenos caracteristicos de la EP (Li y col., 1998).

Como hemos dicho la pérdida de GSH es específica de la SNc y no se ha demostrado que ocurra en otras áreas cerebrales o en otras enfermedades cerebrales que conlleven una neurodegeneración en los ganglios basales. Además, esta pérdida se localiza en las neuronas y en el neuropilo a juzgar por las técnicas histoquímicas (Pearce 1996). Como el GSH se acumula principalmente en glía no se puede decir que la disminución en el tripéptido sea

degradación y la translocación celular del GSH de la célula. Dichos cambios podrían ser indicativos de una necesidad de eliminar niveles excesivos y potencialmente tóxicos de GSSG de las células como resultado de un estrés oxidativo. Apoyando esta teoría los experimentos de Cohen y colaboradores (Spina y Cohen, 1989) sugieren que el aumento de la oxidación de DA eleva los niveles de GSSG. Este aumento en la actividad de la γ -GTP se puede deber también a la liberación del GSH desde células dañadas. La degradación de GSH por sí sola es capaz de formar derivados cisteínicos tóxicos, especialmente en presencia de metales de transición (recordemos que el hierro está elevado en la EP). Por lo tanto los cambios en la función mitocondrial y el GSH en la EP podrían estar conectados.

Una característica muy importante es el hecho de que los niveles de GSSG, que de por sí es tóxico, permanezcan aparentemente inalterables. Un EO persistente se traduce en una disminución irreversible del GSH, sin su correspondiente aumento del GSSG, como se ha observado en el hígado (DeLeve y Kaplowitz 1991) y también en los casos de desarreglo mitocondrial. Por otra parte estudios en hepatocitos con drogas como el MPP+ han puesto de manifiesto una liberación de GSH sin cambios en los niveles de GSSG (Sian et al 1996).

Sin embargo ninguno de estos datos indican si el EO es un suceso primario o secundario en la neuronas nigrales o si es un fenómeno temprano o tardío. Considerando que los síntomas clínicos típicos de la EP no aparecen hasta que se han perdido el 60-70% de las neuronas dopaminérgicas todas estas alteraciones se podrían considerar tardías. Algunos investigadores afirman que la Enfermedad Incidental de los Cuerpos de Lewy representa un Parkinson Presintomático. En estos pacientes, los niveles de hierro están inalterados, sugiriendo que el aumento de este metal que aparece en la EP es un suceso tardío o secundario a la destrucción celular (Sian y col., 1994). Hay

INTRODUCCIÓN

Sin embargo ninguno de estos datos indican si el EO es un suceso primario o secundario en la neuronas nigrales o si es un fenómeno temprano o tardío. Considerando que los síntomas clínicos típicos de la EP no aparecen hasta que se han perdido el 60-70% de las neuronas dopaminérgicas todas estas alteraciones se podrían considerar tardías. Algunos investigadores afirman que la Enfermedad Incidental de los Cuerpos de Lewy representa un Parkinson Presintomático. En estos pacientes, los niveles de hierro están inalterados, sugiriendo que el aumento de este metal que aparece en la EP es un suceso tardío o secundario a la destrucción celular (Sian y col., 1994). Hay además una disminución de la actividad del complejo I aunque no es significativa. Sin embargo, los niveles de GSH sí estaban disminuidos casi en el mismo porcentaje que en los enfermos de Parkinson.

Por lo tanto el GSH está alterado prematuramente en la lesión nigral y en cierta medida puede reflejar cambios tempranos en la función mitocondrial. Esto sugiere que este cambio bioquímico puede jugar un papel esencial en la patogénesis de la EP. Puede ocurrir que esta disminución desencadene una cascada de eventos que conduzcan a un EO y a la posterior neurodegeneración en la vía nigrostriatal, o a que la disminución del GSH haga más susceptible a la vía nigrostriatal frente a daños externos.

I.10.3. Modelo de la Enfermedad de Parkinson: El Ión MPP⁺

En 1977, un estudiante de 23 años de edad desarrolló repentinamente los síntomas de la EP. El paciente admitió que había sintetizado y utilizado alguna droga. Al visitar su laboratorio se descubrió que había algunas piridinas, entre las que se encontraba la MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina) formada como un subproducto en la síntesis del éster de

dihidropiridinio (MPDP⁺) el cual, a su vez, es convertido a la especie piridinio (MPP⁺) (Heikkila y col., 1985). El MPP⁺ (ión 1-metil-4-fenilpiridinio) es un sustrato para el transportador de DA, accediendo así al interior de las células dopaminérgicas (Javitch y col., 1985), donde se vesícula. Este ion produce la inhibición del complejo I (la NADH deshidrogenasa) de la cadena respiratoria (Nicklas y col., 1985); (Ramsey y col., 1995). El bloqueo de la respiración conduce a una rápida disminución de la concentración intracelular de ATP (Di Monte y col., 1986) que conlleva una pérdida del potencial de membrana y, por lo tanto, conduce a la muerte neuronal mediante mecanismos que alteran la homeostasis del Ca²⁺ (Kass y col., 1988). Así mismo, la inhibición del complejo I provoca la formación del ión superóxido (Hasegawa y col., 1990) el cual promueve la peroxidación de lípidos, y finalmente, la lisis celular (figura 1.8.).

INTRODUCCIÓN

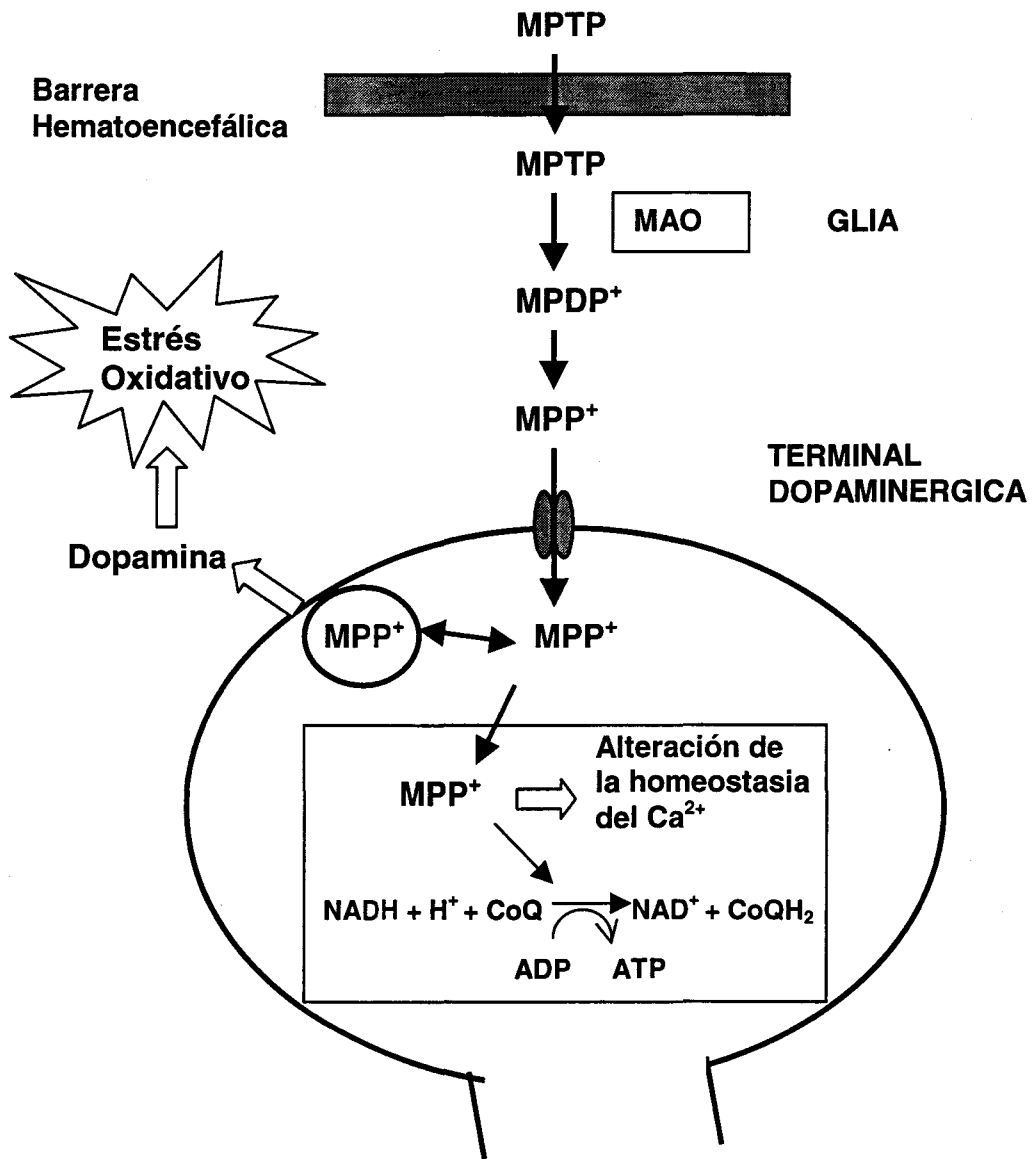


Figura I.8. Mecanismo bioquímico de la acción neurotóxica del MPTP sobre las neuronas dopaminérgicas. CoQ: ubiquinona. CoQH₂: ubiquinol. MAO: monoamino oxidasa. MPDP+: ion 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridinio. MPP+: ión 1-metil-4-fenilpiridinio. MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridinina.

La acción inhibitoria del MPP⁺ en la mitocondria no es específica de ningún órgano sino que afecta a todas las células de los mamíferos. Se utiliza como una toxina selectiva dopaminérgica porque sólo las terminales dopaminérgicas pueden transportarlo a su interior. Hay que resaltar también que el MPP⁺ es un inhibidor **reversible** débil de la NADH deshidrogenasa, requiriéndose concentraciones en el rango de milimolar para inhibirla.

No sólo la inhibición de la respiración mitocondrial es la responsable de la toxicidad desencadenada por este compuesto. Se han implicado otros factores, como la formación de radicales libres que induce el ión. Se ha demostrado que el MPP⁺ produce radical hidroxilo *in vivo* (Obata y Chiueh, 1992). Adams et al. (1993) mostraron que como productos de la interacción del MPP⁺ con el complejo I se forman peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo. El MPP⁺ además produce una liberación de hierro (Gerlach y Riederer, 1996), metal que origina la formación de radical hidroxilo a partir de peróxido de hidrógeno. Entre los mecanismos que contribuyen a la muerte neuronal producida por el MPP⁺ se incluye a la excitotoxicidad mediada por aminoácidos excitatorios (Turski y col., 1991).

El objetivo de nuestro trabajo es el estudio de los efectos del estrés oxidativo sobre el funcionamiento del Sistema dopaminérgico Nigro-estriado. Con este fin se utilizan distintos tratamientos que conllevan disminución de la capacidad de protección frente a las oxidaciones:

A.- Alimentación con una dieta deficiente en Se durante 15 y 30 días. El Se, como hemos dicho anteriormente, forma parte de la enzima Glutación Peroxidasa,

B.- Inhibición de la enzima Glutación Reductasa mediante la administración de BCNU.

C.- Alimentación durante 15 y 30 días con una dieta deficiente en Vitamina E (antioxidante liposoluble).

D.- Alimentación durante 30 días con una dieta deficiente en Vitamina C (antioxidante hidrosoluble).

Tras esto mediremos los niveles de DA y cada uno de sus metabolitos para ver en que medida afecta la falta de dichos antioxidantes al metabolismo dopaminérgico.

Se medirán además la cantidad y actividad de la enzima TH, enzima limitante de la síntesis de DA en ambas áreas, para comprobar si los cambios metabólicos implican cambios en la síntesis.

En los tratamientos con Vitamina E, Selenio y BCNU se medirán además los niveles del ARNm de la enzima TH, para poner de manifiesto si el desequilibrio en la capacidad antioxidante influye sobre la expresión génica. En cada uno de estos tratamientos se medirán la actividad y niveles de ARNm del TDA. Proteína esencial en el sistema dopaminérgico ya que controla el tiempo de permanencia de la DA en el espacio sináptico, influyendo en la neurotransmisión.

OBJETIVOS

En los casos en que los cambios sugirieran neurodegeneración mediremos el daño oxidativo en el tejido mediante la cuantificación de grupos carbonilos.

Queremos extender nuestro estudio hacia la medida de daño neurotóxico en los animales alimentados con una dieta deficiente en vitamina C. Utilizaremos la toxina MPP+ para saber en qué medida esta deficiencia puede afectar a la protección del sistema Nigro-estriado frente a agentes externos. Además estudiaremos el posible papel neuroprotector de la vitamina C haciendo un estudio paralelo en animales alimentados con una dieta suplementada con una alta concentración en Vitamina C.

M.1. ANIMALES.

Todos los experimentos con animales se llevaron a cabo siguiendo las directrices del consejo de Europa (EC 806/89), la normativa española (BOE 67/8509-12, 1988) y mediante técnicas aprobadas por el comité científico de la Universidad de Sevilla.

En todos los experimentos realizados con ratas se utilizaron hembras de la raza Wistar de tres meses de edad de peso comprendido entre 250-300g. En los estudios con dieta deficiente en vitamina C se usó cobayas que al igual que los humanos no tienen capacidad de sintetizar ácido ascórbico, al contrario de la rata. Las cobayas eran hembras Durkin Hartley de 5 meses de edad con un peso entre 550-700 g proporcionadas por (B&K Universal Limited).

Los animales que se mantuvieron durante el tratamiento en nuestro laboratorio con libre acceso a agua y comida (dieta de mantenimiento A 04 de Panlab S.L.), en ciclos de luz y oscuridad de 12 horas bajo condiciones apropiadas de temperatura y humedad.

Los animales utilizados para técnicas bioquímicas fueron decapitados entre las 10 y 11 horas a.m. Los cerebros fueron rápidamente diseccionados sobre hielo, separándose las distintas estructuras según el atlas de Paxinos y Watson (Paxinos y Watson, 1986). Todas las estructuras se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su utilización. En los animales utilizados para la obtención de sinaptosomas o para estudios de toxicidad, uno de los estriados no se congeló siendo procesado inmediatamente tras su disección.

MATERIAL Y METODOS

Los animales destinados a la medida de ARNm mediante estudios de mensajero in situ, fueron decapitados y seguidamente los cerebros se extrajeron y se congelaron sumergiéndolos en - isopentano a -15 °C. Tras esto se conservaron secos a -70°C hasta que se cortaron en un criostato en secciones (Jung CM 1800, Leica)

M.2. TRATAMIENTOS.

M.2.1. Dieta deficiente en Selenio.

a) Ratas (n=10) alimentadas con una dieta deficiente en selenio ($10\pm 10\mu\text{g}/\text{k}$) durante 15 días.

b) Ratas (n=10) alimentadas con una dieta deficiente en selenio ($10\pm 10\mu\text{g}/\text{k}$) durante 30 días.

c) Y d) Los correspondientes grupos controles alimentados durante 15 (n=10) y 30 (n=10) días con una dieta estándar de rata.

Tras concluir el periodo de dieta los animales se sacrificaron por decapitación entre 10:00 y 11:00 a.m., siendo 6 procesados para medidas bioquímicas o elaboración de sinaptosomas, y 4 de cada grupo se congelaron en isopentano para las técnicas de biología molecular.

M.2.2. Tratamiento agudo con BCNU.

Los animales se dividieron en dos grupos:

a) **Experimental** (n=11) tratados durante cuatro días con 20mg/K de 1,3-bis-(2-cloroetil)-1-nitrosourea (BCNU) (Nitrourean®, fabricado por Thissen S.A., titular Sintesa S.A.) i.p. disuelto en solución salina-etanol 3:2 dos veces al día

b) **Control** (n=11) a los que se le inyectó solución salina y etanol en igual proporción.

Tras concluir el tratamiento, al quinto día, se sacrificaron por decapitación entre 10:00 y 11:00 a.m., siendo 6 procesados para medidas bioquímicas o elaboración de sinaptosomas, y 4 de cada grupo se congelaron en isopentano para las técnicas de biología molecular.

M.2.3. Dieta deficiente en Vitamina E.

a) Ratas (n=15) alimentadas con una dieta deficiente en Vitamina E (<15mg/k) durante 15 días.

b) Ratas (n=15) alimentadas con una dieta deficiente en Vitamina E (<15mg/k) durante 30 días.

c) Y d) Los correspondientes grupos controles alimentados durante 15 (n=15) y 30 (n=15) días con una dieta estándar de rata.

Tras el periodo de dieta las ratas se sacrificaron por decapitación entre 10:00 y 11:00 a.m., siendo 6 procesados para medidas bioquímicas o elaboración de sinaptosomas, 4 de cada grupo se congelaron en isopentano para las técnicas de biología molecular y por ultimo 5 se operaron para estudios mediante la técnica de microdiálisis.

M.2.4. Dieta con distintas concentraciones en Vitamina C.

Los animales se dividieron en tres grupos y se les alimentaron durante 30 días con unas dietas con diferente contenido en AA

a) Cobayas (n=13) con una dieta control, con un suplemento normal de vitamina C, 1.4 g de AA/kg.

b) cobayas (n=13) alimentadas con una dieta sin vitamina C.

c) cobayas (n=8) alimentadas con una dieta suplementada con vitamina C (5 g AA/Kg).

MATERIAL Y METODOS

Tras concluir el tratamiento, al quinto día, se sacrificaron por decapitación entre 10:00 y 11:00 a.m., siendo 8 animales de cada grupo procesados para estudios de toxicidad, y 5 animales de los grupos a y b se procesaron para elaborar sinaptosomas y para otras medidas neuroquímicas.

M.3. MEDIDA DE DOPAMINA Y SUS METABOLITOS.

Los análisis se realizaron mediante HPLC y detección electroquímica. Se utilizó para ello una bomba Merck-6200 junto con un electrodo de carbón vítreo (Antec EC detector) con un potencial de 0.8 voltios (electrodo de referencia de Ag/AgCl).

La fase móvil se preparó de acuerdo con Dibusolo y colaboradores (1989) con modificaciones consistió en una mezcla de 100mM de ácido fórmico (Merck), 0.36mM de ácido octanosulfónico (Scharlau), 1.0mM de ac.cítrico (Merck), 0.1mM de EDTA (Sigma Chemical Co.), 5.0%(v/v) de acetonitrilo (Scharlau) y 0.25%(v/v) de dietilamina (Merck) con un pH final de 3.1. La mezcla de solventes se filtró a través de filtros de 0,45 µm de diámetro de poro mediante vacío, para eliminar las pequeñas burbujas de aire que pudieran interferir en el análisis. Los análisis se realizaron isocráticamente a temperatura ambiente y a un flujo de 1ml/min.

Las concentraciones de las muestras se calcularon con ayuda de curvas de calibración obtenidas después de la inyección de patrones. Los patrones se prepararon en una disolución 0.1M de ácido perclórico, 1mM de bisulfito sódico y se conservaron a 4°C durante un período de tiempo no superior a 2 meses. El límite de detección del ensayo en las condiciones descritas es de 50-100pg/muestra. 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. Los siguientes patrones fueron adquiridos en de Sigma Chemical Co. : dopamina (DA), 3-metoxitiramina (3-MT), ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), ácido homovanílico (HVA).

El tejido fue homogeneizado en 0.1m de ácido perclórico mediante ultrasonido (Labsonic 1510 de Braun). A continuación se centrifugó a 12000g durante 15 minutos a 4°C en una microfuga Hettisch Mikroliter. El pellet se congeló para la posterior medida de los grupos carbonilos en las proteínas y los sobrenadantes se filtraron por rotación a baja velocidad (1000xg) en una centrifuga (Centrikon H-401 de Kontron) a través de filtros de 0,2 µm de diámetro de poro. Los filtrados resultantes 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 mediante un inyector de alta presión (Rheodyne 7125-075) con un bucle de llenado de 20 µl.

M.4. ACTIVIDAD TIROSINA HIDROXILASA.

La medida de esta actividad enzimática se realizó de acuerdo al protocolo descrito por (Reinhard, Jr. y col., 1986). El tejido fue homogeneizado en tampón tris-clorhídrico 30mM que contenía 0.1% de Tritón X-100. (pH 6,5 ajustado con ácido acético) Una alícuota del homogenado se incubó con 2.5 nmol de tirosina-HCl Tirosina Tritiada (New England Nuclear), 50 nmol del cofactor 6(R)-L-eritro-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina (Schircks Laboratories, Suiza), 5000 unidades de catalasa (Sigma) y 5mM de ditiotretitol en un tampón fosfato potásico 100mM, pH 6.0. Seguidamente se colocó en baño de hielo y se añadió a cada tubo 1 ml de una suspensión de carbón activo (Sigma) al 10% en HCl 0,1 M para eliminar el exceso de tirosina marcada. Dicha suspensión se mantuvo en agitación continua durante

MATERIAL Y METODOS

todo el ensayo. Los tubos se agitaron y se centrifugaron durante 6 minutos en microfuga a 4 °C, tras lo cual se tomaron 700 µl del sobrenadante que fueron transferidos a otros tubos a los cuales se añadieron 750 µl de la suspensión de carbón activo, se volvieron a agitar y a centrifugar a 4 °C. Finalmente se tomaron 750 µl del sobrenadante y se pasaron a viales de centelleo en los que se determinó la radioactividad utilizando 5 ml de líquido de centelleo Formula 989 en un contador de centelleo (LS 1800 de Beckman).

M.5. MEDIDA DE LA CANTIDAD DE TIROSINA HIDROXILASA.

El tejido se homogeneizó en tampón 40 mM Tris-HCl, 0,2 mM DTT, 8% de sacarosa, pH 7,4 e inhibidores de la proteasa (leupeptina, 0,5 mg/l, peptastina, 0,7 mg/l y sulfonil fluoruro de fenilmetilo (PMSF), 40 mg/l. Los análisis fueron realizados mediante gel de dodecil sulfato de sodio y poliacrilamida (SDS-PAGE) siguiendo el método descrito por Laemmli (). Se tomó la cantidad de extracto determinado y se diluyó con 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) y se desnaturalizó en agua hirviendo durante 5 minutos para seguidamente ser cargados en el gel.

Después de la electroforesis el gel fue transferido a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 µm (Bio-Rad),. La transferencia se realizó según el método descrito por Towbin, durante 2 h a 4 °C a 100 V (Towbin y col., 1981).

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 (TTBS) (Sigma), durante 1 h a temperatura ambiente y agitación suave; dicho tampón se usó para los lavados de la membrana posteriores a cada una de las incubaciones. Seguidamente se procedió a la incubación con el anticuerpo anti-TH (Boehringer-Mannheim) a una dilución 1/500 en TTBS toda la noche a temperatura ambiente en agitación suave. Para la detección

por fosfatasa alcalina (Bio Rad) , se incubó primero la membrana con el anticuerpo biotinilado (Boehringer-Mannheim) a una dilución 1/3000 en TTBS durante una hora y después con solución de estreptoavidina y fosfatasa alcalina biotinilada (Bio Rad) en las mismas condiciones de concentración y tiempo, procediéndose seguidamente a su revelado. Para la detección por peroxidasa se usó el anticuerpo secundario marcado con peroxidasa (Boehringer-Mannheim) a una dilución 1/1500 en TTBS, incubándose durante 1,5 h kit de revelado basado en el uso de peróxido de hidrógeno y 4-cloro-1-naftol en dietilenglicol suministrado por BioRad.

La cuantificación de la banda de TH se determinó en un densitómetro con un densitómetro láser de Molecular Dynamics (Sunnyvale, CA, USA). Para llevarla a cabo el sistema tiene en cuenta la densidad óptica media de la banda y el área de ésta, dando cuenta el producto de estos dos factores de la cantidad de proteína presente. La especificidad de la banda de TH se comprobó omitiendo el paso de la incubación con el anticuerpo primario anti-TH.

M.6. MEDIDA DEL FUNCIONAMIENTO DEL TRANSPORTADOR DE DOPAMINA.

Se prepararon sinaptosomas (modelos *in vitro* de las terminaciones nerviosas) con estriados procedentes de animales tratados y de controles como se ha descrito previamente (Lapchack y Hefti, 1992). Brevemente, el estriado se homogeneizó en sacarosa 0,32M fría y posteriormente se centrifugó a 3400 r.p.m. durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se recogió y se centrifugó ahora a 14000 r.p.m., 20 min a 4°C. Se recoge el sedimento usándola como la fracción P2 sinaptosomal. La fracción P2 es resuspendida en un medio Krebs conteniendo pargilina (10 µM) e imipramina (10 µM) y se preincuban durante 5 min. Posteriormente se le añade a cada preparación

MATERIAL Y METODOS

sinaptosomal (que se harán por duplicados) 2 μ Ci de [2,5,6- 3 H]dopamina (12.5 Ci/mmol) y se incuban durante otros 5min. Se detiene la reacción con frío y se centrifuga el preparado a 14000 r.p.m., 20 min a 4°C. Finalmente se resuspende el pellet obtenido con tritón 1% y añadiendo líquido de centelleo se lleva al contador de radiactividad (LS 1800 de Beckman) para medir el contenido en [3 H]dopamina. El resultado se expresa como mg DA / μ g proteína / hora.

M.7. MEDIDA DE LOS GRUPOS CARBONILOS.

Se midieron los grupos carbonilos como indicadores de las oxidaciones de las proteínas como describe Lenz (Lenz y col., 1989) para ello se redujeron los grupos carbonilos de los homogenados de sustancia nigra y de estriado con borohidruro [3 H] de sodio (ARN. INC). 50 μ g de proteínas del pelet obtenido en la preparación de las muestras para la medida de DA y sus metabolitos mediante HPLC fueron secados a vacío Para lo cual se utilizó una centrífuga de vacío Speed Vac svc 100 de Savant. Posteriormente tratados con tampón Tris-HCl 1M, EDTA 10 mM pH 8,5 y borohidruro sódico 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 (Merck) al 70%. Seguidamente se procedió a la hidrólisis de la proteína por calentamiento a 145 °C con HCl 6 N (Merck) durante 4 horas. Una vez hidrolizada se separaron los aminoácidos pasándolos por una resina Dowex-50 (Sigma) previamente lavada con agua y después en NH₄OH 2 M (Merck). La radioactividad se determinó en el

NH₄OH eludo mediante secado a vacío y resuspensión con cinco mililitros de líquido de centelleo.

M.8. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA GLUTATIÓN REDUCTASA.

Para la medida de la actividad de la enzima GR se usó la disminución de la absorbancia a 340nm por disminución de los niveles de glutatión oxidado (GSSG) al transformarse en glutatión reducido(GSH) por acción de la enzima según el método de Worthington y Rosemeyer (Worthington y Rosemeyer, 1974). Para ello los homogenados en tampón Tris 20 mM, sacarosa 0,25 mM, ditioneitol 1 mM y EDTA 1mM con un pH =7,4 ajustado con HCl de los cerebros de los animales controles y tratados se centrifugan a 800g durante 10min a 4° C. Tras esto, se ponen en tampón cuya concentración final será: fosfato básico potasio 20,5 mM, fosfato dibásico potásico 26,4 MM, cloruro potásico 200mM y EDTA 1 mM y se le añaden los substratos de la reacción: NADPH (0.1mM) y GSSG (1mM). Se mide la absorbancia a 340nm durante 120seg a 37°C y se mide la pendiente de la disminución de la misma con respecto al tiempo. Las medidas espectrofotométricas se realizaron en un espectrofotómetro UV-160 A de Shimadzu.

M.9. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS MONOAMINO OXIDASA A Y B.

El método para la determinación de la actividad de las dos formas de la MAO a y B se hizo basándose en los métodos descritos por Vaccari y Tipton (Vaccari y col., 1983; Tipton, 1985), respectivamente con algunas modificaciones. Las muestras se homogeneizaron por ultrasonido (Labsonic

MATERIAL Y METODOS

1510 de Braun) aplicando una dilución 1:15 en tampón fosfato sódico potásico 0,1M a pH=7,4. Se centrifugaron a 100g durante 10 minutos a 4° C . La mezcla del ensayo contenía finalmente fosfato sódico potásico 80mM, pH7,4 y 5-HT 1,5 mM(1 mCi/nmol) para la MAO A y beta-PEA 50 µM (0,5 mCi/nmol) para la MAO B, en un volumen final de 200 µl que contenía aproximadamente 0,15 mg por tubo. La reacción se inicio mediante la adición del sustrato. Los tubos e incubaron entonces a 37° C durante 30 minutos. La reacción se detuvo añadiendo 125µl de ácido cítrico 2 N. El producto de la reacción se separo de la reactividad sobrante mediante la adición de un solvente de extracción (Benceno-etilacetato 1:1 (Merck) para la MAO A y tolueno:etilacetato para la MAO B). Esta mezcla se centrifugo a 12000xg durante 5 minutos y se tomaron alícuotas de 500µl de la fase orgánica (sobrenadante) que se contaron en miniviales a los que se le añadieron 4ml de Ready Protein (Beckman).

M.10. MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DE ACIDO ASCORBICO Y ACIDO DEHIDROASCORBICO.

AA y DHAAS se midieron por HPLC unido a detección electroquímica según el método de Desolé (Desole y col., 1991b) con ciertas variaciones. El tejido fue homogeneizado en orto-H₃PO₄ al 1% con 1mM de EDTA, se centrifugó a 12000g durante 10min a 4° C y se filtró el sobrenadante. Tras esto el filtrado se dividió y ambos se llevaron a pH 7 con K₂HPO₄ y DL-Homocisteina al 1% se añadió en la primera de las alícuotas para reducir el DHAA existente en la misma a AA. Ambas muestras se mantuvieron a temperatura ambiente durante 15min y se llevaron otra vez a pH 3 con orto-H₃PO₄. Tras esto 20µl de cada muestra se inyectaron en el HPCL. La cantidad de DHAA se calculó por la diferencia en AA entre la primera y la segunda alícuota.

La fase móvil utilizada para estas determinaciones contenía ácido cítrico 2% (Sigma), K₂PO₄ 2%, EDTA 1mM (Sigma), MeOH 1,2% (Merck) y sodio octilsulfato 70mg/l, a pH=3. Se uso los mismos aparatos que para la determinación de aminas biógenas y aquí el flujo a 0,9 ml/min y 0,8 V

M.11. MEDIDA DE LOS AMINOÁCIDOS.

El estriado fue homogeneizado en orto-H₃PO₄ al 1% conteniendo 1mM de EDTA, esto se filtró y se mezcló con D,L-alfa-aminobutírico como estándar interno, estas muestras se secaron con rotavapor a 60°C y entonces redissuelto en 25 ml de tampón borato a pH 8.9 conteniendo 0,02% de azida de sodio. Tres mililitros de esta solución se mezclaron con 2,4 µl de dietiletoximetilenmalonato. La formación de N(2,2-bis (etoxicarbonil) vinil) derivados de la mezcla de aminoácidos se extrajeron a 50° c durante 50 min con agitación vigorosa. La mezcla resultante se enfrió a temperatura ambiente y 15µl inyectado en el HPLC (Alaiz y col., 1992).

M.12. HIBRIDACIÓN *IN SITU*.

M.12. 1. Obtención de la ribosonda

En nuestro estudio usamos diferentes clones:

a) Clon pTH.4a (Promega Biotech, Madison, Wi), que contiene un inserto de 0,3 kb del clon de TH de ADN complementario original (pTH.4; 0,4 kb) y que fue aislado por primera vez por Lewis y col. (1983). pTH.4a contiene un fragmento de 282 nucleótidos en el extremo 3' del gen de la TH de rata

MATERIAL Y METODOS

(incluyendo 13 nucleótidos de la secuencia no transcrita de dicho extremo), que corresponden a los nucleótidos 1240-1521 de la secuencia de dicho gen clonado por (Grima y col., 1985). pTH4.a fue linealizado con la enzima de restricción *Pst*I. La sonda de ARN complementario antisentido fue sintetizada con la polimerasa de ARN del fago SP6.

b) La ribosonda antisentido del DAT se generó desde un plásmido amablemente cedido por el Dr. M. P. Martres (INSERM, Paris), que contiene un fragmento *Xba*I-*Hind*III de 800 pb del cDNA del DAT de rata clonado en el vector pRc/CMV (Invitrogen corporation). Para preparar la sonda antisentido el plásmido fue linealizado con *Xba*I y usado como molde con la T7 RNA polimerasa (Diaz y col., 1995) de acuerdo con el protocolo suministrado por la casa comercial. (Bethesda Research Laboratories, Bethesda, MD, U.S.A.).

No conteniendo ninguno de los clones ningún punto de reconocimiento para la transcripción de la hebra sentido. La mezcla de reacción contenía: 20 unidades de polimerasa, el tampón proporcionado con esta, ATP, CTP y GTP cada uno a 1mM, uridina 5'-[α -tio] [35S] trifosfato (UTP) de New England Nuclear como marcador del ARNm ([35 S] UTP) 30 μ M (1300 Ci/mmol), DTT 4 mM y 7,2 U de inhibidor de ribonucleasa dietilpirocarbonato de Serva. La reacción de marcaje transcurrió durante 2 h a 37 °C y fue parada con EDTA 0,5 M. Seguidamente se separó el isótopo incorporado al ARNc del que no lo fue mediante paso por columnas de Sephadex microcolumnas ProbeQuant G-50 de Pharmacia Biotech para la separación de UTP no incorporado a la sonda y posterior centrifugación durante 2 min a 735 g.

Los reactivos de uso en el ensayo de hibridación in situ fueron de calidad para biología molecular. Los demás solventes y reactivos fueron de alto grado de pureza, obteniéndose todos ellos de los proveedores habituales.

M.12. 2. Reacción de hibridación.

La hibridación in situ de secciones de cerebros se llevó a cabo con leves modificaciones en el método detallado por (Passinetti y col., 1989b). Las secciones de 12 μm se obtuvieron en criostato disponiéndose sobre portas previamente gelatinizados. Una vez descongeladas fueron postfijadas en paraformaldehído al 4% 30 min, continuándose con tres pasos de lavado en tampón fosfato salino pH 7,4 (PBS) de 10 min cada uno. A continuación fueron tratadas con trietanolamina 0,1 M pH 8,0 por 1 min y seguidamente con anhídrido acético al 0,25% en trietanolamina 0,1 M durante 10 min, para disminuir la unión inespecífica. Continuando con un lavado de 1 min en SSC 2X, preparado a partir de uno 20X; 3 M de NaCl y 0,3 M de citrato sódico, las secciones fueron deshidratadas mediante paso por soluciones con cantidades crecientes de etanol (30, 60, 90 y 100%) y secadas al aire. A continuación se procedió a la hibridación de la sonda de [^{35}S]ARNc con su secuencia complementaria; previamente la sonda se diluyó en el tampón de hibridación y se desnaturalizó a 80 °C durante 5 min. Dicho tampón se componía de formamida al 50%, solución Denhardt 0,02%, SSC 1X, Tris-HCl 50 mM, pirofosfato sódico 0,1%, ARN de levadura 0,1% mg/ml, esperma de arenque 0,1 mg/ml, EDTA 1mM y sal sódica de sulfato de dextrano. La hibridación se llevó a cabo durante 3,5 h a 50 °C, enjuagándose a continuación en dos soluciones de SSC 2X, una con DTT 20 mM y otra sin DTT. Seguidamente se sometieron a digestión con ribonucleasa (RNasa) a 37 °C (20 $\mu\text{g/ml}$ de RNasa A en NaCl 0,5 M, Tris-HCl 0,01 M y EDTA 1 mM, a pH 8,0) durante 30 min. Para aumentar la estrictidad las secciones se pasaron por dos soluciones con contenido decreciente de SSC 2X con β -mercaptoetanol 0,02 M a 25 °C durante 2 h, y otra de SSC 0,1X a 60 °C por 1 h. Finalmente las secciones fueron deshidratadas en etanoles (30, 60, 90 y 100%) con acetato amónico 0,3 M y secadas al aire.

MATERIAL Y METODOS

M.12. 3. Análisis de la señal de hibridación y cuantificación.

Como paso previo a la cuantificación de la señal los portaobjetos fueron expuestos a un film de autoradiografía Betamax durante 10 días.

Para el estudio de la expresión del ARNm se cuantificaron granos de plata sobre neuronas individuales usando un analizador de imágenes por videodensitometría. Las secciones fueron procesadas para la emulsión autorradiográfica. Los portaobjetos se impregnaron de emulsión LM-1 de Amersham diluida 1:1 con agua, manteniéndose en la oscuridad a 4 °C durante 30 días (3 veces el tiempo de exposición del film). A continuación las secciones se revelaron con el revelador D-19 (Kodak) durante 2,5 min a 15 °C y se fijaron durante 4 min para a continuación ser teñidas con cresil violeta al 0,5% pH 3,8, deshidratadas y finalmente montadas con medio de montaje. El marcaje fue considerado específico cuando la acumulación de granos sobre las células individuales en los núcleos excedió 5 veces el valor del ruido de fondo en la ampliación 100X. El área que se consideró para la cuantificación fue aquella de alta densidad de granos sobre los cuerpos celulares individuales contándose el número de granos en dicho campo. Debido a los altos niveles de marcaje, a la disposición típica de las agrupaciones sobre los cuerpos y al alto aumento la delimitación fue inequívoca. Sólo las células bien separadas fueron seleccionadas para la cuantificación. Se analizaron las secciones correspondientes a los niveles 38 y 39 del atlas de Paxinos y Watson de 5 animales para cada tratamiento, midiéndose un mínimo de 100 células para cada uno (Paxinos y Watson, 1986).

M.13. MICRODIÁLISIS.

M.13. 1. Implantación de cánulas para microdiálisis.

Los animales fueron anestesiados (400mg/Kg i.p. de hidrato de cloral y lidocaina local, 10%(P/V) y seguidamente se procedió a la implantación de las cánulas de microdiálisis. Se utilizó una cánula en forma de Y (Santiago y Westerink, 1990) Para lo cual se usó un estereotáxico Kopf Instruments (Tujunga, CA, USA). La membrana de diálisis utilizada fue una membrana dialítica semipermeable de éster de celulosa saponificado con un diámetro de poro de 10000 dalton y de 4 mm de longitud (AN 69, Hospal, Meyzieu, Francia). La recuperación *in vitro* de dopamina en la membrana fue $20,3 \pm 1,6\%$ (n=5). La cánulas se implantaron mediante estereotáxico en ambos estriados con coordenadas: A/P 0,6, L/M 2,8, V/D 6,0 o en ambas nigras: A/P 3,8, L/M 3,8, V/D 8,7 desde bregma y dura (Paxinos y Watson, 1986).

La perfusión intracerebral (microdiálisis) mediante un sistema "on line" totalmente automático. La entrada de la cánula de diálisis se conectó a una bomba de perfusión (Harvard apparatus, mod. 22) y la salida a la válvula de inyección (Rheodyne 7000). Se utilizó un electrodo de carbón ítreo ajustado a -780mV (ANTEC) y una bomba Merck L-6200. La columna analítica utilizada fue una Merck Liochrocart de fase reversa con relleno Lichrospher C18 de 5µm de diámetro de poro y de dimensiones 125 mm x 4mm.

M.14. ESTUDIO IN VITRO DE LA TOXICIDAD DE MPP⁺ EN TEJIDO ESTRIATAL DE COBAYAS.

Los estriados de las cobayas usadas en el estudio de toxicidad de MPP⁺ fue troceado en fragmentos de 0.3 x 0.3 mm usando un "McIlwain tissue chopper" y rápidamente transferido a un vial conteniendo tampón Krebs-bicarbonato frío (NaCl 117mM, NaHCO₃ 25 mM, KCl 1.5 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, CaCl₂ 2.5 mM, D-Glucosa 11.5 mM). Tras 3 lavados con el tampón Krebs, los fragmentos de estriado de cada animal se repartieron en dos viales

MATERIAL Y METODOS

(control y experimental) conteniendo 5 ml de tampón Krebs-bicarbonato oxigenado (95% O₂-5% CO₂) a 37°C. El protocolo que se siguió en cada experimento fue el siguiente: tras 15 minutos de aclimatación se incubaba cada vial con 25µM de MPP⁺ durante 50 minutos. El vial se transfiere a una bañõ de agua-hielo, se retira el Krebs con MPP⁺ y se lava dos veces con Krebs frío y limpio. El tejido seco se congela a -70°C hasta que se procesa como hemos descrito anteriormente para el análisis de DA y sus metabolitos mediante HPLC.

M.15. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN PROTEÍNAS.

En todos los ensayos la medida del contenido proteico se hizo mediante medidas espectrofotométricas de eluidos de los homogenados pretratados con el reactivo de Folin-Ciucatel mediante el método descrito por Lowry utilizando albúmina bovina como estándar (Lowry y col., 1951).

M.16. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Se aplicó a los números obtenidos el t-test de Student. Cuando el valor de p obtenido era <0,05 (*) o <0,01(**) la diferencia fue considerada estadísticamente significativa.

En los números obtenidos en microdiálisis y los obtenidos tras la incubación con MPP⁺ la media de cada valor en condiciones control y tratamiento, fueron comparadas usando un análisis de varianza no paramétrico por rangos de Kruskal-Wallis para detectar alguna diferencia entre los valores de todos los tiempos muestreados. Cuando el valor de H fue mayor del 95% del nivel de confianza, la comparación de las medias usando

el test U de Mann-Whiney para detectar diferencias entre los valores controles y los valores experimentales.

R.1. EFECTO DE LA DIETA DEFICIENTE EN SELENIO.**R.1.1. Medida de DA y sus metabolitos.**

La SN de las ratas alimentadas con una dieta deficiente en Se durante 15 días mostraron niveles de DA aumentados (+37%) junto con un aumento significativo del HVA (+67%), también se observó un incremento no significativo de DOPAC (+21%, $p=0.09$). Esto corrobora los datos anteriormente obtenidos en este laboratorio que indicaron un aumento de la tasa de recambio dopaminérgica en esta área. Cuando prolongamos la deficiencia de Se hasta un mes, no solo observamos aumento en los niveles de DA (+43%), sino un aumento general en todos los metabolitos dopaminérgicos: DOPAC (+44.8%), 3-MT (+31%) y HVA (+24%) lo que sugiere que los cambios promovidos por la dieta tras 15 días, llegan a ser más importantes y profundos tras el mes (Tabla R1).

En estriado la dieta tras 15 días promovió un incremento en la concentración de DA (+20%) y en HVA (+23%) como en SN, aunque estos cambios fueron de menor cuantía que los observados en los cuerpos dopaminérgicos. Tras 30 días manteniendo una dieta deficiente en Se los niveles de metabolitos dopaminérgicos volvieron a los niveles controles, observándose como único cambio un aumento en los niveles de DA (+26%). Estos cambios podrían apuntar a una regulación del funcionamiento de la terminal ejercida por el cuerpo dopaminérgico (Tabla R1).

RESULTADOS

TABLA R1. EFECTO DE UNA DIETA DEFICIENTE EN SELENIO DURANTE 15 Y 30 DÍAS EN DOPAMINA Y SUS METABOLITOS EN SUSTANCIA NIGRA Y ESTRIADO.

SUSTANCIA NIGRA	CONTROL	15 DÍAS	30 DÍAS
DA	463.2 ± 108	636 ± 98.7 *	664.1 ± 93.2 **
DOPAC	68.6 ± 18.6	83.5 ± 20	99.8 ± 16.3 *
3-MT	46.7 ± 8.5	54.5 ± 33.1	61.2 ± 6.1 **
HVA	69.8 ± 9.5	117.2 ± 23.8 *	86.5 ± 5.9 *

ESTRIADO	CONTROL	15 DIAS	30 DIAS
DA	6923 ± 1197	8363.0 ± 766.2 *	8726.5 ± 1071.3 *
DOPAC	1069.8 ± 284	1328.0 ± 120	922.0 ± 110.2
3-MT	390.8 ± 73.2	389.7 ± 57	353.5 ± 33.4
HVA	591.2 ± 50	729.4 ± 65 **	645.0 ± 88.1

Cada valor es la media ± S.D. de seis animales por grupo. Los resultados se expresan en ng/g de tejido humedo. Significación estadística (test *t* de Student) **p* < 0,05, ***p* < 0,01.

R.1.2. Medida de la enzima TH.

Las ratas alimentadas con la dieta deficiente en Se durante 15 días no mostraron cambios en los niveles de actividad ni de contenido de TH en SN pero tras un mes de dieta estos dos parámetros aumentaron de forma significativa (+18% y +30% respectivamente). Sin embargo en estriado, la tendencia al aumento fue clara desde el día 15 aunque no llega a ser estadísticamente significativo hasta el mes cuando la actividad llega a aumentó un 33% y el contenido se elevó un +25.8% comparado con los animales controles (Fig. R1).

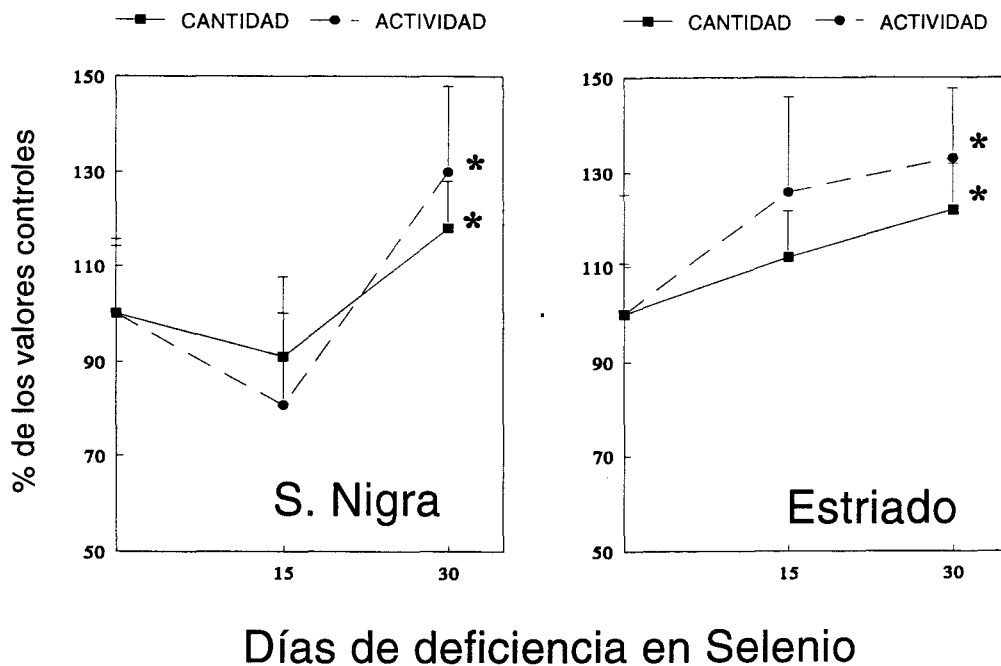
R.1.3. Expresión del ARNm de TH.

La hibridación *in situ* de los cerebros de las ratas controles, deficientes en Se durante 15 y 30 días, con la sonda antisentido de TH y el TDA ARNm dio como resultado una unión específica en el mesencéfalo ventral. La disposición típica de los acúmulos de granos sobre los cuerpos dopaminérgicos y su localización son indicativos que las neuronas que expresan TH y TDA ARNm era dopaminérgicas (Fig. R2).

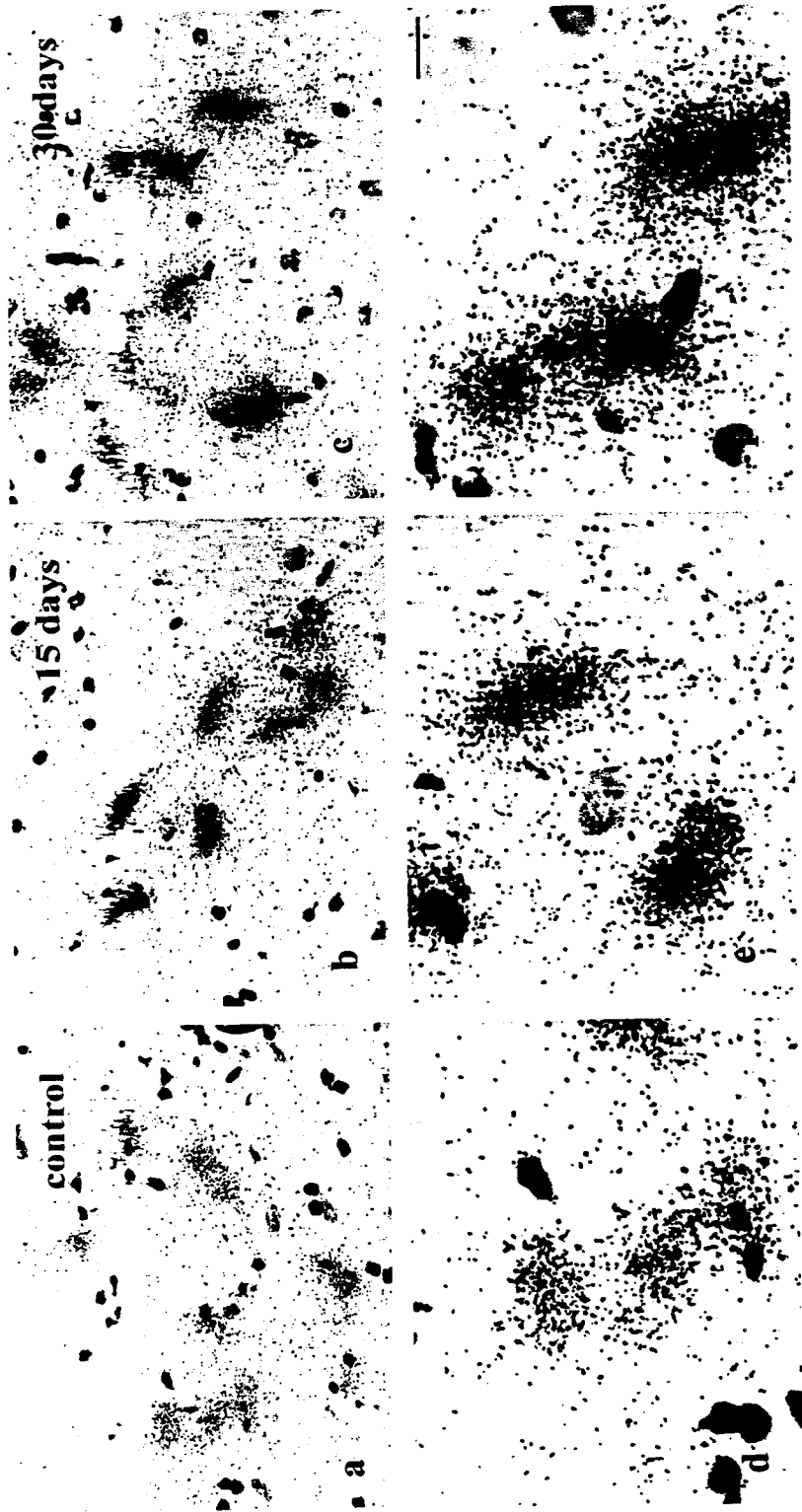
El análisis del film de autorradiografía reveló un aumento significativo del mensajero de TH desde el día 15 en las células dopaminérgicas de la SN (+19%) siendo este aumento de mayor medida a los 30 días de deficiencia en (+47%). Esto explicaría el aumento de la actividad y cantidad de TH tras el mes de dieta que encontramos en SN y estriado (Fig. R3).

RESULTADOS

FIGURA R1. CANTIDAD Y ACTIVIDAD DE TIROSINA HIDROXILASA EN SUSTANCIA NIGRA Y ESTRIADO EN RATAS ALIMENTADAS CON UNA DIETA DEFICIENTE EN SELENIO DURANTE 15 Y 30 DÍAS.

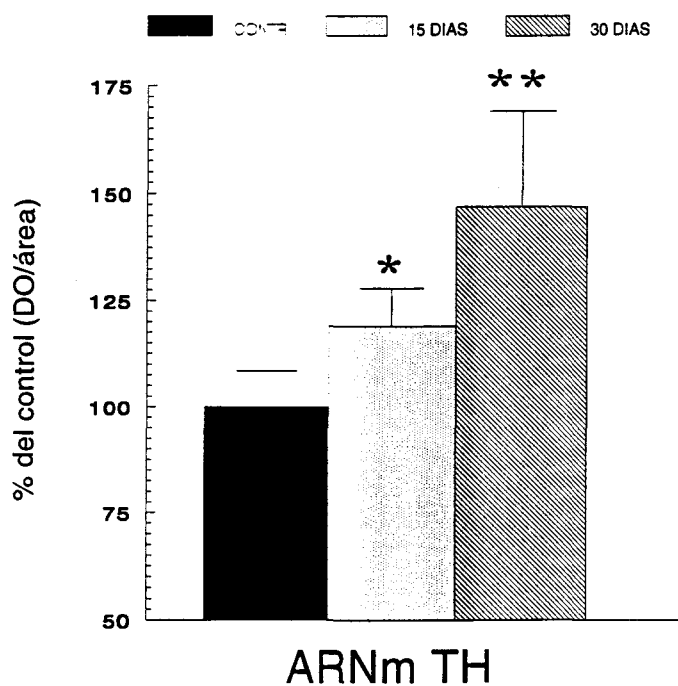


La actividad de TH se midió *in vitro* y el contenido se calculó por Western blotting, tal como se describe en Material y Metodos. Los resultados se expresan como porcentaje del valor control, nmol de DOPA formado/ mg de proteína/ hora para la actividad de TH y Unidades de Densidad Óptica por banda para la cantidad de TH. Significación estadística (test *t* de Student) * $p < 0,05$.



RESULTADOS

FIGURA R3 . CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL ARNm DE TH EN LA SNC DE RATAS ALIMENTADAS CON UNA DIETA DEFICIENTE EN SELENIO DURANTE 15 Y 30 DÍAS.



Los resultados se expresan como porcentaje del valor control, en unidades de Densidad Optica/area medida en el film autorradiografico. Significación estadística (test *t* de Student) * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

R.1.3. Expresión del ARNm de TDA.

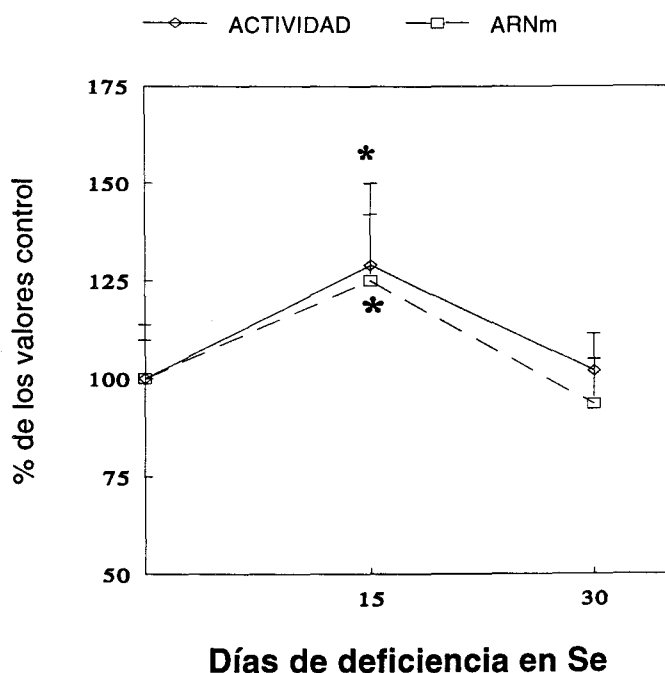
Sin embargo el perfil de expresión del mensajero ARNm del TDA fue distinto, mientras hubo un aumento claro tras 15 días de dieta deficiente en Se (+25%), los niveles de este ARNm volvieron a los exhibidos por los controles cuando la dieta se mantuvo 30 días (Fig. R4 y R5).

R1.4. Medida de la recaptación de Dopamina en sinaptosomas *in vitro*.

Para ver si los cambios en el mensajero de TDA produjeron cambios a nivel del funcionamiento del transportador, se midió la capacidad de recaptación de DA de sinaptosomas elaborados desde los estriados de las ratas de los tres grupos. Los sinaptosomas de las ratas con deficiencia en Se durante 15 días fueron capaces de recaptar más DA (+29%) que los de los animales controles. Este aumento en la capacidad de recaptación desapareció al prolongar la deficiencia un mes (Fig R4).

RESULTADOS

FIGURA R4. CANTIDAD DEL ARNm DEL TRANSPORTADOR DE DOPAMINA EN SNC Y ACTIVIDAD DEL TRANSPORTADOR EN SINAPTOSOMAS ESTRIATALES DE RATAS ALIMENTADAS CON UNA DIETA DEFICIENTE EN SELENIO DURANTE 15 Y 30 DÍAS.



La actividad del TDA se midió in viro usando sinaptosomas y el contenido de ARNm se calculó análisis del film autorradiográfico. Los resultados se expresan como porcentaje del valor control, pmol DA/ μ g de proteína/ hora para la actividad Unidades de Densidad óptica/área para la cantidad de ARNm. Significación estadística (test *t* de Student) * $p < 0,05$.

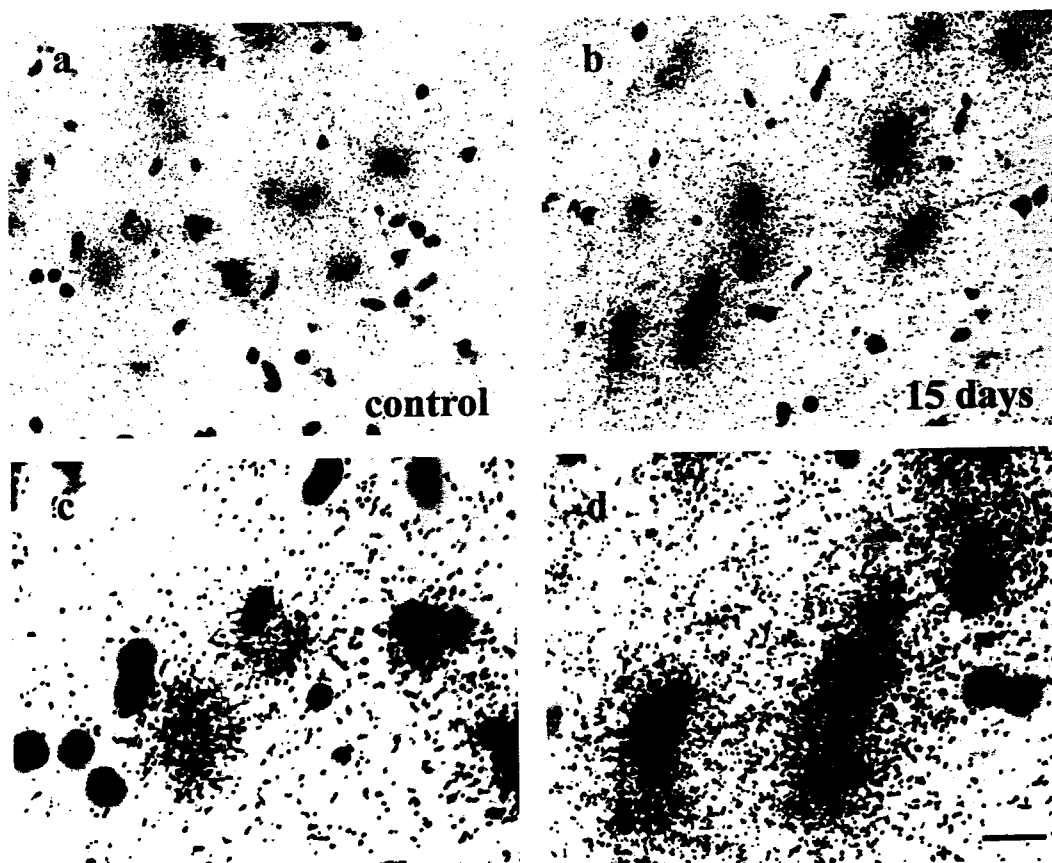


FIGURA R.9. Aumento en la expresión del ARNm de TH en Sustancia Nigra parte compacta tras 15 días de deficiencia en Selenio. Fotografía a alta magnificación en campo claro de la emulsión autoradiográfica mostrando la expresión del ARNm de TH de SN de controles (a y c) y de animales alimentados con una dieta deficiente en Selenio durante 15 días (b y d). Obsérvese en aumento en la expresión del ARNm tras 15 días, al prolongar la dieta hast 30 días la expresión volvió a los niveles controles. Escala (a y b) 27 μm (c y d) 11 μm .

RESULTADOS

R. 2. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON BCNU:

R. 2. 1. Determinación de la actividad de la glutatión reductasa.

Para comprobar la efectividad del tratamiento aplicado a los animales y comprobar que su efecto de inhibición de la GR se hace patente en el cerebro, medimos la actividad de dicha enzima en las áreas que estudiamos, observando una caída significativa en la actividad de la misma, en estriado un -89% con respecto a la actividad en los animales controles y un -75% en SN (Fig R6).

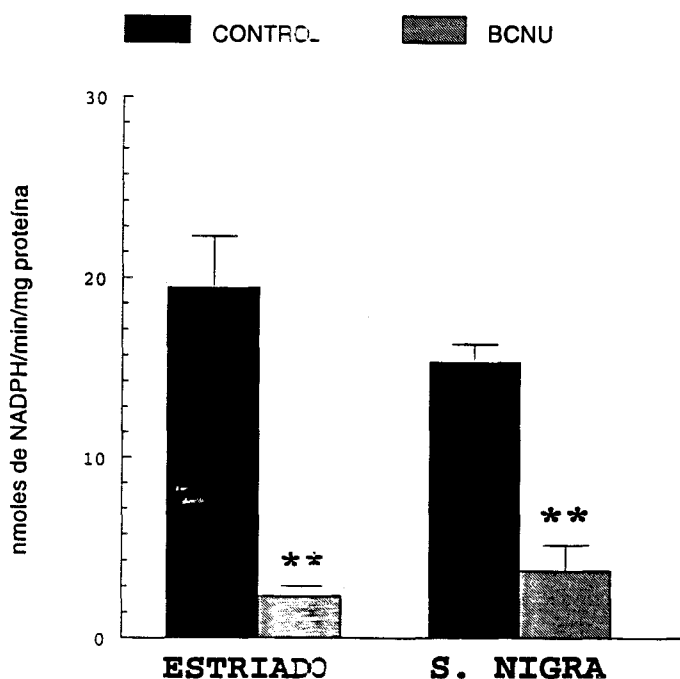


Figura R6. La actividad de GR se expresa en nmol NADPH oxidado/ min/ mg de proteína. Cada valor es la media \pm S.D. de seis animales por grupo. Significación estadística (test *t* de Student) *** $p < 0.001$.

R.2.2. Medida de dopamina y sus metabolitos

En estriado los niveles del sistema dopaminérgico se vieron alterados mostrando un aumento en los niveles de DA (+19% con respecto al control) mientras que su principal metabolito, el DOPAC sufre una disminución significativa en un -25%. El resto de los metabolitos de la DA se mantuvieron inalterados tras el tratamiento con el BCNU (Tabla R2 y R3). Esto da lugar a una disminución de la razón DOPAC/DA, indicativo de una descenso del metabolismo intraneuronal, así como de la razón de 3MT/DA, que revela una menor liberación de DA. Todo esto además se corrobora por la disminución de la razón HVA/DA, lo cual se acepta como índice de una disminución del metabolismo dopaminérgico. Por lo tanto podemos decir que existe un hipofuncionalidad del sistema dopaminérgico en el estriado.

Por otra parte, estudios similares en la SN no dieron cambios semejantes en el sistema dopaminérgico, así en los animales tratados la DA sufrió una disminución estadísticamente significativa (-30%) con respecto a los niveles de dicho neurotransmisor en la SN de los animales controles. Sin embargo los cambios observados en el DOPAC si eran semejantes a los encontrados en el estriado, observándose así una disminución de un -45% en el grupo tratado con respecto al no tratado (Tabla R2 y R3). Al contrario que en el estriado las razones 3MT/DA y HVA/DA sufrieron una elevación tras el tratamiento con BCNU, revelando una regulación a al alza del sistema dopaminérgico en SN.

RESULTADOS

TABLA R2. EFECTO DEL TRATAMIENTO DE BCNU EN LA DOPAMINA Y SUS METABOLITOS EN SUSTANCIA NIGRA Y ESTRIADO.

	Estriado		Sustancia nigra	
	<u>CONTROL</u>	<u>BCNU</u>	<u>CONTROL</u>	<u>BCNU</u>
DA	11284.6±488.5	13501.0±1015.7**	746.9±199.3	476.8±100.0**
DOPAC	1535.8±240.3	1146.0± 198.1*	223.5± 45.5	128.2± 23.8**
3-MT	277.5± 33.5	245.3± 36.2	41.7± 12.6	52.7± 19.1
HVA	608.3±135.7	506.8± 64.0	64.6± 19.1	48.4± 10.3

Cada valor es la media ± S.D. de seis animales por grupo. Los resultados se expresan en ng/g de tejido humedo. Significación estadística (test *t* de Student) * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

FIGURA R3. RAZONES DEL SISTEMA DOPAMINÉRGICO EN ANIMALES TRATADOS CON BCNU.

	Estriado		Sustancia Nigra	
	<u>CONTROL</u>	<u>BCNU</u>	<u>CONTROL</u>	<u>BCNU</u>
DOPAC/DA	0,136	0,084	0,298	0,268
3-MT/DA	0,024	0,018	0,054	0,110
HVA/DA	0,053	0,037	0,086	0,101

R.2.3. Contenido y actividad de tirosina hidroxilasa.

Mientras que la medida de la actividad de TH en estriado mostró un aumento (28% en estriado con respecto a controles), este aumento se vio acompañado por un incremento en el contenido de dicha enzima en este área (20% con respecto al grupo control). Mientras que en SN la actividad el contenido permaneció inalterada (Tabla R4).

TABLA R4. CANTIDAD Y ACTIVIDAD DE TIROSINA HIDROXILASA EN SUSTANTIA NIGRA Y ESTRIADO EN RATAS TRATADAS CON BCNU DURANTE CUATRO DIAS.

	<i>Actividad TH (nmol /mg proteína hour)</i>		<i>Contenido TH (Densidad Óptica)</i>	
	<u>CONTROL</u>	<u>BCNU</u>	<u>CONTROL</u>	<u>BCNU</u>
Striatum	9.83±1.34	12.58±1.22*	148.6±14.2	178.0±15.7*
S. Nigra	4.92 ±1.12	6.1 ±1.44	33.8 ± 7.1	36.9 ± 5.4

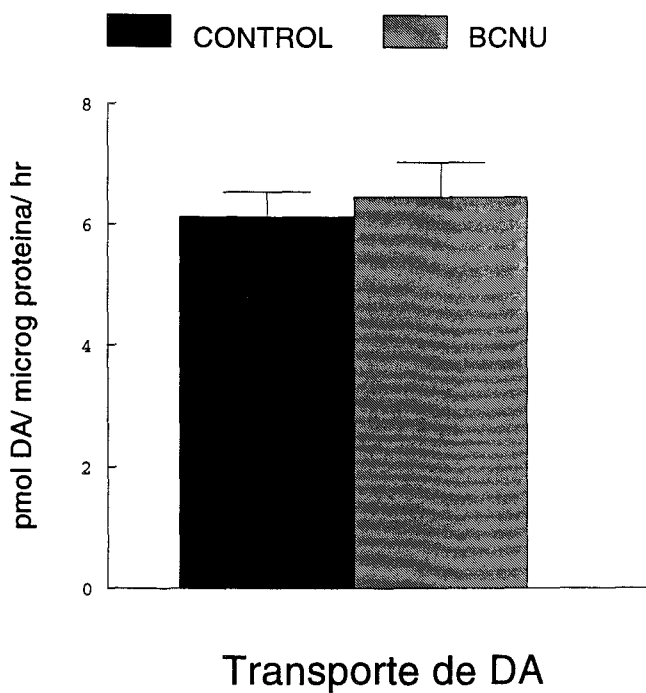
La actividad de TH se midió *in vitro* y el contenido se calculó por Western blotting, tal como se describe en Material y Metodos. Los resultados se expresan en nmol de DOPA formdo/ mg de proteína/ hora para la actividad de TH y Unidades de Densidad Optica por banda para la cantidad de TH. Significación estadística (test *t* de Student) *p < 0,05.

RESULTADOS

R.2.4. Medida del funcionamiento del transportador de DA.

Tal como muestra la figura el funcionamiento del transportador no se vió afectado tras el tratamiento de cuatro días con BCNU i.p.

FIGURA R7. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD DEL TRANSPORTADOR DE DOPAMINA EN RATAS TRATADAS CON BCNU.



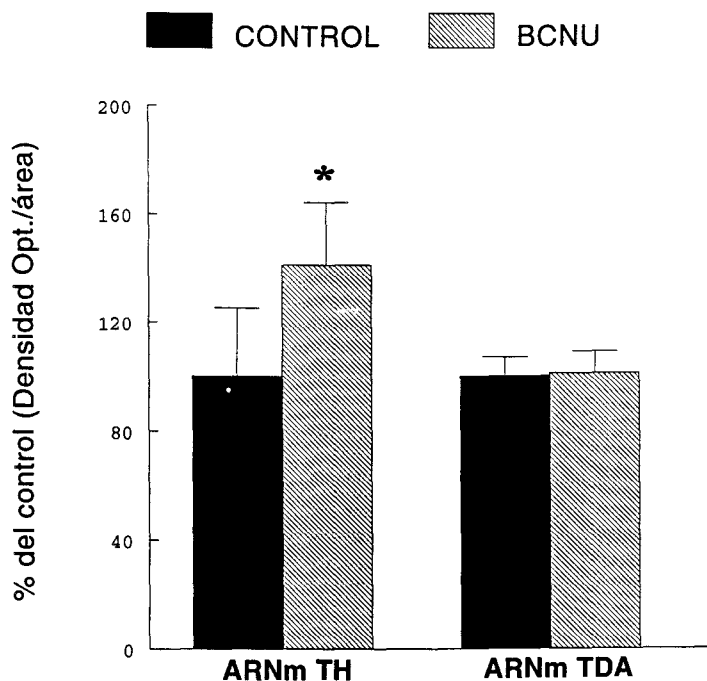
La actividad del TDA se midió *in vitro* calculando la recaptación de DA marcada en sinaptosomas. Los resultados se expresan como en pmol DA/ μ g de proteína/ hora. Cada valor es la media \pm S.D. de seis animales por grupo. Significación estadística (test *t* de Student) **p* < 0,05.

R.2.5. Medida de los niveles de ARNm de TH.

Cuando cuantificamos las imágenes obtenidas en el film tras la exposición de las secciones correspondientes a la SN incubadas con la sonda de TH marcada radioactivamente, observamos un aumento en el mensajero de esta enzima tras el tratamiento con BCNU durante 4 días (+41% con respecto a los controles). Lo cual explicaría el aumento de enzima en la terminal dopaminérgica, siempre que la TH recién sintetizada en el cuerpo fuese rápidamente trasladada a la terminal (Fig R8 y R9).

RESULTADOS

FIGURA R8. CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL ARNm DE TH EN LA SNc DE RATAS TRATADAS CON BCNU DURANTE CUATRO DÍAS.



Los resultados se expresan como porcentaje del valor control, en unidades de Densidad óptica/área medida en el film autorradiográfico. Significación estadística (test *t* de Student) * $p < 0,05$.

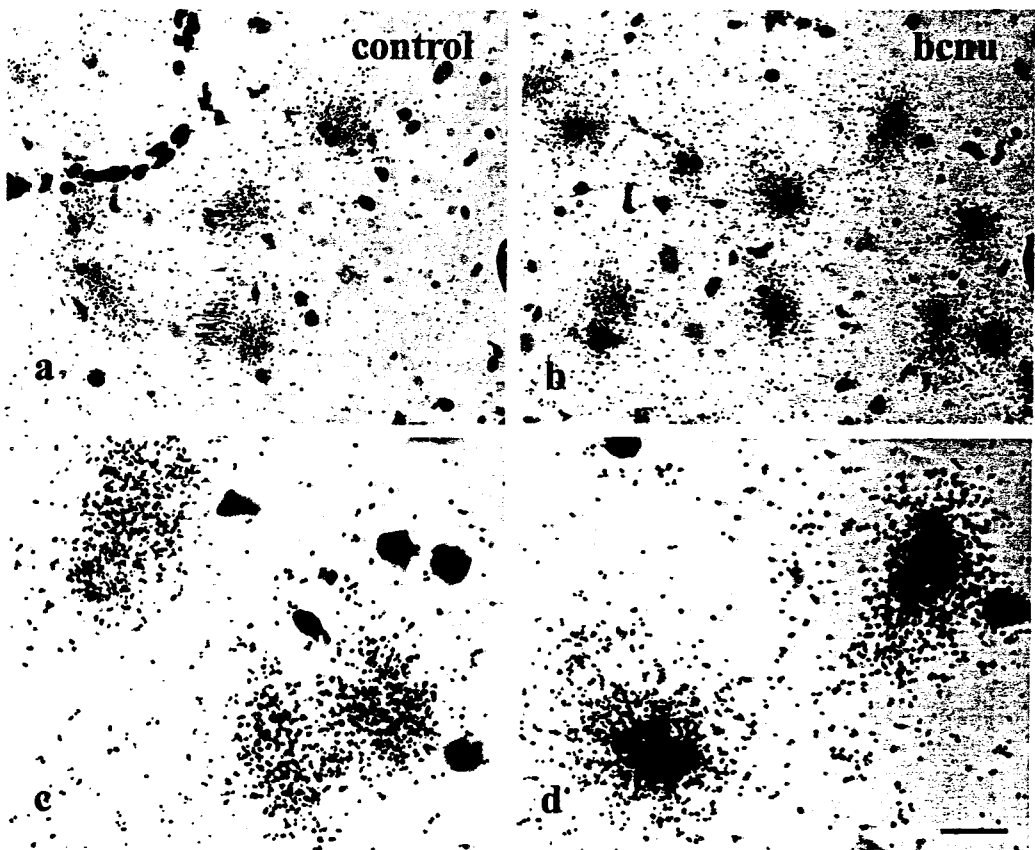


FIGURA R.9. Aumento en la expresión del ARNm de TH en Sustancia Nigra parte compacta tras el tratamiento con BCNU. Fotografía a alta magnificación en campo claro de la emulsión autoradiográfica mostrando la expresión del ARNm de TH de SN de controles (a y c) y de animales tratados con BCNU (b y d). Obsérvese en aumento en la expresión del ARNm tras la inhibición de la Glutación Reductasa. Escala (a y b) 27 μm (c y d) 11 μm .

RESULTADOS

R.2.6. Medida de los grupos carbonilos.

En la valoración de los grupos carbonilos, usados como parámetro del estado oxidativo de las proteínas, observamos una elevación muy significativa en el estriado de los animales tratados con el inhibidor de la GR (+102% con respecto al nivel control). Sin embargo, no se halló cambio alguno en los niveles de los carbonillos en la SN de dichos animales, que permanecieron en los niveles controles (Tabla R5).

TABLA R5. CUANTIFICACIÓN DE LOS GRUPOS CARBONILOS EN RATAS TRATADAS CON BCNU.

	Estriado	Sustancia nigra
<u>CONTROL</u>	137.18 ± 7.89	113.02 ± 6.25
<u>BCNU</u>	278.05 ± 75.76**	107.46 ± 12.97

Cada valor es la media ± S.D. de seis animales por grupo. Los resultados se expresan en cpm/ µg proteína. Significación estadística (test *t* de Student) **p* < 0,05, ***p* < 0,01.

R.3. DIETA SIN VITAMINA E.

R.3.1. Medida de la DA y sus metabolitos.

Sorprendentemente, tras someter las ratas a un periodo de 30 días de dieta deficiente en vitamina E los valores de DA y sus metabolitos no se vieron alterados en ninguna de las dos áreas de la vía nigroestriada (Tabla R6). Esta observación nos pone de manifiesto que el sistema dopaminérgico desarrolla ciertos procesos, que llevan a mantener el funcionamiento normal del sistema, que si se ve alterado cuando la dieta se mantiene 15 días, donde hubo un aumento general de DA en SN y estriado y de su tasa de recambio (Castaño y col., 1993b).

RESULTADOS

TABLA R6. EFECTO DE UNA DIETA DEFICIENTE EN VITAMINA E DURANTE 30 DÍAS EN DOPAMINA Y SUS METABOLITOS EN SUSTANCIA NIGRA Y ESTRIADO.

	Estriado		Sustantia nigra	
	CONTROL	<u>30 DÍAS</u>	<u>CONTROL</u>	<u>30DIAS</u>
DA	10051.0 ± 639.1	9084.0 ± 615.4	452.7 ± 134.2	309.7 ± 70.7
DOPAC	886.2 ± 94.0	858.8 ± 111.0	81.6 ± 28.8	57.4 ± 8.5
3-MT	406.5 ± 30.3	367.6 ± 40.4	32.0 ± 7.0	27.7 ± 9.6
HVA	472.8 ± 94.3	553.8 ± 90.1	46.3 ± 3.7	34.8 ± 10.4

Cada valor es la media ± S.D. de seis animales por grupo. Los resultados se expresan en ng/g de tejido humedo. Significación estadística (test *t* de Student) **p* < 0,05.

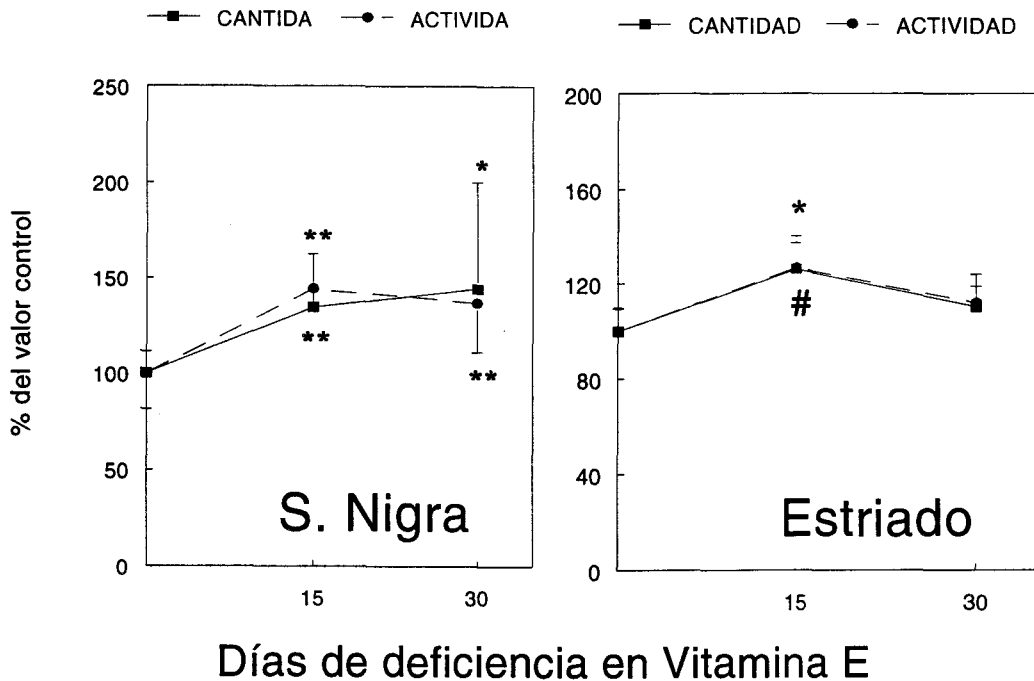
R.3.2. Contenido y actividad de tirosina hidroxilasa.

La dieta pobre en vitamina E mantenida durante 15 días supuso una elevación en los niveles de la actividad de la enzima TH en SN (+44%) como en el estriado (+26%) lo cual correlaciona con el aumento de los niveles de DA que se encontraron en ambas regiones. De forma paralela estos incrementos fueron acompañados por elevaciones respectivas en la cantidad de proteína presente en SN (+35%) y en el estriado (+27%) (Fig. R10).

Cuando prolongamos la deficiencia hasta un mes, los niveles de la cantidad y la actividad de la enzima permanecen elevados en SN (+44% y +37% respectivamente), aunque en el estriado ambos parámetros vuelven al nivel control tras este periodo de dieta (Fig. R10).

RESULTADOS

FIGURA R10. CANTIDAD Y ACTIVIDAD DE TIROSINA HIDROXILASA EN SUSTANCIA NIGRA Y ESTRIADO EN RATAS ALIMENTADAS CON UNA DIETA DEFICIENTE EN VITAMINA E DURANTE 15 Y 30 DÍAS.



La actividad de TH se midió *in vitro* y el contenido se calculó por Western blotting, tal como se describe en Material y Metodos. Los resultados se expresan como porcentaje del valor control, nmol de DOPA formdo/ mg de proteína/ hora para la actividad de TH y Unidades de Densidad Optica por banda para la cantidad de TH. Significación estadística (test *t* de Student) * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y # $p=0$.

R.3.3. Medida de los niveles de mRNA de la enzima Tirosina Hidroxilasa y del Transportador de Dopamina.

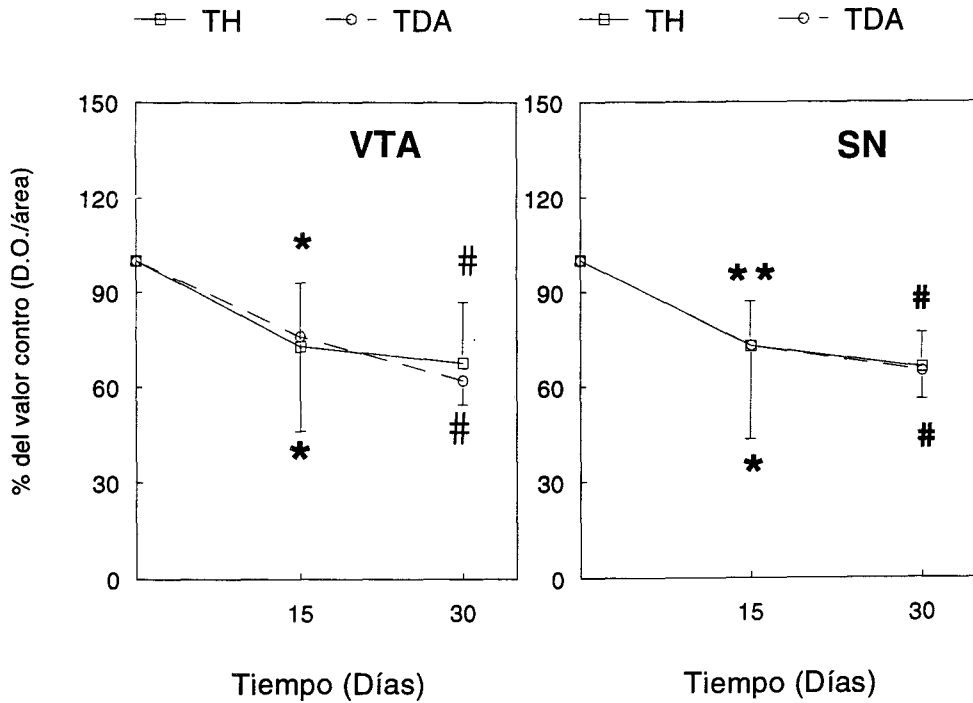
Los análisis de hibridación *in situ* en los animales con una dieta deficiente en Vitamina E durante 15 y 30 días, con la sonda antisentido del ARNm de las proteína TH y DAT mostraron una unión específica en el mesencéfalo ventral (Fig. R13 y R14). La disposición típica del agrupamiento de los granos de plata sobre los cuerpos celulares y la localización precisa de estas neuronas en la SNc y en el AVT, indicaron claramente las células que expresaban los ARNm de TH y TDA eran neuronas dopaminérgicas.

El análisis de la medida de densidad óptica por neurona, revelo una disminución significativa del ARNm de TH en las neuronas dopaminérgicas de la SNc (-26,9%) y en el AVT (-27%) tras 15 días de dieta sin vitamina E. Junto con esta disminución observamos también un descenso en la medida del ARNm del TDA en ambas regiones: SNc (-24%) y AVT (-27%) (Fig. R11).

Esta disminución continuó tras el mes de dieta, siendo entonces más marcada y su análisis estadístico dio significancias iguales a cero o muy bajas (<0,002). El mensajero de TH en SNc bajo un -34% y en el AVT un -32% en las ratas de la dieta de 15 días de duración. El ARNm del transportador disminuyó un 35% en SNc y hasta un -38% en el AVT (Fig. R11).

RESULTADOS

FIGURA R11. CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL ARNm DE TH Y DE TDA EN LA SNC Y AVT DE RATAS ALIMENTADAS CON UNA DIETA DEFICIENTE EN VITAMINA E DURANTE 15 Y 30 DÍAS.

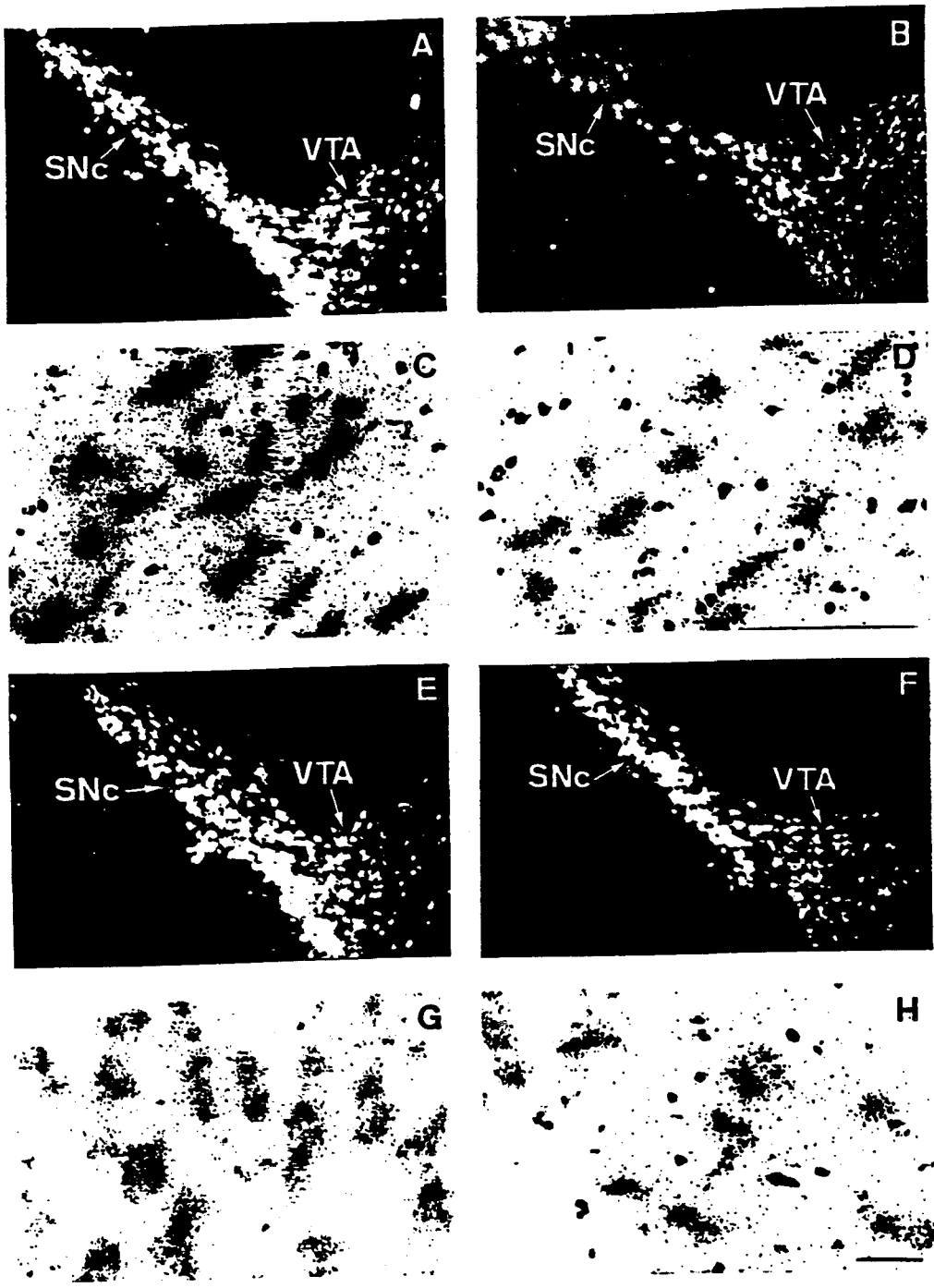


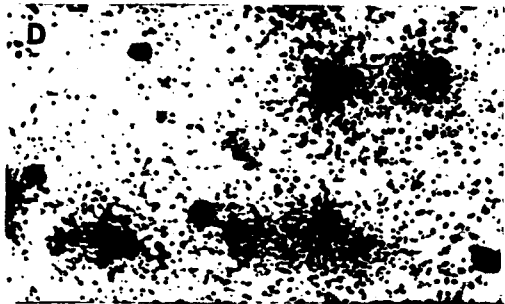
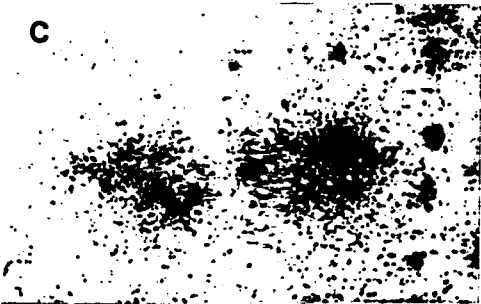
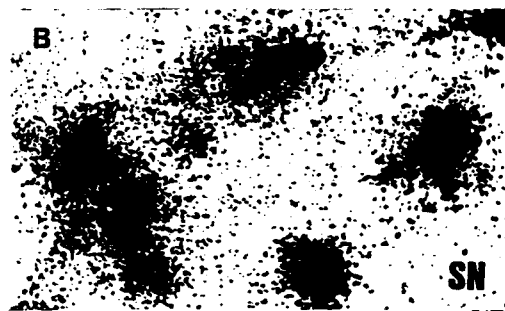
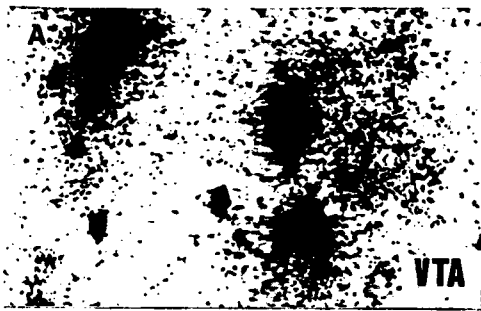
Los resultados se expresan como porcentaje del valor control, en unidades de Densidad óptica/área medida en el film autorradiográfico. Significación estadística (test *t* de Student pareado) * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Figura R.12. Emulsiones autorradiográficas mostrando la expresión de ARNm del TDA (A, B, C y D) y TH (E, F, G y H) en el mesencéfalo ventral de animales controles (A, C, E y G) y animales alimentados durante 30 días con una dieta deficiente en Vitamina E (B, D, F y H). (A, B, E y F) Fotografías a baja magnificación mostrando la expresión del ARNm del TDA (A y B) y del ARNm de TH (E and F) en sustancia nigra parte compacta (SNc) y el área ventral tegmental (VTA). (C, D, G y H) fotografía alta magnificación en campo claro de la SN. Obsérvese la baja expresión del ARNm del TDA y de la TH en los cuerpos celulares dopaminérgicos en el mesencéfalo ventral tras 30 días de deficiencia en vitamina E. Escala (A, B, E y F) 150 μ m; (C, D, G y H) 20 μ m (Pagina 104).

Figura R.13. Disminución en la expresión del ARNm de TDA en el Área Ventral Tegmental (VTA) y Sustancia Nigra parte compacta (SNc) tras la dieta deficiente en Vitamina E. Emulsión autorradiográfica mostrando la expresión del ARNm del TDA en el VTA (A, C y E) y SN (B, D y F). Fotografía a alta magnificación en campo claro del control (A y B) animales con 15 días de deficiencia en vitamina E (C y D) y con 30 días de deficiencia en vitamina E (E y F). Obsérvese que la expresión del ARNm decrece con el tiempo en ambas áreas debido a la deficiencia en Vitamina E. La expresión del ARNm de la TH en SNc y VTA mostró un patrón idéntico. Escala 20 μ m (Pagina 105).

RESULTADOS



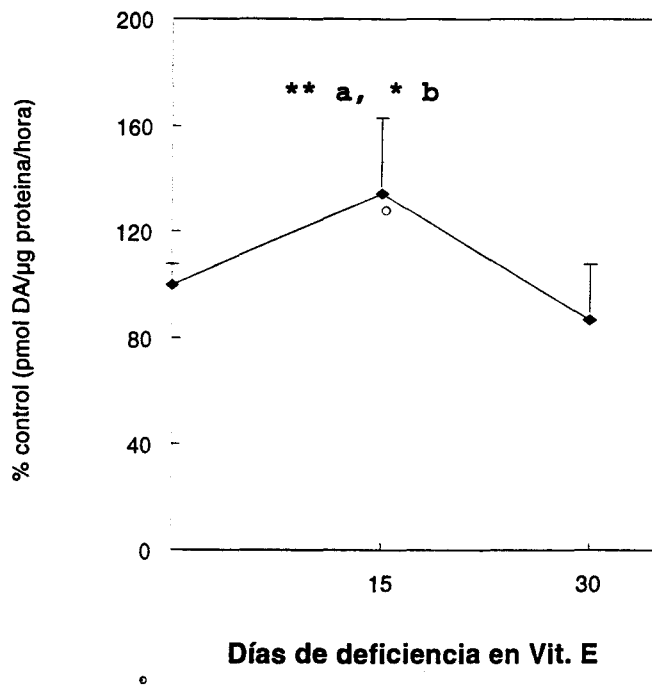


R.3.4. Medida del funcionamiento del transportador de DA.

Con el fin de clarificar si los cambios del mensajero produjeron cambios en el funcionamiento del transportador, medimos la capacidad de recaptación de los sinaptosomas procedentes de los estriados de las ratas sometidas a la dieta pobre en Vitamina E comparándola con la de las controles.

Los modelos *in vitro* de terminales nerviosas procedentes de las ratas sometidas a la dieta durante un periodo de 15 días, mostraron un aumento en la capacidad de recaptación de DA (+34%), en cambio los sinaptosomas de las ratas alimentadas durante un mes con esta dieta, mostraron la misma capacidad de recaptación que las ratas controles (Fig. R14).

FIGURA R14. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD DEL TRANSPORTADOR DE DOPAMINA EN RATAS ALIMENTADAS CON UNA DIETA DEFICIENTE EN VITAMINA E DURANTE 15 Y 30 DÍAS.



La actividad del TDA se midió *in vitro* calculando la recaptación de DA marcada en sinaptosomas. Los resultados se expresan como porcentaje del valor control, pmol DA/μg de proteína/ hora. Cada valor es la media ± S.D. de seis animales por grupo. Significación estadística (test *t* de Student) **p* < 0,05, ***p* < 0,01; (a) con respecto al control y (b) con respecto a los animales de 30 días.

RESULTADOS

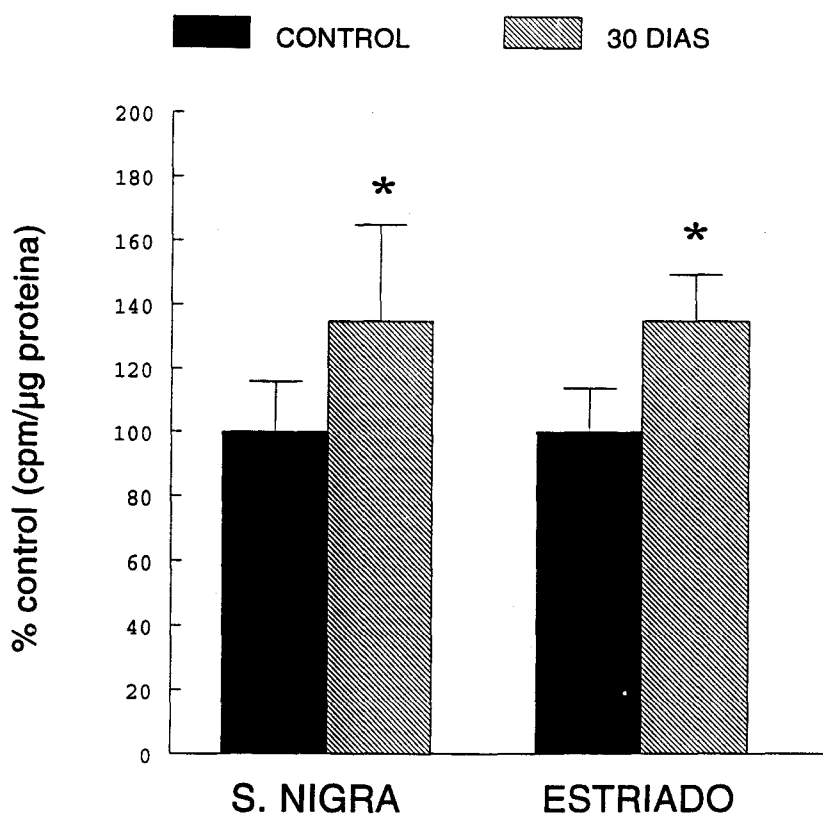
R.3.5. Medida de los grupos carbonilos.

Tras observar que los cambios más profundos en los mensajeros se encontraron en las ratas sometidas a la dieta pobre en Vitamina E durante un mes, y debido al importante papel de la Vitamina E como obstaculizador de la reacción en cadena de la peroxidación lipídica. Decidimos estudiar si la falta de este antioxidante afectaba al estado redox de la vía nigro-estriada.

La dieta hizo que, debido presumiblemente, al estrés creado por la descompensación del sistema tocoferol-tocoferil se crease un ambiente redox que favoreció la oxidación de las proteínas con el consiguiente aumento de los grupos carbonilos.

En la SN el aumento observado fue de un 35% al igual que en el estriado los que nos podría hacer suponer que la importancia de este antioxidante en ambas áreas es comparable.

FIGURA R15. CUANTIFICACIÓN DE LOS GRUPOS CARBONILOS EN RATAS ALIMENTADAS CON UNA DIETA DEFICIENTE EN VITAMINA E DURANTE 15 Y 30 DÍAS.



Cada valor es la media \pm S.D. de seis animales por grupo. Los resultados se expresan en cpm/ μ g proteína. Significación estadística (test *t* de Student) **p* < 0,05.

RESULTADOS

R.3.6. Microdiálisis.

Debido a que en las ratas sometidas a un mes de dieta, la medida *in vitro* no observamos cambio alguno en el funcionamiento del transportador, y teniendo en cuenta que las medidas *in vitro* no reflejan fielmente la intrincada regulación polisináptica de las terminales dopaminérgicas en el estriado, decidimos medir el funcionamiento de este transportador mediante microdiálisis.

R.3.6.a- Valores basales extracelulares de DA y sus metabolitos.

Los valores basales de DA eran significativamente mayores en el estriado de las ratas sometidas a la dieta sin vitamina E (+50%). Este aumento se vio acompañado por una disminución general de los niveles extracelulares de sus metabolitos: DOPAC (-36%) y HVA (-42%) (Tabla R7). Teniendo en cuenta que los niveles de DOPAC, son un reflejo de la disponibilidad de DA en el espacio intraneuronal, la disminución del mismo, supone una disminución de la recaptación de la DA. Además como ya hemos mencionado, es el responsable principal de la permanencia, y por lo tanto de la cantidad de DA en el espacio sináptico es el transportador de DA.

TABLA R7. CONCENTRACIONES BASALES EXTRACELULARES DE DOPAMINA Y SUS METABOLITOS EN ESTRIADO DE RATAS ALIMENTADAS DURANTE UN MES CON UNA DIETA DEFICIENTE EN VITAMINA E.

	CONTROL	30 DAYS
DA	11.07 ± 2.59	16.63 ± 2.1 *
DOPAC	1268.2 ± 331	810.6 ± 127 *
HVA	849.0 ± 214	490.3 ± 149 *

Cada valor es la media ± S.D. de cinco animales por grupo. Los resultados se expresan en fmol/min de tejido humedo. Significación estadística (test *t* de Student) **p* < 0,05.

RESULTADOS

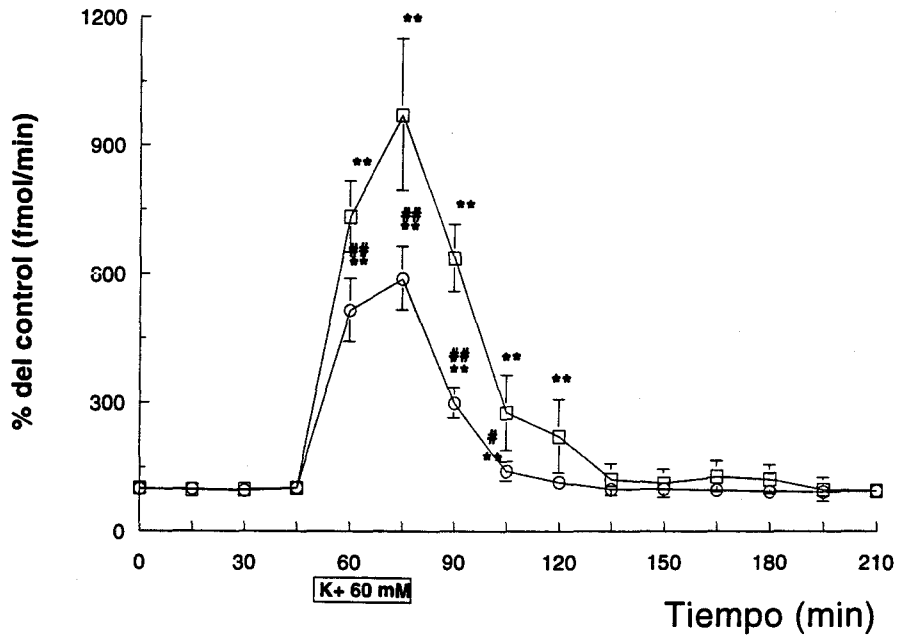
R.3.6.b- Efecto de la perfusion de KCl en el estriado de las ratas tras un mes de dieta.

La perfusión de una concentración de 60mM de KCl durante 30 min, produjo un aumento de los niveles extracelulares de DA menor en los animales sometidos a la dieta (+489%) comparado con el que produjeron los animales controles (+871%), expresando estos valores como porcentaje de los basales de DA (Fig. R16).

R.3.6.c- Efecto de la perfusión de nomifensina en el estriado de las ratas alimentadas durante un mes con la dieta pobre en Vit E.

La adición de valores crecientes de nomifensina (1, 10 y 50 mM), produjeron aumentos significativos y de igual intensidad en ambos grupos.

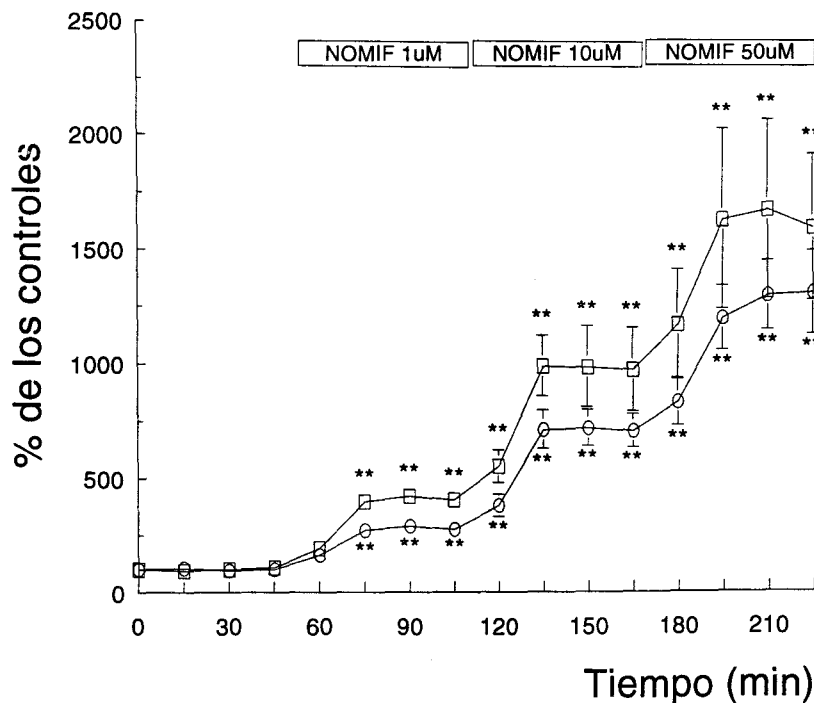
FIGURA R16. EFECTO DE LA PERFUSIÓN DE 60 mM KCL EN LOS NIVELES EXTRACELULAR DE DA EN RATAS CONTROL Y 30-DIAS DEFICIENTE EN VITAMINA E.



Los resultados se expresan como porcentaje del valor control (ratas control () y 30-días deficiente en Vitamina E (o). Cada valor es la media \pm S.D. de seis animales por grupo. Significación estadística (test de Kruskal-Wallis seguido del de Mann-Whitney U-test). ## P<0.01, comparando control y vitamina E recogido al mismo tiempo de perfusión y** P<0.01, comparado con el valor basal.

RESULTADOS

FIGURA R17. EFECTO DE LA PERFUSIÓN DE NOMIFENSINA A DISTINTAS CONCENTRACIONES (1, 10 Y 50 μ M) EN LA LIBERACIÓN EXTRACELULAR DE DOPAMINA DE LAS RATAS ALIMENTADAS DURANTE UN MES CON LA DIETA POBRE EN VIT E.



Los resultados se expresan como porcentaje (fmol/min) del valor control (ratas control () y 30-días deficiente en Vitamina E (o)). Cada valor es la media \pm S.D. de cinco animales por grupo. Significación estadística (test de Kruskal-Wallis seguido del de Mann-Whitney U-test), ** P<0.01, comparado con el valor basal.

R.4. RESULTADOS DE LA DIETA POBRE EN VITAMINA C.

R.4.1. Peso de los animales y concentración de Acido Ascórbico y Dehidroascórbico.

Los signos de deficiencia en vitamina C en las cobayas dependen de muchos factores, como tipo y composición de la dieta experimental, edad, factores de estrés externos, etc. La debilidad, laxitud y anorexia conllevan una disminución en el peso del animal que junto con las hemorragias preceden a la muerte del mismo. Para comprobar que nos encontramos en condiciones escorbútcas, pesamos regularmente a nuestros animales y medimos los niveles de AA y DHAA en el cerebro para comprobar que la dieta deficiente en vitamina C es la manera más efectiva de reducir los niveles cerebrales de vitamina C. Un día antes de matar los animales el peso de los experimentales era significativamente más bajo que los controles (-30%).

Como vemos en la Tabla R8 la dieta experimental ha reducido significativamente los niveles de AA en comparación con los alimentados con la dieta control tanto en estriado (-71%), como en SN (-76%). Además los niveles de DHAA, principal metabolito del AA, también están disminuidos en los animales alimentados con la dieta pobre en vitamina C tanto en el cuerpo dopaminérgico (-47%) como en la terminal (-46%).

RESULTADOS

TABLA R8. CONCENTRACIÓN DE AA, DHAA EN SUSTANCIA NIGRA Y ESTRIADO DE COBAYAS ALIMENTADAS DURANTE UN MES CON UNA DIETA POBRE EN VITAMINA C.

	SUSTANCIA NIGRA		ESTRIADO	
	<u>CONTROL</u>	<u>SIN VIT. C</u>	<u>CONTROL</u>	<u>SIN VIT. C</u>
AA	320.6 ± 72.8	92.8 ± 17.8 **	291.3 ± 76.3	72.5 ± 31.4**
DHAA	403.0 ± 74.4	216.8 ± 33.2**	194.2 ± 46.9	102.0 ± 26.4*

Cada valor es la media ± S.D. de seis animales por grupo. Los resultados se expresan en ng/g de tejido humedo. Significación estadística (ANOVA seguido de un Test Scheffe) *p < 0,05, **p < 0,01.

R.4.2. Concentración de DA y sus metabolitos en la vía nigro-estriatal.

Tras un mes de dieta pobre en Vitamina C no hubo cambios significativos en los niveles de dopamina en el estriado entre el grupo control y el deficiente en vitamina C (Tabla R9). En cambio hubo una disminución en los niveles del DOPAC al comparar con los animales controles (-35%) y con los animales con una dieta suplementada en vitamina C (-31,5%). Esta observación puede interpretarse como una disminución intraneuronal de la tasa de recambio de DA, como lo refleja la disminución de la razón DOPAC/DA.

RESULTADOS

TABLA R9. CONCENTRACION DE DOPAMINA Y SUS METABOLITOS EN ESTRIADOS DE COBAYAS ALIMENTADAS DURANTE 30 DÍAS CON UNA DIETA CONTROL, UNA DIETA SIN VITAMINA C Y UNA CON SUPLEMENTO EN VITAMINA C.

	CONTROL	SIN VIT. C	SUPLEMENTADA
DA	8853.4 ± 956.9	9182.0 ± 396.9	10168.5 ± 956.7
DOPAC	1156.0 ± 197.6	750.6 ± 123.2 ^{*a}	1096.7 ± 160.4 ^{*b}
HVA	1476.0 ± 305.9	1352.6 ± 128.5	1633.7 ± 220.5
3MT	149.1 ± 28.0	159.1 ± 41.0	140.1 ± 46.7
DOPAC/DA	0.12 ± 0.01	0.08 ± 0.02 ^{**a}	0.11 ± 0.0 ^{*b}

Los resultados se expresan como la media en ng/g de tejido ± D.S. para n=6. Sometidos a un test de Kruskal-Wallis seguido de un Mann-Whitney U-test considerando estadísticamente significativo si ^{**}p<0.01 y ^{*}p<0,05 comparando con a: la dieta control y b:la dieta sin vitamina C.

En la región del cuerpo celular en cambio, los análisis neuroquímicos, fueron distintos. Los niveles de DA tampoco variaron pero hubo profundos cambios en los metabolitos con una disminución en el DOPAC (-57%) y en el HVA(-43%) y un aumento en el 3-MT (+76%). Lo que parece mostrar un aumento en el metabolismo extraneuronal (glial) que corrobora la disminución del metabolismo intraneuronal.

TABLA R10. CONCENTRACIÓN DE DA Y SUS METABOLITOS EN SUSTANCIA NIGRA DE COBAYAS ALIMENTADAS DURANTE UN MES CON UNA DIETA CARENTE EN VITAMINA C.

	CONTROL	SIN VIT. C
DA	610.4 ± 163.9	608.1 ± 183.2
DOPAC	152.4 ± 44.8	64.9 ± 7.6 **
3-MT	46.6 ± 9.9	82.2 ± 13.1 **
HVA	413.2 ± 127.1	233.8 ± 35.6 *

Los resultados se expresan en ng/g tejido humedo como la media ± D.S. para n (numero de animales usados) =5. Significación estadística mediante un test de t-Student: ** p<0.01 y * p<0.05 al comparar con el grupo control.

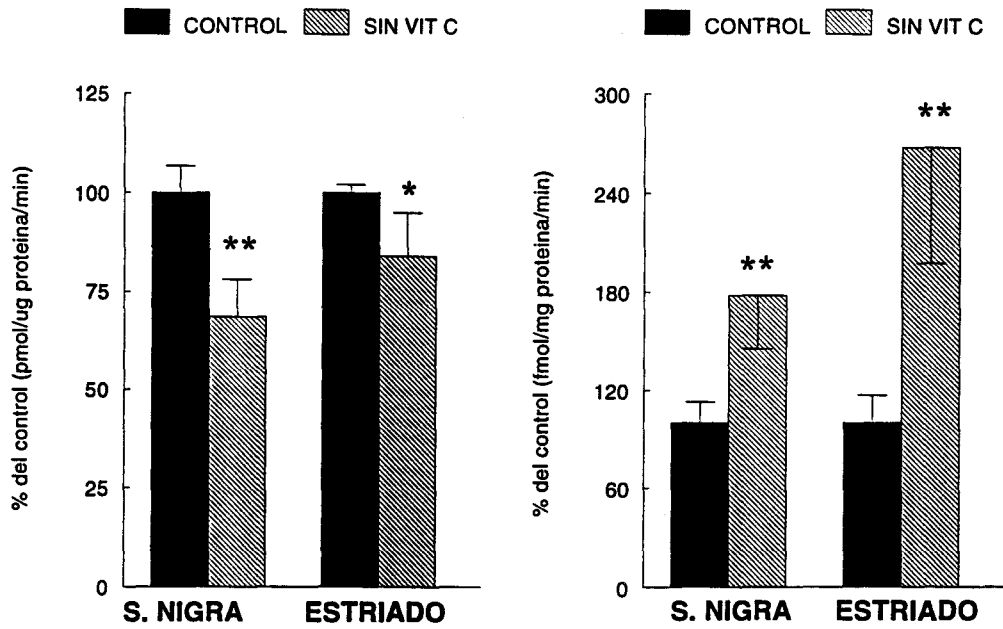
R.4. 3. Medida de las enzimas Monoamino Oxidasa A y B.

Como vemos en la figura (R18) la disminución de los niveles de vitamina C provocó un aumento muy significativo en la actividad de la enzima MAO B tanto en estriado (+167%) como en SN (+77%). En cambio, la actividad de la otra isoenzima, la MAO A, disminuyó ligeramente en estriado (-16%) y sufrió también una caída, aunque más importante en la SN (-31%). Estos cambios corroboran las diferencias en los niveles de los metabolitos dopaminérgicos encontrados en ambas zonas, ya que son reveladores de un aumento del metabolismo extraneuronal de la DA (glial) y una disminución del intraneuronal.

R.4.4. Medida de la actividad de Tirosina Hidroxilasa.

No hay cambios significativos en la actividad de la enzima tirosina hidroxilasa tras el mes de dieta pobre en vitamina C en ninguna de las áreas que estamos estudiando, lo cual indica que en principio el sistema es capaz de mantener los niveles de DA con cambios a nivel del catabolismo, sin variar la velocidad de síntesis.

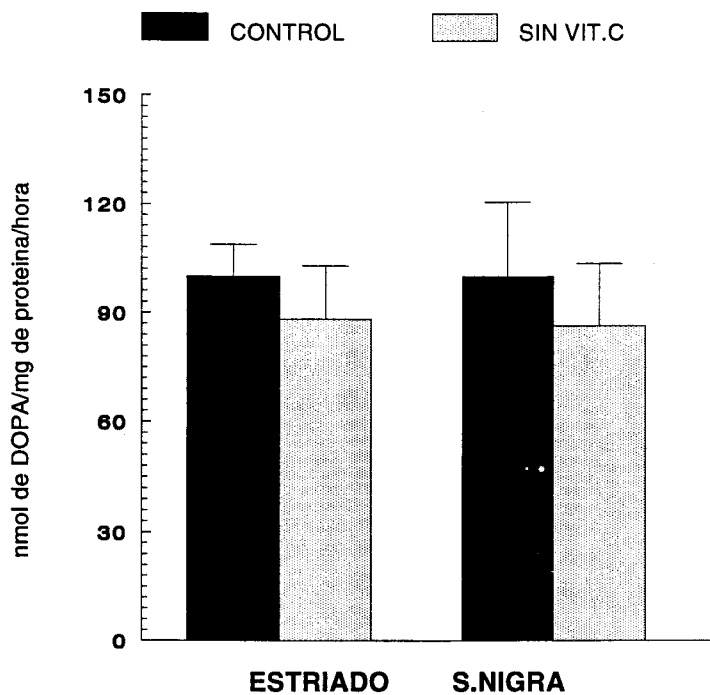
TABLA R18 . ACTIVIDAD DE LAS MAO A Y B EN SUSTANCIA NIGRA Y ESTRIADO DE COBAYAS ALIMENTADAS DURANTE UN MES CON UNA DIETA CARENTE EN VITAMINA C.



La actividad de las MAO A y B se midieron *in vitro*. Los resultados se expresan como porcentaje del valor control para un numero de animales n=6. Significación estadística (test t de Student) *p < 0,05, **p < 0,01.

RESULTADOS

FIGURA R19. ACTIVIDAD DE TIROSINA HIDROXILASA EN SUSTANTIA NIGRA Y ESTRIADO COBAYAS ALIMENTADAS DURANTE UN MES CON UNA DIETA CARENTE EN VITAMINA C.



Los resultados se expresan nmol de DOPA formado/ mg de proteína/ hora para la actividad como la media \pm D.S. para n (numero de animales usados) =6. Significación estadística (test *t* de Student) * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

R.4.5. Medida de la toxicidad de MPP+ en cobayas escorbúticas y con un suplemento en la dieta de Vitamina C.

Asumimos que si la liberación masiva de DA extracelular es un índice de desajuste celular, la medida de la DA remanente en el tejido tras el tratamiento con MPP+, es un indicador de toxicidad de dicho compuesto. La incubación del tejido estriatal con una con 25 μ M MPP+ de cobayas controles y de cobayas con un suplemento vitamínico en la dieta, exhibieron idénticos efectos neurotóxicos en base a la cantidad de DA remanente. Las cobayas escorbúticas y las suplementadas con Vit. C mostraron niveles de DA idénticos a los de las cobayas controles tras la incubación en tampón Krebs sin MPP+ . Sin embargo, cuando el MPP+ está presente en el medio de incubación observamos la DA disminuyó significativamente en todos los animales experimentales: los deficientes en Vit. C (-37%), los suplementados con Vit. C(-60%) y los controles (-54%) Tabla R11. El análisis estadístico, demostró que en el tejido de animales deficientes en Vit. C, que fueron los que mostraron el menor descenso en DA tras la incubación con MPP+, los niveles neuroquímicos eran estadísticamente diferentes comparando con controles y con los animales suplementados con Vit. C incubados en idénticas condiciones. Por lo que podemos deducir que la acción neurotóxica del MPP+ en tejido estriatal de los animales deficientes en Vit. C fue significativamente menor que la ejercida sobre los tejidos de animales controles y los suplementados con Vit. C. En relación con los metabolitos dopaminérgicos, el DOPAC experimentó una bajada idéntica en todas las condiciones experimentales (-81% par controles, -81% para los deficientes en Vit. C y -80% para los suplementados) mientras que los niveles de HVA permanecieron inalterados.

o

TABLA R.11. CONCENTRACION DE DA Y SUS METABOLITOS EN TEJIDOS DE COBAYAS TRAS INCUBACION CON MPP⁺ EN ANIMALES ALIMENTADOS DURANTE 30 DIAS CON UNA DIETA CONTROL, SIN VITAMINA C Y CON SUPLEMENTO EN VITAMINA C.

	CONTROL		SIN VIT. C		SUPLEMENTADA	
	CONTROL	MPP ⁺	CONTROL	MPP ⁺	CONTROL	MPP ⁺
DA	49.6 ± 6.7	19.8 ± 7.0 ^{**a}	54.1 ± 7.8	34.3 ± 5.9 ^{**a, *b}	47.1 ± 5.6	21.6 ± 4.8 ^{**a, **c}
DOPAC	5.9 ± 0.9	1.1 ± 0.3 ^{**a}	6.9 ± 1.2	1.2 ± 0.2 ^{**a}	6.6 ± 1.2	1.3 ± 0.3 ^{**a}
HVA	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.3	0.5 ± 0.2	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1

Los resultados se expresan en ng/μg proteína como media ± D.S. para n (numero de animales procesados) =6-7. Analisis estadístico: Kruskal-Wallis seguido de un Mann-Whitney U-test: *p<0.05., **p<0.01. a: comparando con el control correspondiente, b: comparando con el tejido de la dieta control con MPP⁺, c: comparando con el tejido de cobayas escorbúticas con MPP⁺, d: comparando con el valor de los animales con dieta control sin MPP⁺, e: comparando con el valor de los animales con dieta sin vitamina C sin MPP⁺. ND = No Detectable.

R.4.6. Medida de los aminoácidos en estriado.

Tras los estudios de toxicidad del MPP+, y con el fin de encontrar una explicación a los resultados obtenidos, quisimos medir los niveles de aminoácidos, teniendo en cuenta el papel de aminoácidos excitatorios en la neurotoxicidad del MPP+ (Tabla R12). El análisis estadístico reveló que el estriado de los animales deficientes en vitamina C mostraron cambios significativos, siempre aumentando, en los niveles de dos aminoácidos muy importantes y que actúan como neurotransmisores en el cerebro: el ácido glutámico aumentó en un 31% y el GABA que lo hizo en un 28% con respecto a los controles. También los niveles de arginina, aminoácido implicado en la síntesis del neurotransmisor óxido nítrico, se elevaron en ausencia de vitamina C en un 107%. Pero ninguno de estos cambios parece clarificar la menor toxicidad del MPP+ en los animales deficientes en Vit. C.

RESULTADOS

TABLA R12. NIVELES DE AMINOACIDOS EN ESTRIADO DE COBAYA ALIMENTADAS CON UNA DIETA CONTROL Y UNA SIN VITAMINA C DURANTE 30 DIAS.

AMINO ACIDOS	CONTROL	SIN VIT. C
ACIDO ASPARTICO	1.83 ± 0.03	2.26 ± 0.72
ACIDO GLUTAMICO	7.27 ± 1.38	9.52 ± 0.48 *
SERINA	2.04 ± 0.70	2.89 ± 1.84
GLUTAMINA	3.57 ± 0.50	4.13 ± 0.58
GLICINA	5.00 ± 2.00	3.99 ± 1.76
TREONINA	1.04 ± 0.30	1.53 ± 0.92
TAURINA	2.22 ± 0.40	2.60 ± 0.22
ARGININA	0.41 ± 0.05	0.85 ± 0.27 *
ALANINA	1.18 ± 0.22	1.62 ± 0.89
GABA	1.85 ± 0.21	2.37 ± 0.22 *
LEUCINA	1.59 ± 0.34	2.71 ± 1.06
LISINA	2.48 ± 1.06	1.48 ± 0.62

Los resultados se expresan como nmol/mg de tejido y representan la media ± D.S. para n (numero de animales usados)= 4-5. Sometidos a un test de ANOVA seguido de un test Scheffe considerando estadísticamente significativo si *p<0.05 comparando con la dieta control.

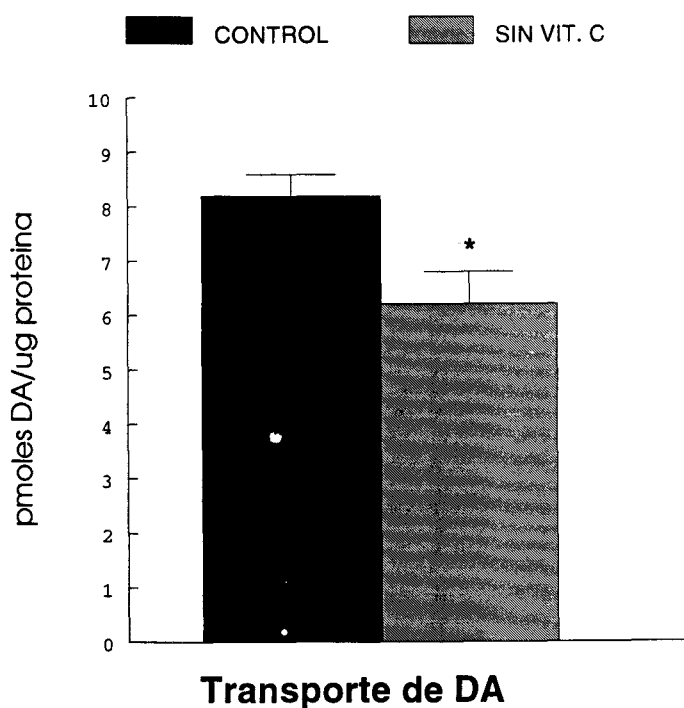
R.4.7. Medida de la recaptación de Dopamina.

La medida del funcionamiento del transportador de DA en sinaptosomas elaborados desde los estriados de cobayas escorbútcas, nos reveló una disminución de la actividad del mismo en los animales con los niveles cerebrales de vitamina C disminuidos por la dieta (-23,2%). Esto apoya los cambios a nivel del metabolismo dopaminérgico, ya que una disminución de la reparación neuronal supondría un cambio en los niveles de metabolismo intraneuronal y por consiguiente un aumento en la vía extraneuronal de degradación dopaminérgica (Fig. R20).

Por otra parte este cambio supone una explicación para la menor toxicidad del MPP+ en los animales deficientes en Vit. C, ya que como hemos dicho el MPP+ se acumula activamente en las terminales dopaminérgicas a través del transportador de DA. Al estar el funcionamiento de este transportador disminuido en estos animales, el MPP+ se acumula en menor medida en las terminales estriatales de los animales deficientes en Vit. C, siendo por lo tanto la neurotoxicidad en estos animales deficientes en Vit. C menor que en los controles, donde la acumulación es mayor.

RESULTADOS

FIGURA R20. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD DEL TRANSPORTADOR DE DOPAMINA EN COBAYAS ALIMENTADAS CON UNA DIETA DEFICIENTE EN VITAMINA C DURANTE 30 DÍAS.



La actividad del TDA se midió *in vitro* calculando la recaptación de DA marcada en sinaptosomas. Los resultados se expresan como pmol DA/ μ g de proteína/hora. Cada valor es la media \pm S.D. de seis animales por grupo. Significación estadística (test *t* de Student) * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

D.1. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA INHIBICION DE LA GLUTATIÓN PEROXIDASA MEDIANTE UNA DIETA DEFICIENTE EN SELENIO SOBRE EL FUNCIONAMIENTO DEL SISTEMA DOPAMINÉRGICO.

Previamente en nuestro laboratorio se ha estudiado que una deficiencia en selenio en la dieta durante 15 días es capaz de alterar el sistema GSH, reduciendo la actividad de GPx en estriado y SN (Castaño y col., 1993a). Este corto periodo de deficiencia fue capaz de reducir no solo la actividad GPx, sino también la de la enzima GR en el hipocampo (Castaño y col., 1995). Estas alteraciones de las enzimas del sistema GSH prueba la efectividad de nuestra dieta para alterar el sistema antioxidante en el cerebro. Una disminución de los niveles de GSH mediante la inhibición de su síntesis usando BSO, produjo una disminución de GR esto podría deberse al efecto de los radicales libres como el ONOO- los cuales son capaces de inhibir directamente la enzima, aunque también puede deberse a la disminución de formación de GSSG (Barker y col., 1996). Por lo tanto podríamos decir que la inhibición de GPx genera un estrés oxidativo el cual desequilibra aún más el sistema GSH/GPx/GR system.

Nuestros experimentos probaron que la deficiencia de selenio es capaz de alterar el sistema dopaminérgico, así la tasa de recambio dopaminérgico se vio aumentada tras 15 días de dieta, lo cual se ve corroborado por el aumento general en los niveles neuroquímicos en la región del cuerpo celular, estos cambios son más profundos tras un mes de dieta deficiente en selenio (Castaño y col., 1993a). Estos cambios a nivel del cuerpo celular podrían haberse desarrollado para preservar el funcionamiento de la terminal dopaminérgica, ya que el estriado no muestra un aumento en la tasa de recambio dopaminérgica, con cambios significativos pero no muy profundos

DISCUSION

en los niveles neuroquimicos, siendo el unico cambio medible tras 30 dias el aumento en los niveles de DA (Castaño y col., 1993a).

El aumento del mRNA TDA y de la capacidad de recaptacion medida en sinaptosomas estriatales en el grupo de animales con una dieta de 15 dias, podria contribuir a los cambios neuroquimicos en SN y estriado. Este aumento en la actividad del transportador podria elevar el aclaramiento de DA extracelular, con el consiguiente incremento de los niveles de DA intracelulares (en SN y estriado); esto ademas podria potenciar el aumento de turnover observado en SN y ademas alterar los niveles de metabolitos dopaminérgicos. Esto corrobora nuestros estudios previos con nomifensina, inhibidor de la recaptacion de DA, el cual fue capaz de disminuir la tasa de recambio dopaminérgico (Rodriguez-Gomez y col., 1997).

Ambos parametros, mensajero y actividad del TDA en sinaptosomas, volvieron a los niveles controles tras prolongar hasta un mes la dieta. Lo cual sugiere que la expresion se regula en primer lugar a la alza para mantener los niveles intra/extracelulares de DA, siendo mas tarde regulada a la baja por diferentes mecanismos como por ejemplo los receptores dopaminérgicos, los cuales se saben que controlan la sintesis y el metabolismo de DA en estriado y estructuras mesolimbicas (Zetterström y col., 1993) (Imperato y Chiara, 1985).

La expresion de mRNA de TH se vio incrementada (19%) a los 15 dias de deficiencia dietetica de selenio, y este aumento fue más importante y estadisticamente mas significativo al prolongar esta deficiencia hasta 30 dias (47%), lo cual sugiere que los cambios producidos por la deficiencia de Se estan implicados en la induccion de TH.

Los cambios del contenido y la actividad de la enzima TH están retrasado con respecto a los cambios del mensajero, incluso parece haber un ligero descenso en la actividad de la enzima en SN en el grupo de 15 días, esto podría ser una consecuencia de un daño sufrido por la enzima debido al estrés oxidativo generado como consecuencia de la disminución en GPx, se ha probado además que las quinonas formadas por oxidación de DA en circunstancias de una elevada generación de radicales libres, son capaces de unirse a la TH e inactivarla (Xu et al 1998 CITA DE BUSQUEDA).

De cualquier forma cambios en mRNA son más rápidos que los cambios en el contenido proteico, Baruchin y col., mostraron un desacoplamiento entre mRNA y contenido de TH en ratas expuestas a estrés de frío, estando el mRNA 3- veces elevado a las 3 horas, mientras que los cambios en proteínas no son visibles hasta 2 o 3 días después (Baruchin y col., 1990). También con reserpina se encontró un rápido aumento de mRNA de la TH en el locus coeruleus y la médula adrenal que precedió cambios equivalentes de la cantidad de TH a las 12 o 72 horas (Faucon-Biguet y col., 1986; Tank y col., 1985). Además este desacoplamiento entre mRNA y proteína TH podría ser debido a una rápida degradación de proteína inducida por un daño acelerado debido al estrés oxidativo generado en nuestros animales.

La enzima TH mostró perfiles de cambio diferente en SN y en estriado: así en la región de los cuerpos neuronales, es decir en la SN, la actividad y cantidad no se ve elevada hasta el día 30 pudiéndose ver incluso una ligera disminución en la actividad de la enzima a los 15 días. En estriado en cambio los cambios a la alza se observan desde el día 15, aunque el aumento en actividad y cantidad de la enzima no son significativos hasta que la dieta no se prolonga hasta un mes. Este aumento en el mensajero y la proteína de TH puede ser la causa de la elevación en los niveles de DA observados en ambas estructuras. Además esto está en consonancia con los resultados

DISCUSION

encontrados por el grupo de Mármol que han publicado que una falta de cysteina (la síntesis de GSH es directamente dependiente de este aminoácido) aumento la actividad de TH en células de melanoma humano, esto también ocurrió cuando los que se retiraba del medio era el GSH directamente (de Marmol y col., 1996; de Marmol y col., 1993).

La DA esta elevada en los dos grupos 15 y 30 días, al igual que en la SN esto podria deberse al aumento en la cantidad y actividad de la enzima TH aunque este aumento no fue significativo hasta el mes de dieta. Aunque la tendencia a la alza es clara desde el día 15. Ademas al igual que en la SN el aumento de la recaptacion podria contribuir al aumento en el contenido de DA.

Drucker y col (1996) probaron que el GSH esta implicado en el almacenamiento vesicular de DA en celulas de feocromocitoma PC12. La deficiencia de GSH por inhibicion de la sintesis mediante la L-buthionine-S,R-sulfoximine (BSO) condujo a una disminucion en el almacenamiento y a un aumento significativo del metabolismo de DA con un aumento de la tasa de recambio de la DA, lo cual esta en concordancia con nuestros resultados (Drukarch y col., 1996). La reduccion del almacenamiento vesicular de DA inducido por reserpina o alfa-meti-para-tirosina, podria conducir a un aumento en la cantidad de GSH , por lo tanto de manera opuesta una baja concentracion de GSH o una disminucion en la disponibilidad enzimatica del mismo, podria dejar el transporte vesicular de DA relativamente desprotegido frente al estress oxidativo, resultando esto en una disminucion del almacenamiento de DA. Estos cambios podrian conducir a la elevacion de la actividad y del mRNA transportador de DA como mecanismo desarrollado por la neurona para mantener el pool intracelular de DA. Todo ello supondria un aumento en la tasa de recambio de Da debido a la deficiencia de Se, contribuyendo de una manera muy importante al estress oxidativo. En este contexto creo importante destacar que se ha probado la generacion de estrés

oxidativo en neuronas dopaminérgicas tiene sobre tras interferir sobre el gradiente vesicular electroquímico (Cubells y col., 1994).

Por otra parte, se ha demostrado que la reserpina, que como hemos dicho afecta a la vesiculación de DA junto con los niveles de GSH, no es capaz solo de aumentar el recambio de DA sino que también es capaz de aumentar la expresión del mRNA de TH en las células dopaminérgicas del cerebro medio (Spina y Cohen, 1989; Passineti y col., 1990). Este efecto inductor de la expresión de mRNA TH que encontramos en nuestros animales podría ser la respuesta del sistema dopaminérgico a la disminución de la disponibilidad de DA, la cual está sufriendo un elevado metabolismo y probablemente oxidaciones, así como al posible descenso del pool de DA debido a la probable alteración del proceso de vesiculación de la DA como consecuencia de la alteración del sistema GSH.

Spencer y col. mostraron que en casos de estrés oxidativo, por ejemplo cuando alguna enzima antioxidante está comprometida, L-DOPA y DA están expuestos a un sistema generador de $O_2^{\cdot-}$, provocando una disminución de los niveles de GSH así como la formación de compuestos tioles DOPA (Spencer y col., 1998). Los iones de hierro y cobre podrían también promover la formación de conjugados entre GSH y DA y/o L-DOPA, especialmente si H_2O_2 está presente, como ocurre en nuestros animales donde el recambio dopaminérgico está aumentado y el GSH no es utilizado normalmente por su vía habitual (GPx-GR).

En la EP se han encontrado estos compuestos cisteínicos de L-DOPA, DA, DOPAC en SN, sugiriendo así una aceleración de los procesos de oxidación de L-DOPA/DA. Es también bien conocida la disminución de los niveles de GSH en la EP, lo cual podría ser consecuencia de la formación de estos productos o quizás la causa de esta aceleración en los procesos oxidativos. La importancia de estos subproductos de oxidación se ve muy

DISCUSION

apoyada por los trabajos recientes de Li y col. que probaron que la 5-S-cysteinil-DA es capaz de sufrir reacciones químicas que incluye conjugación con GSH, formando finalmente ácido 7-(2-aminoetil)-3,4-dihidro-5-hidroxi-2H-1,4-benzotiazina-3-carboxílico, el cual provoca la inhibición del complejo I, esto supondría la pérdida irreversible del GSH y la disminución de la actividad del complejo I mitocondrial, ambos fenómenos característicos de la EP (Li y col., 1998). Por lo tanto la formación de complejos GSH podría contribuir al desequilibrio en el sistema GSH/GPx, disminuyendo aun más los niveles de GSH.

La incubación de GSH con un sistema generador de O_2^- and H_2O_2 , como modelo de estrés oxidativo concerniente al SNC (Spencer y col., 1995; Halliwell, 1992), y a la EP en particular (Gotz y col., 1994; Jenner, 1994) produce solo un lento descenso de los niveles de GSH. Esto es esperable si tenemos en cuenta que el grupo tiol reacciona solo lentamente con los radicales libres como el O_2^- (Winterbourn y Metodiewa, 1988) y H_2O_2 (Auroma y Halliwell, 1989). Pero esta reacción está enormemente acelerada con niveles elevados de DA, tal como ocurre en nuestros animales, y todo esto produce una disminución de GSH y cisteína.

Podríamos decir que en nuestro modelo el desequilibrio del sistema GSH generado por la falta del selenio en la dieta, promueve una situación de estrés oxidativo alterando el metabolismo dopaminérgico, esta alteración provoca a su vez más estrés oxidativo. En una segunda línea, el estrés oxidativo y la elevación del recambio dopaminérgico induciría la formación de complejos GSH los cuales intensificarían el desequilibrio del sistema GSH disminuyendo los niveles de GSH. Además la inhibición de GPx provocaría una acumulación de GSH no utilizable que podría conducir a la inhibición de síntesis de GSH, por retroalimentación negativa sobre la *the gammam-*

glutamylcysteine synthetase debido a la acumulacion de GSH (para revision ver Cooper and Kristal 1997)(Cooper y Kristal, 1997).

Por otro parte se ha mostrado que disminuciones en los niveles de GSH debido a tratamientos con BSO tiene profundos consecuencias morfologicas pero no cambios bioquimicos en los niveles de DA y sus metabolitos (Andersen y col., 1996) pero debemos destacar que estos estudios son estudios agudos los cuales inducen una disminucion de GSH solos por 72 horas como el periodo mas largo. Por el contrario 28 dias de tratamiento con BSO intraventricular no causo degeneracion nigroestriatal (Toffa y col., 1997).. Sin embargo en nuestros animales la acumulacion de GSH no usado junto con el alto metabolismo dopaminérgico promoveria la formacion de complejos lo cual intensificaria las alteraciones del sistema por lo que podria justificarse el encontrar cambios neuroquimicos.

Asi que podríamos decir que hay una retroalimentacion positiva sobre el proceso de estrés oxidativo donde la inhibicion inicial de GPX generaria un estres oxidativo el cual intensificaria la produccion de radicales libres los cuales a su vez inhiben aun más la enzima. La regulacion del sistema GSH y la produccion de complejos cisteinicos disminuyen los niveles de GSH, todos estos procesos afectan la actividad de GR intensificando la inhibicion de ambas enzimas. Esta alteracion en la disponibilidad de los niveles utiles de GSH afecta al sistema dopaminérgico, probablemente afectando la vesiculacion de DA, elevando su disponibilidad para sufrir procesos de oxidacion y aumentando el recambio dopaminérgico. Todo ello promoveria e induciria cambios en el TDA dirigidos a mantener el pool intracelular de DA , pero contribuyendo de manera indirecta al estrés oxidativo. El sistema reacciona para preservar la transmision dopaminérgica en la terminal, induciendo el mRNA de TH y reduciendo el mRNA del TDA de nuevo a los niveles controles. Esta disminucion podria ser debida a la importancia del TDA

DISCUSION

en la regulacion y el mantenimiento de la transmision dopaminergica como se deduce de los estudios de los ratones knock-out del transportador (Giros y col., 1992; Giros y col., 1996). Esta regulacion tardia a la baja del TDA y la posible afeccion del transportador vesicular de DA esta apoyada por los estudios de Harrington et al., los cuales encontraron una disminucion en la abundancia celular de ambos transportadores en las celulas supervivientes del la SN de parkinsonianos lo cual podria reflejar cambios en la señal catecolaminergica, probablemente por una disfuncion neuronal, la cual podria ser consecuencia del deficit prolongado de GSH. (Harrington y col., 1996). Ademas la correlacion inversa entre Th y transportador de monoaminas tambien ha sido descrita anteriormente por Shores y col, que encontraron un adisminucion en el mRNA del transportador de norepinephrine en el locus ceruleus en ratas de mediana edad, como primera respuesta a una perdida celular y un aumento del mensajero de TH cuando el envejecimiento esta mas avanzado y la perdida neuronal es mas importante (Shores y col., 1999). Tomando todos estos resultados, nuestro estudio sugiere que la alteracion del sistema GSH/GPx genera un desequilibrio en la homeostasia antioxidantes/prooxidantes lo cual promueve diferentes cambios en el sistema dopaminérgico incluyendo un primera respuesta rapida aumentando el mRNA y la actividad del TDA y una respuesta tardia aumentando la expresion de TH, todos estos cambios contribuyen al estress oxidativo en la SN, lo cual que podria conducir finalmente a neurotoxicidad y neurodegeneracion.

D.2. EFECTO DE LA INHIBICION DE LA GLUTATIÓN REDUCTASA MEDIANTE TRATAMIENTO CON BCNU SOBRE EL SISTEMA DOPAMINÉRGICO.

El efecto del tratamiento de BCNU sobre el status antioxidante del sistema nigro-estriatal se evaluo midiendo la actividad de la enzima GR, comprobamos pues que esta se vio disminuida un -89% en el estriado y un -

75% en la Sn. Por lo tanto el efecto del BCNU corrobora su ya descrito efecto farmacológico, disminuyendo consecuentemente la capacidad antioxidante del sistema GPx/GR (Buckman y col., 1993), provocando así un desequilibrio de la homeostasis de GSH

Al igual que en la dieta pobre en Se, el tratamiento de BCNU dio lugar a un aumento de los niveles de DA en el estriado, aunque en este caso el DOPAC disminuye significativamente en este área, mostrando en general una disminución del funcionamiento del sistema dopaminérgico en la terminal, con una disminución en la liberación y el metabolismo de DA.

En cambio en la SN ocurre lo contrario, con niveles menores de DA y razones elevadas de 3MT/DA y HVA/DA que ponen de manifiesto un aumento en la tasa de recambio de DA como ocurre en la SN de los animales alimentados con una dieta deficiente en selenio. Este oposición en el funcionamiento de estas dos áreas ya ha sido descrito anteriormente por Cheramy y col (Cheramy y col., 1981). La disminución de DA y DOPAC en SN es el perfil característico de daño en el sistema dopaminérgico que aparece con modelos animales de la EP como MPP+, 6-OHDA y metanfetamina, los cuales están directamente relacionados con estrés oxidativo (Cassarino y col., 1997; Kumar y col., 1995; Cubells y col., 1994).

Esta disminución en la transmisión dopaminérgica en la terminal junto con la hiperactividad en el cuerpo sugiere de nuevo, un mecanismo desarrollado por el sistema dopaminérgico en respuesta a un daño o al menos a una alteración en el funcionamiento en la terminal. Con el fin de profundizar en esta posible respuesta en el cuerpo neuronal quisimos estudiar si la expresión génica de las dos proteínas dopaminérgicas principales estaban afectadas. Medimos así la expresión celular de DAT mRNA y TH mRNA en SN y la actividad *in vitro* del TDA y la cantidad y actividad de la TH.

DISCUSION

Así encontramos un aumento de un 40% del mensajero mRNA de TH, mientras que la expresión del mensajero de la proteína del TDA no presentó ninguna alteración. Este aumento de la expresión de mRNA de TH se vio corroborado por el aumento de la enzima en la terminal nerviosa tanto en cantidad como en actividad, sin que se observasen cambios alguno en el cuerpo dopaminérgico de la SN. Un aumento en la expresión del mRNA de TH en SN sin que haya un aumento correspondiente en Th en esta área pero sí en la terminal, ya ha sido anteriormente descrito en ratas con neurodegeneración dopaminérgica debido a inyecciones de 6-OHDA, lo que sugiere que la proteína recién sintetizada es probablemente rápidamente transportada a la terminal nerviosa en el estriado como mecanismo para compensar el daño neuronal (Hantraye y col., 1994).

La inhibición de GR promueve la acumulación de GSSG, como esta enzima es la vía principal de regenerarlo, esto promueve una disminución de GSH (Calberg y Mannervik, 1985). Además, como el aumento de GSSG resulta tóxico para la célula, cuando la concentración de GSSG alcanza límites peligrosos este es liberado al espacio sináptico, lo cual podría contribuir aún más a la disminución intracelular de GSH. Como ya hemos dicho la disponibilidad de GSH está directamente relacionada con la vesiculación de DA, lo que conduciría a una disminución en el almacenamiento y a un aumento significativo del metabolismo de DA con un aumento de la tasa de recambio de la DA, lo cual está en concordancia con nuestros resultados (Drukarch y col., 1996). La reserpina como ya hemos apuntado, afecta a la vesiculación de DA y los niveles de GSH, lo cual provoca una disminución de los niveles intracelulares de DA y DOPAC, como ocurre en la SN de los animales tratados con BCNU (Drukarch y col., 1996) así como un aumento en la tasa de recambio de DA (HVA/DA) (Spina y Cohen, 1989). Por otra parte también se ha probado que una alteración en el almacenamiento de DA (como la que provoca la amfetamina) supone una

liberacion de la misma mediante el funcionamiento reverso del transportador de DA (3MT/DA) (Sulzer y col., 1993). La disminucion de la cantidad de DA parece ser la responsable de que esta afeccion de la vesiculacion de DA promueva un aumento en los niveles de expresion del mensajero mRNA de TH en las celulas dopaminergicas del cerebro medio (Passinetti y col., 1990).

Por el contrario en el estriado solo observamos una disminucion de los niveles de DOPAC, pero la DA esta significativamente elevada al igual que ocurre en la dieta deficiente en selenio, probablemente porque en este area la enzima TH esta elevada. Nuestros estudios de deficiencia en Se durante un mes, que como hemos dicho afecta, aunque de manera diferente al sistema GPx/GR, mostro aumento de los niveles de DA en el estriado al igual que en el estriado de los animales tratados con BCNU. Asi como una disminucion de la razón DOPAC/DA en ambos casos sin cambios en el funcionamiento *in vitro* del transportador ni cambio en la expresion del mensajero del TDA. En ambos caso esto sugiere una regulacion *in vivo* del funcionamiento del transportador de DA para mantener la transmision dopaminergica de una manera más efectiva. En este sentido debemos recordar que la liberacion dendritica de DA controla la liberacion de DA a traves de los receptores D2 (Cheramy y col., 1981). Asi un aumento en la liberacion de DA en SN (3MT/DA) disminuye la liberacion en la terminal como en nuestros animales. Ademas esto disminuiria la activacion de los autorreceptores D2 en la terminal lo cual aumenta la sintesis de DA (Santiago y Westerink, 1991). Ademas trabajos muy recientes muestran que existe relacion directa entre D2 y TDA, asi en los ratones deficientes en D2 hay una disminucion en el funcionamiento del TDA sin cambios de expresion, lo que sugiere que los receptores desocupados en la terminal podrian inducir la disminucion en la recaptacion de Da y por tanto en la razon DOPAC/DA (Dickinson y col., 1999).

DISCUSION

Otra alternativa es que la el estres oxidativo generado por la inhibicion de GR, y el aumento de radicales libres, provoquen la oxidacion de DA con el consiguiente descenso del catabolismo dopaminérgico en la terminal (Chiueh et al., 1993), ya que esta reaccion no es enzimatica (Graham y col., 1978). Ademas esta contribucion de la DA al estres oxidativo, se ve exacerbada cuando el sistema GSH esta comprometido. (Rabinovic y Hastings, 1998). La autoxidacion excesiva de DA conduce no solo a la acumulacion de quinonas citotoxicas, si no tambien a la formacion de EROs, que podrian superar la capacidad antioxidante del estriado, suponiendo un aumento en el numero de carbonilos y un descenso en las razones de la tasa de recambio dopaminérgica.

Numerosos estudios relacionan tanto al sistema glutatión como a los sistemas antioxidantes relacionados directamente con al homeostais del calcio. Disminucion de los niveles de GSH resultan en una muerte neuronal mediada por calcio en celulas PC12 (Jurma y col., 1997) y oxidacion de DA y los radicales libres pueden modificar el transporte de glutamato, el calcio intracelular asi como los niveles de GSH (Berman y Hastings, 1997) (Hoyt y col., 1997).

Trabajos recientes han demostrado que GSH Y GSSG son capaces de inhibir la actividad de la Protein-quinasa (PKC) dependiente de Calcio y fosfotaidilserina, lo que sugiere que el glutatión ejercen una regulacion negativa sobre la isoenzima celular de PKC la cual se puede ver afectada cuando durante un stress oxidativo se altera el pool de GSH (Ward y col., 1998). Ademas la generacion de radicales libres producida por 6-OHDA es capaz de disminuir la fluidez de membrana mientras que hay un aumento del [Ca] intracelular (Kumar y col., 1995).

Tambien se han encontrado que el aumento en la concentracion de calcio, ya sea debido a un aumento de la entrada de Ca desde el espacio extracelular o a la liberacion de la reserva intracelular de calcio en la

presencia o ausencia de calcio extracelular, ambos casos son suficientes para aumentar la expresion del mRNA de TH (Menezes y col., 1999) lo cual podria contribuir a la induccion genica de la TH encontrada en nuestro tratamiento.

El GSH posee la capacidad de secuestrar Zn^{2+} (Yoneda y Ogita, 1991) (Li y col., 1954; Li y Manning, 1955; Sato y col., 1984). Y por el contrario GSSG es capaz de liberara dicho ion desde las metallothioneinas (MT), al igual que otros compuestos disulfuros, por lo tanto una alteracion como la nuestra sobre la homeostasis GSH/GSSG supone una aceleracion de la liberacion de Zn^{2+} desde las MT (Maret, 1995; Maret, 1994). Si el Zn^{2+} entra en la celula es capaz de producir necrosis en celulas corticales de cultivos, lo cual fue reducido por antioxidantes (Kim y col., 1999) .

Todo lo expuesto sugiere que la disfuncion del sistema glutatión puede provocar daño neuronal. Para comprobar si dicho desequilibrio fue suficiente para provocar un daño oxidativo medimos los grupos carbonilos, encontrando un aumento significativo en el estriado de las ratas tratadas con BCNU. El hecho de que este aumento se encuentre solo en una de las regiones sugiere que en el estriado el sistema GPx/GR es mas importante que en la SN. Esto se ve apoyado por estudios anteriores que demuestran que es el estriado junto con la corteza las dos areas de mayor actividad de GR, mientras que la SN muestra la actividad menor (Brannan y col., 1980). Por otra parte, este aumento del numero de proteinas modificadas en el estriado apunta a que en este area el sistema de regeneracion/reparacion de dichas proteinas es menos efectivo. Como hemos dicho, cuando la GPx usa GSH para degradar el peroxido de hidrogeno se genera GSSG. Este GSSG es capaz de reaccionar con proteinas para formar compuestos disulfuros proteina-glutatión (PrSSG). Estos compuestos a su vez pueden conducir a la formacion de otros puentes disulfuro, con el fin de regenerar el GSH (esencial por otra parte para le neurona) formando complejos de proteinas unidas por puentes disulfuros (PrSSPr). (Cohen, 1999). La enzima tioltransferasa (Ttasa) es la

DISCUSION

que específicamente este implicada en la reducción de PrSSG, a proteínas tioles, en presencia de GSH, usando NADPH. Trabajos muy recientes han probado que el cerebro medio es una de las áreas con mayor actividad de Ttasa, mientras que el estriado mostro la menor actividad (Balijepalli y col., 1999). Todo esto contribuiría en gran medida a que los daños provocados por la deficiencia en la regeneración de GSSG den lugar a un daño oxidativo en el estriado y no en la SN.

Todo esto sugiere que la inhibición del funcionamiento de la GR acumula GSSG afectando la homeostasia del GSH. Esto provoca la alteración de la vesiculación de DA lo cual provocaría disminución de la DA y posterior inducción del mRNA de TH. Por otra parte ya sea por su actuación sobre el la liberación de zinc o por la alteración de la homeostasia de calcio por el daño oxidativo, provoca una pérdida de viabilidad celular con posterior muerte. Todo esto se ve corroborado por los efectos de otros compuestos que afectan a la homeostasia de los grupos tioles en las células como el disulfiram y el ácido etacrínico. El disulfiram, una droga que en humanos es capaz de provocar síntomas Parkinsonianos, en ratas es capaz de disminuir la actividad de GR, provocando la liberación de DA desde el pool vesicular y citoplasmático, además es capaz de inhibir la recaptación de DA al igual que en nuestros animales (Loplane y col., 1992; Nagendra y col., 1994). Por otra parte el ácido etacrínico, reactivo tiol capaz de entrar en la mitocondria, provoca una disminución del pool citosólico y mitocondrial de GSH, así como un aumento en las EROs. Todo esto fue seguido por una disminución del GR, tras esto hay una disminución del potencial transmembrana mitocondrial y de la producción celular de ATP, previo a una pérdida de la viabilidad celular (Huang y Philbert, 1996; Martínez y col., 1995).

En conclusión y tomando en cuenta todos los cambios observados hemos probado que la inhibición de la GR y el consiguiente desequilibrio del

sistemas GPX/GR es capaz de generar un estres oxidativo especifico en el estriado. Esto se acompaño por un regulacion a la baja del sistema dopaminérgico. El analisis de los niveles neuroquimicos de l SN reveló un aumento en la razon HVA/DA junto con una disminuci3n DA, perfil típico de neurodegeneraci3n dopaminérgica que tambien aparece en otros modelos de Parkinson usando toxinas especificas para las neuronas dopaminérgicas. Otra vez el cuerpo celular muestra una capacidad esencial para desarrollar mecanismos compensatorios y reguladores de la neurotransmisi3n en la terminal cuando existe estres oxidativo. Esto es corroborado por la induccion del ARNm de la TH y que la TH reciensintetizada es reapidamente transportada hacia la terminal.

DISCUSION

D.3. ESTUDIO DE LA DISMINUCION DE LA CAPACIDAD PROTECTORA FRENTE A PEROXIDACIÓN LIPÍDICA MEDIANTE EL USO DE UNA DIETA DEFICIENTE EN VITAMINA E.

Hemos evaluado el efecto de una deficiencia en vitamina E en el funcionamiento del sistema dopaminérgico negro-estriatal. El periodo mas corto de deficiencia 15 dias aumento la actividad y cantidad de TH en estriado y en SN. Esto correlaciona con los estudios anteriormente realizados en nuestro laboratorio que pusieron de manifiesto elevaciones de la tasa de recambio de DA en ambas estructuras, lo cual es un indicativo de hiperactividad neuroquimica dopaminérgica (Castaño y col., 1993b). Además el aumento del uptake de DA tambien corrobora los resultados anteriormente obtenidos en los que observamos un aumento de los niveles de DOPAC (Castaño y col., 1993b). Pero, contrariamente a lo obtenido encontramos una disminucion moderada pero significativa de los niveles de mRNA de TH y TDA tras 15 dias de deficiencia en vitamina E. Estos resultados muestran claramente una falta de correlacion entre transcripcion y sintesis de proteina.

Con el fin de encontrar una explicacion a estos resultados extendimos nuestro estudio hasta 30 dias. En estas condiciones la mayoria de los marcadores neuroquimicos examinados no eran diferentes a los de los controles en SN y estriado. Estos marcadores incluyeron DA y sus metabolitos y actividad y cantidad de TH. La cantidad y la actividad de enzima permanecio elevada pero en contraste el mRNA de TH y TDA a los 30 dias se encontro aun mas disminuido que en los animales de 15 dias de dieta (35-40%). Además aunque la medida del transportador *in vitro* de DA no mostro cambios tras 30 dias de dieta, los niveles basales de DA medidas *in vivo* mostraron un aumento tanto de DA como de sus metabolitos. Como ya hemos dicho el transportador y su funcionamiento suponen el sistema principal de

"limpieza de espacio sináptico (Cass y col., 1993). Por lo tanto una alteración de los niveles extracelulares son reveladores de una disminución *in vivo* de la recaptación de DA especialmente considerando que los niveles totales de DA y sus metabolitos no mostraron cambios, por lo que las variaciones extracelulares no se deben a cambios del metabolismo. Cumming y col. han demostrado que la liberación al espacio extracelular de DOPAC es probablemente una función dependiente de la exposición de DA a un espacio intracelular, donde la MAO actuaría sobre ella (Cumming y col., 1992). Encontramos una disminución de los niveles de DOPAC lo cual revelaría una disminución en el funcionamiento *in vivo* del transportador. Esto además se ve corroborado por los niveles de HVA. Sin embargo cuando medimos la actividad del TDA estudiando la acumulación extracelular de DA tras aplicar nomifensina en el espacio sináptico, inhibidor de la recaptación de DA. La liberación de DA tras aplicar 60 mM KCl fue menor en los animales deficientes en vitamina E expresado en porcentaje de liberación con respecto a los niveles basales de DA. Estos datos parecen indicar pequeñas pero significativas diferencias entre ambos grupos de animales aunque las variaciones de niveles basales son muy reveladoras. Aumentos en los niveles basales de DA con una disminución en la liberación de DA y un aumento en el turnover no han sido nunca descritos. Pero estudios de daño con 6-OHDA resultaron en niveles extracelulares de DA normales a pesar de una extensa pérdida de terminales dopaminérgicas (Abercrombie y col., 1990) (Robinson y Whishaw, 1988) y de la disminución en la concentración de DA liberada (Garris y col., 1995) así como al aumento de turnover de DA (Zigmond y col., 1984).

La observación más importante en nuestro estudio es la correlación inversa entre la transcripción del gen de TH, es decir la medida de mRNA y la traducción de este mensajero, la medida de la cantidad de enzima TH. La pregunta inmediata es el mecanismo que conduce a la disminución notable de

DISCUSION

los mRNA de TH y TDA. Hay que indicar que disminuciones del mensajero mRNA de Th sin cambios en la cantidad ni en la actividad de la proteina de TH han sido ya descritos en casos de neurodegeneracion en el sistema dopaminérgico negro-estriatal. Pasinetti y col. han mostrado que tras nueve meses de lesion parcial del sistema dopaminérgico con 6-OHDA, las neuronas supervivientes mostraron una importante perdida del mRNA de TH y encogimiento celular mientras que en la terminla nerviosa la cantidad y la actividad de TH asi como la cantidad de DA se mantuvieron en los niveles normales (Pasinetti y col., 1989a; Pasinetti y col., 1990; Pasinetti y col., 1992). Esto se ve apoyado tambien por los estudios de la lesion producida por la axotomia del haz mesoencefalico medial, el cual conduce a la neurodegeneracion retrograda de los cuerpos celulares dopaminérgicos. La transeccion unilateral del haz resulta en un aumento temprano de la cantidad y la actividad de TH, mientras que los niveles celulares de mRNA de TH en substancia nigra estan muy disminuidos (Weiser y col., 1993) (Venero y col., 1997; Weiser y col., 1994). La SNc dañada por 6-OHDA produjo un aumento de sintesis de DA acompañado de un aumento de actividad de TH, tras 2 o 4 semanas la cantidad de TH tambien aumento (Zigmond y col., 1984; Zigmond y col., 1993; Acheson y Zigmond, 1981). Ademas todos estos cambios se acompañan de una disminucion del mRNA de TH (Sherman y Moody, 1994).

Como ya expusimos en la Introduccion, el papel mas importante de la vitamina E en la fisiologia del sistema dopaminérgico esta relacionado directamente con su capacidad antioxidante, la cual puede ser critica para el mantenimiento de la integridad del sistema redox. Esta bien establecido que el equilibrio existente entre la generacion de RL y las defensas antioxidantes lo cual mantiene el control de la homeostasia del estado oxidativo celular (Bains y Shaw, 1997). La diana de accion de los RL y EROs en tejido son las proteinas. En este contexto es interesante recordar la cascada de eventos que llevan desde la generacion de RL hasta la produccion de

daño celular. Uno de los efectos más devastantes de los RL es la formación de peróxidos de hidrógeno. Un rasgo de los radicales peróxidos es su acción en los lípidos de membrana, con la formación subsiguiente de radicales peróxidos (Halliwell, 1992). Estos radicales son a su vez capaces de atacar las proteínas de membrana, dañando así receptores de membrana y enzimas. Distintos antioxidantes inhiben esta reacción en cadena de peroxidación lipídica captando los radicales libres, la vitamina E es el más efectivo inhibiendo esta cadena de reacciones (Burton y Ingold, 1989).

Para comprobar si realmente en la deficiencia de vitamina E tiene lugar daños de este tipo, medimos los carbonilos derivados de reacciones de oxidación en la sustancia nigra y en el estriado, este índice se acepta como parámetro de medida de daño oxidativo y el método definitivo para la valoración de las oxidaciones catalizadas por metales (Ahn y col., 1987; Stadtman, 1986; Stadtman, 1990; Levine y col., 1990; Bowling y col., 1993; Ayala y Cutler, 1996). Restringimos esta medida a los 30 días ya que es en este período donde los tienen lugar los cambios más relevantes. El número de proteínas modificadas por oxidación fue significativamente mayor tras una deficiencia en vitamina E de 30 días, lo cual constituye un indicativo de daño oxidativo en el sistema dopaminérgico. La relación entre especies reactivas de oxígeno y muerte celular por necrosis (Kane y col., 1993) o por apoptosis (Hockenbery y col., 1993; Zaman y Ratan, 1997) y su implicación en procesos neurodegenerativos como Parkinson Disease (Jenner y Olanow, 1996) y Alzheimer (Benzi y Moretti, 1995b) es bien conocida. Estos datos se ven apoyados por el efecto a largo plazo de la deficiencia en vitamina E sobre la población dopaminérgica, la cual ha sido demostrada producir una pérdida de un 19-33% de las neuronas inmunopositivas a la enzima TH en la sustancia nigra así como una disminución del binding de (3H) mazindol en el estriado (Dexter y col., 1994a; Dexter y col., 1994). Pacientes con una deficiencia en vitamina E mostraron una disminución en la recaptación de (¹⁸F)dopa uptake en

DISCUSION

caudado, en unos niveles semejantes a los vistos en pacientes parkinsonianos (Dexter y col., 1994). Todo esto sugiere una neurodegeneración en el sistema dopaminérgico, probablemente debido a procesos de peroxidación lipídica por estrés oxidativo a causa de la deficiencia en vitamina E.

En conclusión, hemos caracterizado el efecto de la deficiencia de vitamina E en el funcionamiento del sistema dopaminérgico. Hemos demostrado el papel crítico de la vitamina E como captador y neutralizador de radicales libres en sustancia nigra y estriado. La aparición de proteínas modificadas en respuesta a la deficiencia de vitamina E es consistente con el daño oxidativo en las dos áreas. Este daño oxidativo podría causar esta correlación inversa entre mRNA y proteínas, con la consiguiente disfunción del sistema dopaminérgico.

El sistema es capaz de desarrollar cambios compensatorios, probablemente debido a cambios postranscripcionales que afectan a TH y TDA. Todos estos cambios son capaces de mantener los niveles normales de DA y sus metabolitos en estriado tras 30 días de dieta, alterándose solamente los niveles extracelulares. Mientras en la SN hay un aumento de ambos, cantidad y actividad de TH así como una disminución en los mRNA de TDA y TH.

D.4. ESTUDIO DE LA DISMINUCION DE LA CONCETRACION DE ACIDO ASCÓRBICO EN EL CEREBRO MEDIANTE EL USO DE UNA DIETA DEFICIENTE EN VITAMINA C. ESTUDIO DE LA TOXICIDAD DEL MPP+ EN EL SISTEMA DOPAMINÉRGICO.

Quisimos extender nuestro estudio a otro conocido antioxidante, dependiente también de la dieta, la vitamina C (Fornstedt y Carlsson, 1991). La vitamina C ha sido implicada en el sistema de regeneración no enzimática de la vitamina E en la que el radical alfa-tocoferil pasa a tocoferol mientras que el ácido ascórbico se transforma primero en el radical semidehidroascórbico y después en ácido dehidroascórbico (Niki, 1987).

En este caso el animal de experimentación elegido fueron cobayas, ya que al igual que los humanos y a diferencia de las ratas no son capaces de sintetizar vitamina C por lo que necesitan de un aporte diario de esta vitamina en la dieta.

Cuando sometimos a las cobayas a un mes con esta dieta pobre en vitamina C estas presentaron los primero síntomas típicos del escorbuto como pérdida de peso y laxitud. Para comprobar la efectividad de nuestra dieta deficiente en vitamina C (30 días) medimos los niveles de AA y su forma oxidada DHAA, en estriado y SN. Dichos análisis neuroquímicos pusieron de manifiesto y marcado descenso en los niveles de ambos compuestos, así como una disminución de la razón AA/DHAA, demostrando las condiciones escorbúticas de nuestros animales.

Los análisis neuroquímicos mostraron cambios más profundos a nivel de la SN que del estriado, como ya viene a ser un hecho frecuente en todos nuestros estudios con un aumento de estrés oxidativo probablemente es un mecanismo desarrollado por el cuerpo celular para mantener el funcionamiento de la terminal. Así en la SN aunque no hay cambios en los niveles de DA si los hay a nivel de sus metabolitos, por lo que hay una alteración del recambio dopaminérgico, con una disminución del DOPAC y

DISCUSION

HVA y un aumento del 3-MT. Esto supuso un aumento de la razón de 3-MT/DA lo que indica un aumento del metabolismo extraneuronal de la Da mientras que la razón DOPAC/DA disminuyó revelando una disminución del metabolismo intraneuronal. Todo esto se acompaña de la disminución de HVA/DA lo que sugiere que hay una disminución del metabolismo de la DA.

En el estriado en cambio, el único cambio que se observó fue una disminución de los niveles de DOPAC, lo cual disminuyó la razón DOPAC/DA lo cual sugiere una disminución del metabolismo intraneuronal. También la razón 3MT/DA disminuye ligeramente en este área del cerebro.

Estudiamos entonces la actividad de la enzima TH para ver si las alteraciones del metabolismo de Da incluían cambios en su síntesis. No encontramos diferencia entre los animales sometidos a la dieta y los animales controles. Luego las alteraciones neuroquímicas no se deben a un cambio en la velocidad de síntesis. Decidimos medir entonces las actividades de dos de las enzimas implicadas en el catabolismo de la DA: las MAO A y B.

Como ya dijimos en la introducción, en las cobayas al igual que en los humanos, la enzima principal en el metabolismo dopaminérgico es la enzima MAO A que se considera de localización neuronal. Pero también existe un porcentaje de metabolismo vía MAO B, localizada preferentemente en la glía. La dieta pobre en vitamina C produjo una disminución de la actividad de la MAO A en ambas áreas lo cual esta de acuerdo con la disminución en los niveles de DOPAC que se acepta como metabolito intraneuronal. En cambio la MAO B esta aumentada en ambas áreas, la cual es responsable del metabolismo de la DA liberada y no recaptada por la neurona, si no recogida por la glía y metabolizada.

El ácido ascórbico parece estar preferentemente localizado en las neuronas (Rice y col., 1995) (Rice y Russo-Menna, 1998), por lo que parece ser que su acción como antioxidante y como neuromodulador se ejerce dentro de la neurona o al ser liberado a la vez que la dopamina y el glutamato.

Apoyando esta hipótesis hay numerosos estudios de neuroprotección frente a daños por el AA, tanto *in vitro*, como *in vivo* (Sciamanna y Lee, 1993; Ranjan y col., 1993; Rice y col., 1994). Esto podría explicar la disminución de la actividad de la MAO intraneuronal, debido probablemente a un daño oxidativo. Por otra parte puede que el aumento de la MAO B sea un mecanismo compensatorio como ocurre en ratas cuando se inhibe la MAO A mediante drogas, en estos casos la MAO B se activa (Butcher y col., 1990). La disminución de las actividades de la

Esta alteración de los niveles neuroquímicos dopaminérgicos y en las actividades de las MAOs sugieren una disminución del metabolismo intraneuronal y un aumento del extraneuronal, lo cual se podría traducir en un aumento de la liberación y una disminución de la recaptación de DA.

En nuestro estudio del efecto de la vitamina C sobre el sistema dopaminérgico quisimos extender nuestros experimentos a la acción del MPP+, el metabolito activo de la droga aceptada como modelo de la EP, incubando tejido procedente de las cobayas alimentadas con una dieta pobre en vitamina C con esta toxina. Dicha incubación produjo una disminución significativa de los niveles de DA y de su metabolito el DOPAC en todas los grupos experimentales usados para el estudio. Sin embargo inesperadamente, la falta de vitamina C en las cobayas no produjo un daño mayor que el observado en el grupo control ni en el grupo de cobayas alimentadas con un suplemento en vitamina C. Como el MPP+ no se acumula significativamente en los cuerpos dopaminérgicos de la SN, si no en las terminales dopaminérgicas del estriado, nuestras medidas se llevaron a cabo en tejido estriatal (Santiago y col., 1996; Herkenham y col., 1991). Esta disminución en la toxicidad inducida por el MPP+ es sorprendente si tenemos en cuenta estudios previos de toxicidad de esta toxina en animales con dietas pobre en antioxidantes exógenos, como vitamina E y selenio, ambos conocidos captadores de radicales libres. (Vizueté y col., 1994) Este estudio

DISCUSION

mostró una mayor neurotoxicidad del MPP⁺ sobre tejidos de ratas alimentadas con dietas pobres en selenio y vitamina E. La mayor resistencia de los animales deficientes en vitamina C frente a la toxicidad del MPP⁺ no esta pues relacionada con el sistema regenerador del tocoferol. Esta conclusión se basa en el hecho de que el sistema regenerador de tocoferol consiste en AA, el cual se convierte en el radical ácido semidehidroascórbico, y entonces a DHAA (Bast y Goris, 1989; Niki, 1987).

Tomando todo esto en cuenta podríamos atribuir la mayor resistencia de los animales escorbúticos frente al MPP⁺ a acciones específicas del AA en el SNC y no a sus propiedades como vitamina antioxidante. Un efecto protector similar ha sido descrito por el grupo de Perry et al., que encontraron una menor toxicidad del MPTP en condiciones de deficiencia en Vitamina C, mostrando que en cobayas escorbúticas el MPTP no destruía las neuronas nigroestriatales.

Entre las otras acciones desarrolladas por el AA en el SNC debemos de apuntar como una de las primeras y que mas importancia esta tomando hoy en día, la acción prooxidante de la vitamina C. El AA además de su conocido efecto antioxidante, tiene capacidad prooxidante en ciertas circunstancias (Heikkila y Cabbat, 1983; Heikkila y col., 1982); (Pileblad y col., 1988). Así en presencia de Fe²⁺, el ascorbato se transforma en un radical ascorbato altamente tóxico, el cual podría conducir a un aumento en el daño oxidativo. Bajo estas condiciones, la deficiencia en vitamina C debería aumentar la toxicidad del MPP⁺.

Por otra parte el AA tiene un papel como neuromodulador del sistema dopaminérgico (Rebec y col., 1985; Desole y col., 1991a; Desole y col., 1991b). Este aspecto pondría ser importante ya que el AA altera la liberación de DA, por ejemplo la producida por antagonistas y agonistas no selectivos del receptor de DA, aumenta la afinidad de DA por sus receptores D1 y D2, y aumenta la liberación de DA inducida por potasio (Crespi y col., 1984; Girbe y

col., 1994; Kimura y Sidhu, 1994; Zetterström y col., 1985). Además hay evidencias que sugieren interacciones entre AA y glutamato en el neocóstriado. A nivel presináptico, el ascorbato parece estar colocalizado con el glu en las neuronas corticoneocóstriales, y la liberación de estas dos sustancias es mediada por un complejo proceso de intercambio en el axón terminal (Grunewald, 1993). La neurotoxicidad del MPP⁺ está también asociada con el aumento de aminoácidos excitatorios, especialmente aquellos del subtipo N-metil-D-aspartato (NMDA). Así tras la perfusión de MPP⁺ en el cóstriado de la rata se observa una liberación masiva de glu y aspartato. Además, los receptores terminales NMDA y no-NMDA de glutamato facilitan la liberación de glu e incrementan la excitabilidad del glu terminal (Ferkany y Coyle, 1983; Ferkany y col., 1982) (García-Muñoz y Groves, 1992; García-Muñoz y col., 1991). Se ha sugerido que este proceso de retroalimentación positiva contribuye a la toxicidad inducida por glu, así como así como a la inducción de una potenciación de largo tiempo ((García-Muñoz y Groves, 1992). Este sinergismo entre MPP⁺ y los aminoácidos excitatorios está apoyada por estudios que mostraron que la dizolcipina maleato, un antagonista de NMDA, protege parcialmente a las neuronas dopaminérgicas de la neurodegeneración inducida por MPP⁺ (Santiago y col., 1992; Turski y col., 1991). Con estas observaciones parece ser posible que la liberación de glu y aspartato inducida por el MPP⁺, podría contribuir a la neurotoxicidad del MPP⁺ sobre las células dopaminérgicas. Para clarificar el posible papel de estos aminoácidos en nuestro modelo de toxicidad, medimos los aminoácidos en el cóstriado. Los análisis neuroquímicos mostraron un aumento de los niveles de Glu, arginina y GABA en los animales alimentados durante 30 días con una dieta deficiente en vitamina C, que no explica la baja toxicidad del MPP⁺ en dichas condiciones. Por otra parte, como la liberación del ascorbato neocóstriado está ligada a los sitios de recaptación de glu, y este proceso se ve influenciado por los receptores NMDA neocóstriales, se ha

DISCUSION

sugerido que el bloqueo de los receptores presinápticos de NMDA con antagonistas NMDA debería suponer una disminución en la liberación de glu y de ascorbato (Pierce y Rebec, 1993) Si embargo, ninguno de estos cambios explican la baja toxicidad del MPP+ en las condiciones escorbúcticas de nuestro grupo experimental. Además sorprendentemente, el aumento de glu en nuestros animales coincide con el aumento encontrado en la dieta deficiente en vitamina E, que al contrario que la nuestra supone un aumento en la toxicidad inducida por MPP+ (Steffen y col., 1993).

Finalmente otra posibilidad es que el ascorbato pudiese regular la recaptación de DA, es decir el transportador de DA, ya que el MPP+ ejerce su efecto al actuar sobre el complejo I mitocondrial tras ser activamente transportado al interior neuronal a través del DAT (Javitch y col., 1985). Los sinaptosomas estriatales preparados a partir de los tejidos de cobayas alimentados con la dieta pobre en vitamina C durante un mes, mostraron una disminución significativa del funcionamiento del TDA. Est podría explicar la disminución en la neurotoxicidad inducida por MPP+ en los animales deficientes en AA, así como los cambios neuroquímicos observados en los tejidos en ausencia de MPP+. Esto supondría disminución de la recaptación de DA y por lo tanto de su metabolismo intraneuronal via MAO A y por lo tanto aumento del metabolismo glial de la DA via MAO B. La clave de este fenómeno sería conocer cual es el mecanismo responsable de esta disminución en el transporte de DA. El AA es capaz de aumentar la liberación de Da de preparaciones synaptosomales inducida por potasio (Girbe y col., 1994). En este contexto, la disminución de AA en el medio podría suponer un a disminución en la liberación de DA inducida por MPP+, o que el transportador de DA se vea inhibido debido al estrés oxidativo generado. Es interesante destacar que en cobayas escorbúcticas, disminuciones en los niveles de AA han resultado en un aumento de la producción de compuestos derivados de la autoxidación de DA, 5-S-cisteinil DA y en un aumento de la

oxidación de Da por la MAO, con la consiguiente formación de H₂O₂, un precursor de especies altamente reactivas, los radicales hidroxilos. (Fornstedt y Carlsson, 1991; Halliwell, 1992; Spina y Cohen, 1989). La habilidad de estos radicales para iniciar procesos de peroxidación lipídica, generando radicales peróxido que pueden atacar a las membranas, dañando así receptores y proteínas esta bien establecida (Halliwell, 1992). Sería por lo tanto posible que un periodo prolongado de dieta pobre en AA, genere un aumento de estrés oxidativo, el cual conduciría a un daño del transportador de DA de alta afinidad, probablemente debido a peroxidaciones lipídicas. La disminución en la efectividad del transportador supondría también una disminución en la entrada del tóxico MPP⁺ al interior neuronal, no alcanzando así dicho tóxico el complejo I de la mitocondria y por lo tanto no ejerciendo su efecto neurotóxico. Esto explicaría pues la relativa resistencia de los animales con una dieta pobre en vitamina C frente a la acción del MPP⁺. La figura muestra el modelo propuesto para este fenómeno.

1.- La inducción de un EO mediante la disminución de la capacidad antioxidante celular (por la inhibición de la GR por el BCNU o la disminución de la actividad de GPx con una dieta deficiente en Se durante 15 y 30 días, por el uso de una dieta deficiente en Vitamina E o una dieta deficiente en Vitamina C durante 30 días) muestra que no todos los sistemas antioxidantes afectan de igual manera al Sistema dopaminérgico.

2.- La dieta deficiente en Se produjo un fuerte aumento de la concentración de DA y de sus metabolitos en SN y estriado junto con un aumento de la cantidad, actividad y transcripción de la enzima TH. Por el contrario el transportador de DA mostró un aumento a los 15 días del tratamiento volviendo a sus niveles normales a los 30 días.

3.- Los cambios descritos podrían conducir a un fenómeno de retroalimentación positiva en la producción de radicales libres, mediante la producción de peróxido de hidrógeno en el metabolismo de la DA por la MAO, y provocando consiguientemente un daño progresivo de estas estructuras.

4.- La administración de BCNU produjo un marcado aumento de la concentración de DA en el estriado, disminuyendo, sin embargo en sustancia negra. Estos cambios se encuentran acompañados del aumento de la actividad y cantidad de TH en el estriado, probablemente debido al aumento de la transcripción de la enzima (mRNA) y al posible aumento de su velocidad de transporte a las terminales.

5.- Las alteraciones observadas tras el tratamiento con BCNU parecen conformar un perfil de neurodegeneración del sistema dopaminérgico debido probablemente a un daño oxidativo. Esto se corroboró al comprobar que la administración de BCNU produjo un marcado estrés oxidativo, principalmente

CONCLUSIONES

en las terminales dopaminérgicas, como indica el aumento de grupos carbonilos en el estriado.

6.- La deficiencia en vitamina E provocó un aumento en la cantidad y actividad de TH a los 15 días observándose un descenso progresivo hacia los niveles controles tras 30 días. Sin embargo, la dieta generó una disminución de los mensajeros de TH y TDA. Esta discordancia entre cantidad de ARNm y de proteína sugiere un daño neuronal que se ve confirmado por el aumento de los grupos carbonilos en ambas áreas, lo que supone que la vitamina E desarrolla un efecto antioxidante comparable en ambas.

7.- La deficiencia en vitamina C produjo cambios en el metabolismo de DA debidos fundamentalmente a las modificaciones en sus enzimas catabólicas MAO A y B. Todos los cambios parecen indicar una disminución del metabolismo dopaminérgico intraneuronal y un aumento del extraneuronal.

9.- Uno de los hechos que puede participar en esta cambio es la disminución de la actividad del TDA. Esta disminución justifica así mismo el aumento de la resistencia del sistema dopaminérgico a la acción tóxica del MPP+ en las cobayas sometidas a dieta deficiente en vitamina C, ya que el MPP+ entra en la neurona dopaminérgica de forma activa a través del TDA.

10.- El suplemento de vitamina C en la dieta no ejerce efecto protector frente a la neurotoxicidad del MPP+ en el sistema dopaminérgico..

11.- El funcionamiento del sistema dopaminérgico se ve afectado cuando existe estrés oxidativo debido a la disminucion de la capacidad antioxidante. Esta susceptibilidad del sistema dopaminérgico es especialmete notoria cuando se altera el funcionamiento del sistema GSH/GPx/GR o la

CONCLUSIONES

concentración de la vitamina E sin embargo, la disminución de Vitamina C parece ser menos nociva y provoca cambios menores.

1. Abercrombie, E. D., Bonatz, A. E., y Zigmond, M. J.(1990) Effects of L-DOPA on extracellular dopamine in striatum of normal and 6-hydroxydopamine treated rats. *Brain Res.* 525:36-44
2. Acheson, A. L. y Zigmond, M. J.(1981) Short and long term changes in tyrosine hydroxylase activity in rat brain after subtotal destruction of central noradrenergic neurons. *J.Neurosci.* 1:493-504
3. Ahn, B., Rhee, S. G., y Stadman, E. R.(1987) Use of fluorescein hydrazide and fluorescein thiosemicarbazide reagents for the fluorimetric determination of protein carbonyl groups and for the detection of oxidized protein on polyacrilamide gels. *Anal.Biochem.* 161:245-257
4. Alaiz, M., Navarro, J. L., Girón, J., y Vioque, E.(1992) Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with diethyl ethoxymethylenemalonate. *J.Cromatography* 591:181-186
5. Alam, Z. I., Jenner, A., Daniel, Susan E, Lees, Andrew J., Cairns, N., Marsden, David C., Jenner, Peter, y Halliwell, B.(1999) Oxidative DNA damage in the parkinsonian brain: an apparent selective increase in 8-hydroxyguanine levels in substantia nigra. *J.Neurochem.* 69:1196-1203
6. Allen, J. C., Forag, R. S., y Crook, E. M(1979) Metal-catalysed oxidation of aqueous emulsions of linoleic acid and trilinolein. *J.Appl.Biochem.* 1:1-15
7. Alvarez, E., Ruiz-Gutierrez, V., Santa Maria, C, y Machado, Alberto(1993) Age-dependent modification of lipid composition and lipid structural order parameter of rat peritoneal macrophage membranes. *Mech.Ageing Dev.* 71:1-12
8. Ambrosio, g., Zweier, J. L., Duilio, C, Kuppusamy, P., Santoro, G., Elia, P. P., Tritto, I., Cirillo, P., Condorelli, M., y Laherty, J. T.(1993) Evidence that mitochondrial respiration is a source of potentially toxic oxygen free radicals in intact rabbit hearts subjected to ischemia and reflow. *J.Biol.Chem.* 268:18532-18541
9. Ames, B. N., Shigenaga, M. K., y Hagen, T. M(1993) Oxidants, antioxidants, and the degenerative disease of aging. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 90:7915-7922

BIBLIOGRAFIA

10. Anbar, M. y Neta, P.(1967) A compilation of specific bimolecular rate constant for the reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals with inorganic and organic compounds in aqueous solution. *Int.J.Appl.Radiat.Isot.* 18:495-523
11. Andersen, J. K., Mo, J. Q., Hom, D. G, Lee, F. Y., Harnish, P., y Hamill, R. W.(1996) Effect of buthionine sulfoximine, a synthesis inhibitor of the antioxidant glutathione, on the murine nigrostriatal neurons. *J.Neurochem.* 67:2164-2171
12. Anderson, D. K. y Means, E. D(1988) Pretreatment with alpha-tocopherol enhances neurologic recovery after experimental spinal cord compression injury. *J.Neurotrauma* 5:61-67
13. Andersson, K. K., Vassort, C., Brennan, B. A., Que, L., Haavik, J., Flatmark, T., Gros, F., y Thibault, J.(1992) Purification and characterization of the blue-green rat phaeochromocytoma (PC12) tyrosine hydroxylase with a dopamine-Fe(III) complex. *Biochem.J.* 284:687-695
14. Auroma, O. I. y Halliwell, Barry(1989) Iron ion dependent modification of bases in DNA by the superoxide radical-generating system hypoxanthine/xanthine oxidase. *J.Biol.Chem.* 264:13024-13028
15. Aust, S. D. y Morehouse, L. A.(1985) Role of metals in oxygen radicals reactions. *Free Rad.Biol.Med.* 1:3-25
16. Ayala, A. y Cutler, R. G.(1996) The utilisation of 5-hydroxyl-2-amino valeric acid as a specific marker of oxidized arginine and prolines residues in proteins. *Free Rad.Biol.Med.* 21:65-80
17. Azzaro, A., King, J., Kotzuk, D., Schoepp, D., Frost, J., y Schochet, S.(1985) Guinea pig striatum as a model of human dopamine deamination: the role of monoamine oxidase isozyme ratio, localization and affinity for substrate in synaptic dopamine metabolism. *J.Neurochem.* 45:949-956
18. Bains, J. S. y Shaw, C. A.(1997) Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death. *Brain Res.Rev.* 25:335-358
19. Baker, R. D., Baker, S. S., LaRosa, K., Whitney, C., y Newburger, P. E.(1993) *Arch.Biochem.Biophys.* 304:53-57

20. Balijepalli, S., Tirumalai, P. S., Swamy, K. V, Boyd, M. R., Mielal, J. J., y Ravindranath, V.(1999) Rat brain thioltransferase: regional distribution, immunological characterization, and localization by fluorescent in situ hybridization. *J.Neurochem.* 72:1170-1178
21. Banon, M. J. y Roth, R. H(1983) Pharmacology of mesocortical dopamine neurons. *Pharmacol.Rev.* 35:53-68
22. Barker, Jane E., Heales, Simon J. R., Cassidy, Adrian, Bolaños, Juan P., Land, John M., y Clark, John B.(1996) Depletion of brain glutathione results in a decrease of glutathione reductase activity; an enzyme susceptible of oxidative damage. *Brain Research* 716:118-122
23. Baruchin, A., Naylor, E., Stricker, E. M, Zigmund, M. J., y Kaplan, B. B.(1990) Effect of a cold exposure on rat adrenal tyrosine hydroxylase: an analysis of RNA, protein and enzyme activity and cofactor levels. *J.Neurochem.* 54:1769-1775
24. Bast, A. K. y Goris, R. J. A.(1989) Oxidative stress, biochemistry and human disease. *Pharm.Week.Sci.Ed.* 11:199-206
25. Bauernfeind, J.(1984) Tocopherols in food. En: *Handbook of Vitamins* (Machlin, L. J.99-146New York: Marcel Dekker.
26. Bean, A. J. y Roth, R. H(1991) *J.Neurosci.* 11:2694
27. Beatrice, M. C., Stiers, D. L., y Pfeiffer, D. R.(1984) The role of glutathione in the retention of Ca^{2+} by liver mitochondria. *J.Biol.Chem.* 259:1279-1287
28. Behl, C., Davis, J., Cole, G. M, y Schubert, David(1992) Vitamin E protects nerve cells from amyloid-beta protei toxicity. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 186:944-950
29. Benzi, G. y Moretti, A.(1995) Age- and peroxidative stress-relate modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and the glutathione system. *Free Rad.Biol.Med.* 19:77-101
30. Benzi, G. y Moretti, A.(1995) Are reactive oxygen species involve in Alzheimer disease? *Neurobiol.Aging* 16:661-674
31. Berman, S. B. y Hastings, Teresa G.(1997) Inhibition of glutamate transport in synaptosomes by dopamine oxidation and reactive oxygen species. *J.Neurochem.* 69:1185-1195

BIBLIOGRAFIA

32. Blackburn, K. J., French, P. C., y Merrils, R. J.(1967) 5-Hydroxytryptamina uptake by rat brain in vitro. *Life Sci.* 6:1653-1663
33. Bondy, S. C.(1997) Free-radical-mediated toxic injury to the nervous system. En: *Free Radical Toxicology* (Wallace, K. D.221-248Washington: Taylor and Francis.
34. Boveris, A. y Chance, B.(1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem.J.* 134:707-716
35. Bowling, A. C., Schulz, J. B., Brown, R. H., y Beal, M. F.(1993) Superoxide dismutase activity, oxidative damage, and mitochondrial energy metabolism in familiar and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J.Neurochem.* 61:2322-2325
36. Brannan, T. S., Maker, H. S., Raes, I, y Weiss, C.(1980) Regional distribution of glutathione reductase in the adult rat brain. *Brain Res.* 200:474-477
37. Brown, L. R. y Wuthrich, K. A.(1977) A spin label study of lipid oxidation catalyzed by heme proteins. *Biochem.Biophys.Acta* 464:356-369
38. Buckman, T. D., Stuphin, M. S., y Mitrovic, B.(1993) Oxidative stress in a clonal cell line of neuronal origin: effects of antioxidants enzyme modulation. *J.Neurochem.* 60:2058
39. Burns, J. J.(1970) Water-soluble vitamins. II. Ascorbic acid (vitamin C). En: *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (Goodman, L. S. and Gilman, A.1665-1671New York: Macmillan.
40. Burns, R. S., Chiueh, C. C., Markey, S. P., Ebert, M. H., Jacobwitz, D. M., y Kopin, I. J.(1983) 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
41. Burton, G. W. y Ingold, K. U.(1989) Vitamin E as an in vitro and in vivo antioxidant. *Ann.N.Y.Acd.Sci.* 570:7-22
42. Butcher, S. P., Fairbrother, I. S., Kelly, J. S., y Arbuthnott, G. W.(1988) *J.Neurochem.* 50:346
43. Butcher, S. P., Fairbrother, I. S., Kelly, J. S., y Arbuthnott, G. W.(1990) Effects of selective monoamine oxidase inhibitors on the in vivo release

- and metabolism of dopamine in the rat striatum. *J.Neurochem.* 55:981-988
44. Calberg, I. y Mannervik, B.(1985) Glutathione reductase. *Meth.Enzymol.* 113:484-490
 45. Cass, W. A., Zaczeck, R., Flach, K. A., y Gerhardt, G. A.(1993) Clearance of exogenous dopamine in rat dorsal striatum and nucleus accumbens: role of metabolism and effects of locally applied uptake inhibitors. *J.Neurochem.* 61:2269-2278
 46. Cassarino, David S., Fall, Christopher, Swerdlow, Russell H., Smith, Trisha S., Halvorsen, Erik M., Miller, Scott W., Parks, Janice P., Parker, W. Parker, Jr., y Bennett, James P., Jr.(1997) Elevated reactive oxygen species and antioxidant enzyme activities in animal and cellular models of Parkinson's disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 1362:77-86
 47. Castaño, Angelica, Ayala, Antonio, Rodriguez-Gomez, Jose Antonio, de la Cruz, Cristina P., Revilla, Elisa, Cano, Josefina, y Machado, Alberto(1995) Increase in dopamine turnover and tyrosine hydroxylase enzyme in hippocampus of rats fed on low Selenium diet. *J.Neurosci.Res.* 42:684-691
 48. Castaño, Angelica, Cano, Josefina, y Machado, Alberto(1993) Low selenium diet affects monoamine turnover differentially in substantia nigra and striatum. *J.Neurochem.* 61:1302-1307
 49. Castaño, Angelica, Herrera, A. J., Cano, Josefina, y Machado, Alberto(1993) Effects of a short period of vitamin E-deficient diet in the turnover of different neurotransmitters in substantia nigra and striatum of the rat. *Neuroscience* 53:179-185
 50. Chang, M y Reddy, C. C.(1991) *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 81:1431-1436
 51. Chen, N. H., Xu, C., Coffey, L. L., y Reith, M. E. A.(1996) *Biochem.Pharmacol.* 51:563
 52. Cheramy, A., Leviel, V., y Glowinski, J.(1981) Dendritic release of dopamine in the substantia nigra. *Nature* 289:537-542
 53. Cohen, G.(1984) Oxy-radical toxicity in catecholamine neurons. *Neurotoxicology* 5:77-82

BIBLIOGRAFIA

54. Cohen, G.(1999) Cell signally and the sulfhydryl redox status. *J.Neurochem. Suppl*:
55. Cooper, A. J. L., Pulsinelli, W. A., y Duffy, T. E.(1980) Glutathione and ascorbate during ischemia and post-ischemic reperfusion in rat brain. *J.Neurochem.* 35:1242-1245
56. Cooper, Arthur J. L. y Kristal, Bruce S.(1997) Multiples roles of glutathione in the central nervous system. *Biol.Chem.* 378:793-802
57. Cotgrave, L. A., Modeus, P., y Orrenius, S.(1988) Host biochemical defense mechanism against prooxidants. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 28:189-212
58. Cragg, S., Rice, M. E., y Greenfield, S. A.(1997) *J.Neurophysiol.* 77:863
59. Crespi, F., Sharp, T., Maidment, N. T., y Marsden, C. A.(1984) Differential pulse voltametry: simultaneous in vivo measurement of ascorbic acid, catechols and 5-hydroxyindoles in the rat striatum. *Brain Res.* 322:135-138
60. Cubells, Joseph F., Rayport, Stephen, Rajendran, Geetha, y Sulzer, David(4-1994) Methamphetamine neurotoxicity involves vacuolation of endocytic organelles and dopamine-dependent intracelullar oxidative stress. *J.Neurosci.* 14:2260-2271
61. Cumming, P., Brown, E., Damsma, G., y Fibiger, H.(1992) Formation and clearance of interstitial metabolites of dopamine and serotonin in the rat striatum: an in vivo microdialysis study. *J.Neurochem.* 59:1905-1914
62. Damier, P., Hirsch, E. C., Zhang, P, Agid, Y., y Javoy-Agid, F.(1993) Glutathione peroxidase, glial cells and Parkinson's Disease. *Neuroscience* 52:6
63. Davis, G. C., Williams, A. C., Markey, S. P., Ebert, M. H., Caine, E. D., Reichert, C., y Kopin, I. J.(1979) Chronic parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiat.Res.* 1:649-654
64. de Marmol, Veronique, Ito, Shosuke, Bouchard, Brigitte, Libert, A., Wakamatsu, K., Ghanem, G., y Solano, Francisco(1996) Cysteine deprivation promotes eumelanogenesis in human melanoma cells. *Journal of Investigative Dermatology* 107:698-702

65. de Marmol, Veronique, Solano, Francisco, Sels, André, Huez, Georges, y Lejeune, Ferdinand(1993) Glutathione depletion increases tyrosinase activity in human melanoma cells. *Journal of Investigative Dermatology*
66. Desole, M. S., Miele, M., Enrico, P., Esposito, G., Fresu, L., De Natale, G., y Miele, E.(1991) Further investigations into the relationship between the dopaminergic system and ascorbic acid and uric acid in the rat striatum. *Neurosci.Lett.* 205:97-100
67. Desole, M. S., Miele, M., Enrico, P., Esposito, G., Fresu, L., De Natale, G., y Miele, E.(1991) Investigations into the relationship between the dopaminergic system and ascorbic acid in rat striatum. *Neurosci.Lett.* 127:34-38
68. Dexter, D. T., Brooks, D. J., Harding, A. E., Burn, D. J., Muller, D. P. R., Goss-Sampson, M. A., Jenner, Peter, y Marsden, David C.(1994) Nigrostriatal function in vitamin E deficiency: Clinical, experimental and PET studies. *Ann.Neurol.* 35:298-303
69. Dexter, D. T., Carter, C. J., Wells, F. R., Javoy-Agid, F., Agid, Y., Lees, Andrew J., y Jenner, Peter(1989) Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. *J.Neurochem.* 52:381-389
70. Dexter, D. T., Jenner, Peter, Schapira, A. H., y Marsden, David C.(1992) Alterations in levels of iron, ferritin, and other trace metals in neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia. *Ann.Neurol.* 32:94-100
71. Dexter, D. T., Nanayakkara, I., Goss-Sampson, M. A., Muller, D. P. R., Harding, A. E., Marsden, David C., y Jenner, Peter(1994) Nigral dopaminergic cell loss in vitamin E deficient rats. *Neuroreport* 5:1773-1776
72. Dexter, D. T., Sian, J., Rose, S, Hindmarsh, J. G., Mann, V. M., Cooper, J. M., Wells, F. R., Daniel, Susan E, Lees, Andrew J., y Schapira, A. H.(1994) Indices of Oxidative stress and mitochondrial function in individuals with incidental Lewy body disease. *Ann.Neurol.* 35:38-44
73. Dexter, D. T., Ward, R. J., y Wells, F. R.(1992) *Ann.Neurol.* 32:591-593
74. Di Monte, D., Jewell, S. A., Ekstrom, G., Sandy, M. S., y Smith, M. T.(1986) MPTP and MPP+ cause rapid ATP depletion in isolated hepatocytes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 137:310-315

BIBLIOGRAFIA

75. Diaz, J., Levesque, D., Lammers, C. H., Griffon, N., Martres, M. P., Scharartz, J. C., y Sokoloff, P.(1995) Phenotypical characterisation of neurons expressing the dopamine D3 receptor in the rat brain. *Neuroscience* 65:731-745
76. Dickinson, S. D., Sabeti, J., Gaynor, A. L., Giardina, K., Rubinstein, M., Kelly, M. A., Grandy, D. K., Low, M. J., Gerhardt, G. A., y Zahniser, N. R.(1999) Dopamine D2 receptor-deficient mice exhibit decreased dopamine transporter function but no changes in dopamine release in dorsal striatum. *J.Neurochem.* 72:148-156
77. Diliberto, E. J. y Allen, P. L.(1981) Mechanism of dopamine- β -hydroxylation. *J.Biol.Chem.* 256:3385-3393
78. Drukarch, Benjamin, Jongenelen, Cornelis A. M., Schepens, Erik, Langeveld, Cornelis H., y Stoof, Johannes C.(10-1-1996) Glutathione is involved in the granular storage of dopamine in rat PC12 pheocromocytoma cells: implications for the pathogenesis of Parkinson's Disease. *J.Neurosci.* 16:6038-6045
79. Dunn, J. A., McChance, D. R., Thropew, S. R, Lyons, T. J., y Baynes, J. W.(1991) Age dependent accumulation of N-(carboxymethyl)lysine and N-(carboxymethyl)hydroxy-lysine in human skin collagen. *Biochem.* 30:1205-1210
80. Englard, S. y Seifter, S.(1986) The biochemical functions of ascorbic acid. *Ann.Rev.Nutr.* 6:365-406
81. Ernst, V., Levin, D. H., y London, I. M.(1978) Inhibition of protein synthesis initiation by oxidized glutathione. Activation of a protein kinase that phosphorylates the α -subunit of eukaryotic initiation factor 2. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 75:4110-4114
82. Fallon, J. H. and Loughlin, S. E.(1995) Substantia nigra. En: *The Rat Nervous System* (215-237Academic Press.
83. Faucon-Biguët, N., Buda, M., Lamouroux, A., Samolyk, D., y Mallet, J.(1986) Time course of the changes of TH mRNA in rat brain and adrenal medulla after a single injection of reserpine. *EMBO Journal* 5:286-291

84. Ferkany, J. W. y Coyle, J. T.(1983) Kainic acid selectively stimulates the release of endogenous excitatory acidic amino acids. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 225:399-406
85. Ferkany, J. W., Zaczeck, R., y Coyle, J. T.(1982) Kainic acid stimulates excitatory amino acid neurotransmitter release at presynaptic receptors. *Nature* 298:757-759
86. Fitzpatrick, P. F., Chlumsky, L. J., Daubner, S. C., y O'Malley, K. L.(1990) Expression of rat tyrosine hydroxylase in insect tissue culture cells and purification and characterization of cloned enzyme. *J.Biol.Chem.* 265:2042-2047
87. Flohe, L.(1979) Glutathione peroxidase. Fact and fiction. En: *Oxygen Free Radicals and Tissue Damage. CIBA Foundation Symposium*,vol. 65 (95-122Amsterdam: Elsevier.
88. Foote, C. S., Clough, R. L., and Yee, B. G.(1978) Photo-oxidation of tocopherols. En: *Tocopherol, Oxygen and Biomembranes* (deDuve, C. and Hayashi, O.13-21Amsterdam: Elsevier.
89. Fornstedt, B. y Carlsson, A(1991) Vitamin C deficiency facilitates 5-S-cysteinyl dopamine formation in guinea pig striatum. *J.Neurochem.* 56:407-414
90. Forstrom, J. W., Zakowki, J., y Tappel, A. L.(1978) Identification of the catalytic site of rat liver glutathione peroxidase as selenocysteine. *Biochem.* 17:2639-2644
91. Fossom, L. H., Sterling, C. R., y Tank, A. W.(1992) Regulation of tyrosine hydroxylase gene transcription rate and tyrosine hydroxylase mRNA stability by cyclic AMP and glucocorticoid. *Mol.Pharmacol.* 42:898-908
92. Freeman, B. A. y Crapo, J. D.(1982) Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab.Invest.* 47:412-426
93. Fridovich, I.(1974) Superoxide dismutases. *Advanc.Enzymol.* 41:35-97
94. García-Muñoz, M. y Groves, P. M.(1992) Presynaptic long-term changes in excitability of the corticostriatal pathway. *Neuroreport* 3:357-360
95. García-Muñoz, M., Young, S. J., y Groves, P. M.(1991) Terminal excitability of the corticostriatal pathway. Regulation by glutamate receptors stimulation. *Brain Res.* 551:195-215

BIBLIOGRAFIA

96. Garris, P. A., Walker, Q. D., y Wightman, R. M.(1995) Decrease in dopamine release and uptake rates in the partial denervated striatum are proportional to the loss of dopamine terminals. *Soc.Neurosci.Abstr.* 21:1245
97. Gasser, T., Wszolek, Z. K., y Trofatter, J(1994) Genetic studies in autosomal dominant parkinsonism: evaluation of seven candidates genes. *Ann.Neurol.* 36:387-396
98. Gerfen, C. R.(1992) The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization. *Trends Neurosci.* 15:133-139
99. Gerlach, M., Ben-Sachar, D., Riederer, P, y Youdim, M. B. H.(1994) Altered brain metabolism of iron as a cause for neurodegenerative disease? *J.Neurochem.* 63:793-807
100. Girbe, F., Ramassamy, C., Piton, C., y Costentin, J.(1994) Ascorbic acid increases synaptosomal potassium- induced dopamine release. *Neuroreport* 5:1027-1029
101. Giros, B., El Mestikawy, S., Bertrand, L., y Caron, M. G.(1991) Cloning and functional characterization of a cocaine-sensitive dopamine transporter. *FEBS lett.* 295:149-154
102. Giros, B., El Mestikawy, S., Godinot, N., Zheng, K., Han, H., Yang-Fen, T., y Caron, M. G.(1992) Cloning, pharmacological characterization and chromosome assignment of the human dopamine transporter. *Mol.Pharmacol.* 42:383-390
103. Giros, B., Jaber, M., Jones, S. R., Wightman, R. M., y Caron, M. G.(1996) Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature* 379:606-612
104. Glembotski, C. C., Manaker, S., Winokur, A., y Gibson, T. R.(1986) Ascorbic acid increases the thyrotropin-releasing hormone content of hypothalamic cell cultures. *J.Neurosci.* 6:1796-1802
105. Glover, V. y Sandler, M.(1986) Clinical chemistry of monoamine oxidase. *Cell Biochem.Funct.* 4:89-97
106. Golbe, L. I. and Langston, J. W.(1993) The etiology of Parkinson's Disease: new directions for research. En: *Parkinson's disease and*

- movement disorders (Jankovic, J. and Tolosa, E.93-102 Baltimore: Williams and Wilkins.
107. Goss-Sampson, M. A., MacEvilly, C. J., y Muller, D. P. R.(1988) Longitudinal studies of the neurobiology of vitamin E and other antioxidant systems, and neurological function in the vitamin E deficient rat. *J.Neurol.Sci.* 87:25-35
 108. Gotz, M. E., Kuning, G., y Riederer, P(1994) Oxidative stress: free radical production in neural degeneration. *Pharmacol.Ther.* 63:37-122
 109. Graham, D. G., Tiffany, S. M., Bell, W. R, y Gutknecht, W. F.(1978) Autoxidation versus covalent binding of quinones as the mechanism of toxicity of dopamine, 6-hydroxydopamine and related compound towards C1300 neuroblastomas *in vivo*. *Mol.Pharmacol.* 14:644-653
 110. Grima, B., Lamouroux, A., Blanot, F., Faucon-Biguët, N., y Mallet, J.(1985) Complete code sequence of a rat tyrosine hydroxylase mRNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 82:671-682
 111. Grunewald, R. A.(1993) Ascorbic acid in the brain. *Brain Res.Rev.* 18:123-133
 112. Guidot, D. M., McCord, J. M., Wright, R. M, y Repine, J. E.(1993) Absence of electron transport (Rho^o state) restore growth of a manganese-superoxide dismutase-deficient *saccharomyces cerevisiae* in hyperoxia: Evidence for electron transport as a major source of superoxide generation *in vivo*. *J.Biol.Chem.* 268:26699-26703
 113. Gunter, T. E., Gunter, K. K., Sheu, S. S, y Gavin, C. E.(1994) Mitochondrial calcium transport; Physiological and pathological relevance. *Am.J.Physiol.* 267:C313-C339
 114. Gutteridge, J. M.(1978) The membrane effects of vitamin E, cholesterol and their acetates on peroxidative susceptibility. *Res.Commun.Chem.Pathol.Pharmacol.* 22:563-572
 115. Haavik, J., Le Bourdelles, B., Martinez, A., Flatmark, T., y Mallet, J.(1991) Recombinant human tyrosine hydroxylase isoenzymes. Reconstitution with iron and inhibitory effect of other metal ions. *Eur.J.Biochem.* 199:371-378

BIBLIOGRAFIA

116. Halliwell, Barry(1992) Reactive oxygen species and the central nervous system. *J.Neurochem.* 59:1609-1623
117. Halliwell, Barry(1995) Antioxidant characterization: methodology and mechanism. *Biochem.Pharmacol.* 49:1341-1348
118. Halliwell, Barry y Gutteride, J. C.(1985) Oxygen radicals and the nervous system. *Trends Neurosci.* 8:22-26
119. Halliwell, Barry and Gutteride, J. C.(1989) *Free Radicals in Biology and Medicine.* Oxford: Claredon Press.
120. Hantraye, P., Guibert, B., Biguet, N. F, Lavergne, A., y Leviel, V.(1994) TH mRNA over-expression in rats with chronic excitotoxic striatal lesions. *Neuroreport* 5:2621-2624
121. Harman, D.(1956) Aging: A theory based on free radicals and radiation biology. *J.Gerontol.* 11:298-300
122. Harrington, K. A., Augood, S. J., Kingsbury, A. E, Foster, O. J. F., y Emson, P. C.(1996) Dopamine transporter (DAT) and synaptic vesicle amine transporter (VMAT2) gene expression in the substantia nigra of control and Parkinson's Disease. *Mol.Brain Res.* 36:157-162
123. Hasegawa, J., Noguchi, N., Sawaguchi, M., Doi, T., Hisatome, I., Kotake, H., y Mashiba, H.(1990) Bunazosin induces use-dependent slowing of conduction in guinea-pig ventricular myocardium. *Eur.J.Pharmacol.* 191:369-373
124. Haugaard, N.(1968) Cellular mechanism of oxygen toxicity. *Physiol.Rev.* 48:311-345
125. Heikkila, R. E. y Cabbat, F. S.(1983) Ascorbate induced lipid peroxidation and inhibition of (3H)spiroperidol binding in nigrostriatal membrane preparations. *J.Neurochem.* 41:1384-1392
126. Heikkila, R. E., Cabbat, F. S., y Manzino, L.(1982) Inhibitory effects of ascorbic acid on the binding of (3H)dopamine antagonist to neostriatal membrane preparations: relationship to lipid peroxidation. *J.Neurochem.* 38:1000-1006
127. Heikkila, R. E., Nicklas, W. J., Vays, I., y Duvoisin, R. C.(1985) 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
128. Herkenham, M., Little, M. D., Bankiewicz, K., Yang, S. C., Markey, S. P., y Johannessen, J. N.(1991) Selective retention of MPP⁺ within the monoaminergic systems of the primate brain following MPTP administration: an in vivo autoradiographic study. *Neuroscience* 40:133-158
 129. Hitri, A., Hurd, Y. L., Wyatt, R. J., y Deutsch, S. L.(1994) *Clin.Neuropharmacol.* 17:1
 130. Hockenbery, D. M., Oltvai, Z. N., Yin, X. M., Millian, C. L., y Korsmeyer, S. J.(1993) Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75:241-251
 131. Holz, R. W. y Coyle, J. T.(1974) The effects of various salts, temperature, and the alkaloids veratradine and batrachotoxin on the uptake of [3H]dopamine into synaptosomes from rat striatum. *Mol.Pharmacol.* 10:746-758
 132. Horellou, P., LeBourdelles, B., Clot-Humbert, J., Guibert, B., Leviel, V., y Mallet, J.(1988) Multiple human tyrosine hydroxylases enzymes generated through alternative splicing in *Xenopus* oocytes. *J.Neurochem.* 51:652-655
 133. Hoyt, K. R., Reynolds, I. J., y Hastings, Teresa G.(1997) Mechanism of dopamine-induced cell death in cultured rat forebrain neurons: interactions with a differences from glutamate-induced cell death. *Exp.Neurol.* 143:269-281
 134. Huang, J. y Philbert, M. A.(1996) Cellular responses of cultured cerebellar astrocytes to ethacrynic acid-induced perturbation of subcellular glutathione homeostasis. *Brain Res.* 711:184-192
 135. Ikeda, H., Markey, C. J., y Markey, S. P.(1992) Search for neurotoxins strusturally related to 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP⁺) in the pathogenesis of Parkinson's Disease. *Brain Res.* 575:285-298
 136. Imperato, A. y Chiara, G. D.(1985) Dopamine relese and metabolism in awake rats after systemic neuroleptic as studied transstriatal dialysis. *J.Neurosci.* 5:297

BIBLIOGRAFIA

137. Ito, S., Kato, T., y Fujita, K.(1988) Covalent binding of catechols to proteins through the sulphhydryl group. *Biochem.Pharmacol.* 37:1707-1710
138. Jain, A., Martensson, J., Stole, E, Auld, P. A. M., y Meister, A.(1991) Glutathione deficiency lead to mitochondrial damage in brain. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 88:1913-1917
139. Javitch, J. A., D'Amato, R. J., y Snyder, S. H.(1985) Parkinsonism-inducing MPTP: uptake of the metabolite MPP+ by dopamine neurones explains selective toxicity. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 82:2173-2177
140. Jenner, Peter(1994) Oxidative damage in neurodegenerative disease. *Lancet* 344:796-798
141. Jenner, Peter, Dexter, D. T., Sian, J., Schapira, A. H., y Marsden, David C.(1992) Oxidative stress as a cause of nigral cell death in ParKinson's disease and Incidental Lewy body disease. *Ann.Neurol.* 32:S82-S87
142. Jenner, Peter y Olanow, W.(1996) Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology* 47:S161-S170
143. Jones, S. R., Garris, P. A., y Wightman, R. M.(1995) *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 274:396
144. Jornot, L. y Junod, A.(1995) *Biochem.J.* 306:581-587
145. Jurma, O. P., Hom, D. G, y Andersen, J. K.(1997) Decreased glutathione results in a calcium-mediated cell death in PC12. *Free Rad.Biol.Med.* 23:1055-1066
146. Justice, J. B., Jr., Nicolaysen, L. C., y Michael, A. C.(1988) *J.Neurosci.Meth.* 22:239
147. Kane, D. J., Sarafin, T. A., Anton, R., Hahn, H., Gralla, E. B., Valentine, J. S., Ord, T., y Bredensen, D. E.(1993) Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science* 262:1274-1277
148. Kaneda, N., Sasaoka, T., Kobayashi, K, Kiuchi, K., Nagatsu, I., Kurosawa, Y., Fujita, K., Yokoyama, M., Nomura, T., Katsuki, M., y Nagatsu, T.(1991) Tissue-specific and high-level expression of the human tyrosine hydroxylase gene in transgenic mice. *Neuron* 6:583-594

149. Kasai, H., Crain, P. F., Kuchino, Y, Nishimura, S., Ootsuyama, A., y Tanooka, H.(1986) Formation of 8-hydroxyguanine moiety in cellular DNA by agents producing oxygen radicals and evidence for its repair. *Carcinogenesis* 7:1849-1851
150. Kass, G. E. N., Wright, J. M., Nicotera, P. K., y Orrenius, S.(1988) The mechanism of MPTP toxicity. Role of intracellular calcium. *Arch.Biochem.Biophys.* 260:789-797
151. Kaufman, S.(1977) Mixed function oxygenases. General considerations. En: *Structure and Function of Monoamine Enzymes* (Usdin, E, Weiner, N., and Youdim, M. B. H.3-22New York: Dekker.
152. Keller, R. V., Jr., Kuhr, W. G., Wightman, R. M., y Zigmond, M. J.(1988) *Brain Research* 447:191
153. Kim, E. Y., Koh, J. Y., Kim, Y. M., Sohn, S., Joe, E, y Gwag, B. J.(1999) Zn²⁺ entry produces oxidative neuronal necrosis in cortical cell cultures. *Eur.J.Neurosci.* 11:327-334
154. Kimura, K. y Sidhu, A.(1994) Ascorbic acid inhibits 125I-SCH 23982 binding but increases the affinity of dopamine for D1 dopamine receptors. *J.Neurochem.* 63:2093-2098
155. Knaack, D., Shen, I., Salpeter, M. M, y Podleski, T. R.(1986) Selective effects of ascorbic acid on acetylcholine receptor number and distribution. *J.Cell Biol.* 102:795-802
156. Knoll, J.(1993) The pharmacological basis of the beneficial effects of (-)deprenyl (selegiline) in Parkinson's and Alzheimer's diseases. *J.Neural.Transm.* 40:69-91
157. Kondo, K., Kurland, L. T., y Schull, W. J.(1973) Parkinson's disease, genetic analysis and evidence of a multifactorial etiology. *Mayo Clin.Proc.* 48:465-475
158. Kosower, N. S. y Kosower, E. M.(1978) The glutathione status of cells. *Int.Rev.Cytol.* 54:109-160
159. Kristal, Bruce S. y Dubinsky, J. M.(1997) Mitochondrial permeability transition in the central nervous system: Induction by calcium-cycling dependent and independent pathways. *J.Neurochem.* 69:524-538

BIBLIOGRAFIA

160. Krueger, B. K.(1990) Kinetics and block of dopamine uptake in synaptosomes from rat caudate nucleus. *J.Neurochem.* 55:260-267
161. Kuczenski, R. T. y Mandell, A. J.(1972) Regulatory properties of soluble and particulate rat brain tyrosine hydroxylase. *J.Biol.Chem.* 247:3114-3122
162. Kumar, R., Agarwal, A. K., y Seth, P. K(1995) Free radical-generated neurotoxicity of 6-hydroxydopamine. *J.Neurochem.* 64:1703-1707
163. Kumer, S. C. y Vrana, K. E.(1996) Intricate regulation of tyrosine hydroxylase activity and gene regulation. *J.Neurochem.* 67:443-462
164. Kuo, C. H., Hata, F., Yoshida, H., Yamatodani, A., y Wada, H.(1979) Effect of ascorbic acid on release of acetylcholine from synaptic vesicles prepared from different species of animals and release of noradrenaline from synaptic vesicles of rat brain. *Life Sci.* 24:911-916
165. LaBella, F. S. y Paul, G.(1965) Structure of collagen from human tendon as influenced by age and sex. *J.Gerontol.* 20:54-59
166. Lacey, M. G, Mercuri, N. B., y North, R. A.(1990) Actions of cocaine on rat dopaminergic neurons in vitro. *Br.J.Pharmacol.* 98:731-735
167. Lai, C. S., Grover, T. A., y Piette, L. H(1979) Hydroxyl radical production in a purified NADPH-cytochrome c (P₄₅₀) reductase system. *Arch.Biochem.* 193:373-378
168. Langston, J. W., Ballard, P., Tetrud, J. W., y Irwin, I.(1983) Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analogue synthesis. *Science* 219:979-980
169. Langston, J. W., Irwin, I., Langston, E. B., y Forno, L. S.(1984) Pargyline prevents MPTP-induced parkinsonism in primates. *Science* 225:1480-1482
170. Lapchack, P. A. y Hefti, F.(1992) BDNF and NGF in lesioned rats: effects on cholinergic function and weight gain. *Neuroreport* 3:405-408
171. Leedle, R. A. y Aust, S. D.(1990) The effect of glutathione on the vitamin E requirement for inhibition of liver microsomal lipid peroxidation. *Lipids* 25:241-245

172. Leist, M., Raab, B., Maurer, S, Rosick, U., y Brigelius-Flohe, R.(1996) Free Rad.Biol.Med. 21:297-306
173. Lenz, A. G., Costabel, U., Shaltiel, S., y Levine, R. L.(1989) Determination of carbonyl groups in oxidatively modified proteins by reduction with tritiated sodium borohydride. Anal.Biochem. 177:419-425
174. Leslie, F. M., Dunlap, C. E., y Cox, B. M.(1980) Ascorbate decreases ligand binding to neurotransmitter receptors. J.Neurochem. 34:219-221
175. Levine, M.(1986) New concepts in the biology and biochemistry of ascorbic acid. New Engl.J.Med. 314:892-901
176. Levine, R. L., Gradland, D., Oliver, C. N., Amici, A., Climet, I., Lenz, A. G., Ahn, B. W., Shaltiel, S., y Stadman, E. R.(1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. Methods Enzymol. 186:464-478
177. Lewy, R., Patel, A., Vaughn, R. A., Wilson, A., y Kuhar, M. J.(1992) Brain Res. 584:266
178. Li, Hong, Shen, Xue-Ming, y Dryhurst, Glenn(1998) Brain mitochondria catalyze the oxidation of 7-(2-aminoethyl)-3,4-dihydro-5-hydroxy-2H-1,4-Benzothiazine-3-Carboxylic acid (DHBT-1) to intermediates that irreversibly inhibit Complex I and scavenge glutathione. potential relevance to the pathogenesis of Parkinson's Disease. J.Neurochem. 71:2049-2062
179. Li, N. C., Gawron, O., y Basuas, G.(1954) Stability of zinc complexes with glutathione and oxidized glutathione. J.Am.Chem.Soc. 76:225-229
180. Li, N. C. y Manning, R. A.(1955) Some metal complexes of sulfur-containing amino-acids. J.Am.Chem.Soc. 77:5225-5228
181. Loplane, D., Attal, N., Sauron, B, Debilly, A., y Dubois, B.(1992) Lesions of basal ganglia due to disulfiram neurotoxicity. J.Neurol.Neurosurg.Psych. 55:925-929
182. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., y Randall, R. J.(1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J.Biol.Chem. 193:265-275
183. Mann, D. M. A., Yates, P. O., y Barton, C. M.(1977) Neuromelanin and RNA in cells of substantia nigra. J.Neuropathol.Exp.Neurol. 36:379-383

BIBLIOGRAFIA

184. Maret, W.(1994) Oxidative metal release from metallothionein via zinc-thiol/disulfide interchange. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 91:237-241
185. Maret, W.(1995) Metallothionein/disulfide interactions, oxidative stress, and the mobilization of cellular zinc. *Neurochem.Int.* 27:111-117
186. Martensson, J., Lai, J. C. K., y Meister, A.(1990) A high-affinity transport of glutathione is part of a multicomponent system essential for mitochondrial function. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 87:7185-7189
187. Martilla, R. J., Lorentz, H., y Rinne, U. K(1988) Oxygen toxicity protecting enzymes in Parkinson's disease: increase of superoxide dismutase-like activity in the substantia nigra and basal nucleus. *J.Neurol.Sci.* 86:321-331
188. Martinez, M., Ferrandiz, M. L., Diez, A, y Miquel, J.(1995) The depletion of cytosolic GSH decreases the ATP levels and viability of synaptosomes from aged mice but not from young mice. *Mech.Ageing Dev.* 84:77-81
189. Masserano, J. M. y Weiner, N.(1983) Tyrosine hydroxylase regulation in the central nervous system. *Molec.Cell.Biochem.* 53/54:129-152
190. McCay, P. B. and King, M. M.(1980) Vitamin E: its role as biologic free radicalscvenger and its relationship to the microsomal mixed-function oxidase system. En: *Vitamin E: a comprehensive treatise* (Machlin, L. J.289-317New York: Marcel Dekker.
191. Meiegerd, S. M. y Schenk, J. O.(1994) *J.Neurochem.* 62:998
192. Meister, A.(1989) On the biochemistry of glutathione. En: *Glutathion Centennial. molecular Perspectives and Clinical Implications* (Taniguchi, N., Higashi, T., Sakamoto, Y, and Meister, A.3-21San Diego,USA: Academic Press.
193. Meister, A.(1995) Mithochondrial changes associated with glutathione deficiency. *Biochem.Biophys.Acta* 1271:35-42
194. Meister, B. y Elde, R.(1993) Dopamine transporter mRNA in neurons of the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* 58:388-395
195. Menezes, A., Zeman, R., y Sabban, E(1999) Involvement of intracellular or extracellular calcium in activation of tyrosine Hydroxylase gene expression in PC12 cells. *J.Neurochem.* 67:2316-2324

196. Mercuri, N. B., Stratta, F., Calabresi, P., y Bernardi, G.(1991) Electrophysiological effect of amineptine on neurons of rat substantia nigra pars compacta: evidence for an inhibition of the dopamine-uptake system. *Br.J.Pharmacol.* 104:700-704
197. Mizuno, Y., Ikebe, S., Hatori, N., Kondo, T., Tanaka, M., y Ozawa, T.(1993) Mitochondrial energy crisis in Parkinson's disease. *Adv.Neurol.* 60:282-287
198. Mizuno, Y., Shimoda-Matsubayashi, S., Matsumine, H., Morikawa, N., Hattori, N., y Kondo, K.(1999) Genetic and enviromental factors in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Adv.Neurol.* 80:171-179
199. Morita, K., Teraoka, K., y Oka, M.(1987) 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
200. Muller, D. P. R., Lloyds, J. K., y Wolf, O. H.(1983) Vitamin E and neurological function. *Lancet* 1:225-228
201. Murrin, L. C., Morgenroth, V. H., y Roth, R. H.(1976) Dopaminergic neurons: effects of electrical stimulation on tyrosine hydroxylase. *Mol.Pharmacol.* 12:1070-1081
202. Nagatsu, T., Levitt, M., y Udenfriend, S.(1964) Tyrosine hydroxylase : the initial step in norepinephrine biosynthesis. *J.Biol.Chem.* 239:2910-2917
203. Nagendra, S. N., Shetty, K. T., Rao, K. M, y Rao, B. S. S. R.(1994) Effect of disulfiram administration on rat-brain glutathione metabolism. *Alcohol*
204. Naoi, M., Dostert, P., Yoshida, M., y Nagatsu, T.(1993) N-methylated tetrahydroisoquinolines as dopaminergic neurotoxins. *Adv.Neurol.* 60:212-217
205. Nelson, J. S.(1980) Pathology of vitamin E deficiency. En: *Vitamin E- a comprehensive treatise* (Machlin, L. J.397-428New York: Marcel-Dekker.
206. Ng, Y. C., Akera, T., Han, C. S., Braselton, W. E., Kennedy, R. H., Temma, K., Brody, T. M., y Sato, P. H.(1985) Ascorbic acid: an endogenous inhibitor of isolated Na⁺, K⁺-ATPase. *Biochem.Pharmacol.* 34:2525-2530

BIBLIOGRAFIA

207. Nicklas, W. J., Vyas, I., y Heikkila, R. E.(1985) Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by MPP+, a metabolite of the neurotoxin MPTP. *Life Sci.* 36:2503-2508
208. Nicotera, P. y Orrenius, S.(1994) Molecular mechanism of toxic cell death: an overview. *Meth.Toxicol.* 1B:2328
209. Niki, E.(1987) Interaction of ascorbate and alpha tocopherol. *Ann.N.Y.Acd.Sci.* 498:186-199
210. Niki, E., Saito, T., Kawakami, A., y Kamiya, Y.(1984) Inhibition of oxidation of methyl linoleato in solution by vitamin E and C. *J.Biol.Chem.* 259:4177-4182
211. Nishiki, K., Jamieson, D., Oshino, N., y Chance, B.(1976) Oxygen toxicity in the perfused rat liver and lung under hyperbaric conditions. *Biochem.J.* 160:343-355
212. Nissbrandt, H., Engberg, G., y Pileblad, E.(1991) *Naunyn-Schmied.Arch.Pharmacol.* 334:16
213. Obata, T. y Chiueh, T.(1992) In vivo trappingof hydroxyl free radicals in the striatum utilizing intracranial microdialysis perfusion of salicylate: effects of MPTP, MPDP+, MPP+. *J.Neurol.Transm.Gen.Sect.* 89:139-145
214. Ohta, S., Kohno, M., Makino, Y., Tachikawa, O., y Hirobe, M.(1987) Tetrahydroisoquinolines and 1-methyltetrahydro-isoquinoline are present in the human brain: relation to Parkinson's disease. *Biomed.Res.* 8:453-456
215. Olanow, W., Jenner, Peter, and Youdim, M. B. H.(1996) *Neurodegeneration and Neuroprotection in Parkinson's Disease.* London: Academic Press.
216. Oreland, L., Arau, Y., y Stenstrom, A(1983) The effect of Deprenyl on intra and extraneuronal dopamine oxidation. *Acta Neurol.Scand.* 95:S139-s146
217. Pacifici, R. E. y Davies, K. J. A.(1991) Protein, lipid and DNA repair system in oxidative stress: the free radical theoryof aging revisited. *Gerontology* 37:166-180

218. Parent, A.(1990) Extrinsic connections of the basal ganglia. A review. *TINS* 13:254-258
219. Passinetti, Giulio M., Lerner, S. A., Johnson, D. G., Morgan, David G., Telford, N. A., y Finch, Caleb E.(1989) Chronic lesions differentially decrease tyrosine hydroxylase messenger RNA in dopaminergic neurons of the substantia nigra. *Mol.Brain Res.* 5:203-209
220. Passinetti, Giulio M., Morgan, David G., Johnson, D. G., Lerner, S. A., Miyers, M. A., Poirier, J., y Finch, Caleb E.(1989) Combined in situ hybridisation and immunocytochemistry in the assay of the pharmacological effects on tyrosine hydroxylase mRNA concentration. *Pharmacol.Res.* 21:299-311
221. Passinetti, Giulio M., Morgan, David G., Johnson, Steven A., Millar, Sharon L, y Finch, Caleb E.(1990) Tyrosine hydroxylase mRNA concentration in midbrain dopaminergic neurons is differentially regulated by reserpine. *J.Neurochem.* 55:1793-1799
222. Passinetti, Giulio M., Osterburg, H. H., Kelly, A. B., Morgan, D. G., Reinhard, J. F., Stellwagen, R. H., y Finch, Caleb E.(1992) Slow changes of tyrosine hydroxylase gene expression in dopaminergic brain neurons after neurotoxin lesioning: a model for neuron aging. *Mol.Brain Res.* 13:63-73
223. Pauls, K. P. y Thompson, S. E.(1980) In vitro simulation of senescence-related membrane damage by ozone-induced lipid peroxidation. *Nature* 283:504-506
224. Paxinos, G. and Watson, C.(1986) *The rat brain in stereotaxic Coordinates.* London: Academic Press.
225. Pierce, R. C. y Rebec, G. V.(1993) Intraneostriatal administration of glutamate antagonists increases behavioural activation and decreases neostriatal ascorbate via non-dopaminergic mechanisms. *J.Neurosci.* 13:4272-4280
226. Pietronigro, D. D., Barrie, W., Jones, G, Kalty, K., y Demepoulos, H. B.(1977) Interaction of DNA and liposomes as a model for membrane-mediated DNA damage. *Nature* 267:78-79

BIBLIOGRAFIA

227. Pileblad, E., Slivka, A., Bravold, D., y Cohen, G.(1988) Studies on the autoxidation of dopamine: interaction with ascorbate. *Arch.Biochem.Biophys.* 263:447-452
228. Podmore, I. D., Griffiths, H. R., Herbert, K. E, Mistry, N., y Lunec, J.(1998) Vitamin c exhibits pro-oxidant properties. *Nature* 392:559
229. Putvinsky, A. V., Sokolov, A. I., Roschcupkin, D. I, y Vladimirov, Y. A.(1979) Electric breakdown of bilayer phospholipid membranes under ultraviolet-irradiation-induced lipid peroxidation. *FEBS lett.* 106:53-55
230. Rabinovic, A. D. y Hastings, Teresa G.(1998) Role of endogenous glutathione in the oxidation of dopamine. *J.Neurochem.* 71:2071-2078
231. Ramsey, A. J., Daubner, S. C., Ehrlich, J. I, y Fitzpatrick, P. F.(1995) Identification of iron ligands in tyrosine hydroxylase by mutagenesis of conserved histidyl residues. *Protein Sci.* 4:2082-2086
232. Ranade, S. S., Shan, S., y Haria, P.(1979) Transition metals in an experimental tumour system. *Experientia* 35:460-461
233. Ranjan, A., theodore, D., Haran, R. P, y Chandy, M. J.(1993) Ascorbic acid and focal ischemia in a primate model. *Acta Neurochir.* 123:87-91
234. Rebec, G. V., Centore, J. M., White, L. H., y Halloway, K. D.(1985) Ascorbic acid and the behavioral response to haloperidol: implications for the actions of antipsychotic drugs. *Science* 227:438-440
235. Rebec, G. V. y Pierce, C.(1994) A vitamin as neuromodulator: ascorbate release into the extracellular fluid of the brain regulates dopaminergic and glutamatergic transmission. *Progress in Neurobiology* 43:537-565
236. Reed, D. J. y Savage, M. K.(1995) Influence of metabolic inhibitors of mitochondrial permeability transition and glutathione status. *Biochem.Biophys.Acta* 1271:43-50
237. Reinhard, J. F., Jr., Smith, G. K., y Nichol, C. A.(1986) A rapid and sensitive assay for tyrosine-3-monooxygenase based upon the release of $^3\text{H}_2\text{O}$ and absorption of ^3H tyrosine by charcoal. *Life Sci.* 39:2185-2189
238. Reinier, A.(1986) The co-occurrence of substrate P-like immunoreactivity and dynorphin-like immunoreactivity in striatopallidal and striatonigral projections neurones in birds and reptiles. *Brain Res.* 139:164-168

239. Reinier, A. y Anderson, D. K.(1990) The patterns of neurotransmitter and neuropeptide co-occurrence among striatal projection neurons: conclusion based on recent findings. *Brain Res.* 15:251-265
240. Rice, M. E., Lee, J. K., y Choy, Y.(1995) High levels of ascorbic acid, not glutathione, in the CNS of anoxia tolerant reptiles, contrasted with levels in anoxia-intolerant species. *J.Neurochem.* 64:1790-1799
241. Rice, M. E., Perez-Pinzon, M. A., y Lee, E. J. K.(1994) Ascorbic acid, but not glutathione, is taken up by brain slices and preserves cell morphology. *J.Neurophysiol.* 71:1591-1596
242. Rice, M. E. y Russo-Menna, I.(1998) Differential compartmentalization of brain ascorbate and glutathione between neurons and glia. *Neuroscience* 82:1213-1223
243. Riederer, P, Youdim, M. B. H., Rausch, W. D., Birkmayer, W., Jellinger, K., y Seemann, D.(1978) On the mode of action of L-Deprenyl in the Human Central Nervous System. *J.Neurol.Trans.* 43:217-226
244. Riederer, P. y Wuketich, S.(1976) Time course of nigrostriatal degeneration in parkinson's disease. *J.Neurol.Trans.* 38:277-301
245. Robinson, T. E. y Whishaw, I. Q.(1988) Normalization of extracellular dopamine in striatum following recovery from a partial unilateral 6-OHDA lesion of the substantia nigra : a microdialysis study in freely moving rats. *Brain Res.* 450:209-224
246. Rodriguez-Gomez, Jose Antonio, Romero-Ramos, Marina, Vizquete, M. L., Venero, J. L., Cano, Josefina, y Machado, Alberto(1997) Increased activity and expression of tyrosine hydroxylase in the rat substantia nigra after chronic treatment with nomifensine. *Mol.Pharmacol.* 52:641-647
247. Roth, R. H. and Elsworth, J. D.(1995) *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress.* New York: Raven Press.
248. Saggi, H., Cooksey, J., Wells, F. R., Lees, Andrew J., Jenner, Peter, y Marsden, David C.(1989) A selective increase in particulate superoxide dismutase activity in parkinsonian substantia nigra. *J.Neurochem.*
249. Sanchez-Ramos, J. R., Overvik, E., y Ames, B. N.(1994) A Marker of oxyradical-mediated DNA damage (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine) is

BIBLIOGRAFIA

increased in nigro-striatum of Parkinson's disease brain. *Neurodegeneration* 3:197-204

250. Sano, M., Ernesto, C., Thomas, R. G., Klauber, M. R., Schafer, K., Grundman, M., Woodbury, P., Growdon, J., Cotman, C. W., Pfeiffer, E., Schneider, L. S., y Thal, L. J.(1997) A controlled trial of selegilina, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. *New Engl.J.Med.* 336:1216-1222
251. Santiago, M., Machado, Alberto, y Cano, Josefina(1993) *Eur.J.Pharmacol.* 239:83
252. Santiago, M., Machado, Alberto, y Cano, Josefina(1996) Nigral and striatal comparative study of neurotoxic action of 1- methyl-4-phenylpyridium ion: involvement of dopamine uptake system. *J.Neurochem.* 66:1182-1190
253. Santiago, M., Venero, J. L., Machado, Alberto, y Cano, Josefina(1992) In vivo protection of striatum from MPP+ neurotoxicity by N-methyl-D-aspartate antagonist. *Brain Res.* 586:203-207
254. Santiago, M. y Westerink, B. H. C.(1990) Characterization of the in vivo release of dopamine as recorded by different types of intracerebral microdialysis probes. *Naunyn Schmied Arch.Pharmacol.* 342:407-414
255. Santiago, M. y Westerink, B. H. C.(1991) The regulation of dopamine release from nigrostriatal neurons in conscious rats: the role of somatodendritic autorreceptors. *European Journal of Pharmacol* 204:79-85
256. Sato, S. M., Frazier, J. M., y Goldberg, A. M(1984) A kinetic study of the in vivo incorporation of ⁶⁵Zn into the rat hippocampus. *J.Neurosci.* 4:1671-1675
257. Satya-Murti, S., Howard, L., Krohel, G., y Wolf, B.(1986) The spectrum of neurologic disorder from vitamin E deficiency. *Neurology* 36:917-921
258. Schapira, A. H., Cooper, A. J. L., Dexter, D. T., Clark, John B., Jenner, Peter, y Marsden, David C.(1990) Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J.Neurochem.* 52:515-520

259. Schinder, A. F., Olson, E. C., Spitzer, N. C, y Montal, M.(1996) Mitochondrial dysfunction is a primary event in glutamate neurotoxicity. *J.Neurosci.* 16:6125-6133
260. Schoenberg, B. S.(1987) Epidemiology of movement disorders. En: *Movement disorders 2* (Fahn, S and Marsden, David C.17-32London, Butterworth Scientific.
261. Sciamanna, M. A. y Lee, C. P.(1993) Ischemia/reperfusion-induced injury of forebrain mitochondria and protection by ascorbate. *Arch.Biochem.Biophys.* 305:215-224
262. Sevanian, A. and McLeod, L.(1997) Formation and biological reactivity of lipid peroxidation products. En: *Free radical Toxicology* (Wallace, K. D.47-70Washington: Taylor and Francis.
263. Sherman, T. G. y Moody, C. A.(1994) Alterations in Tyrosine hydroxylase expression following partial lesions of the nigrostriatal bundle. *Mol.Brain Res.* 29:285-296
264. Shimada, S., Kitayama, S., Lin, C. L., Patel, A., Nanthakumar, E., Gregor, P., Kuhar, M. J., y Uhl, G.(1991) Cloning and expression of a cocaine-sensitive dopamine transporter complementary DNA. *Science* 254:576-578
265. Shores, M. M., White, S. S., Veith, R. C., y Szot, Patricia(1999) Tyrosine hydroxylase mRNA is increased in old age and norepinephrine uptake transporter mRNA is decreased in middle age in locus coeruleus of brown-norway rats. *Brain Research* 826:143-147
266. Sian, J., Dexter, D. T., Lees, Andrew J., Daniel, Susan E, Agid, Y., Javoy-Agid, F., Jenner, Peter, y Marsden, David C.(1994) Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. *Ann.Neurol.* 36:348-355
267. Sies, H., Bartoli, G. M., Burk, R. F., y Waydnas, C.(1978) Glutathione efflux from perfused rat liver after phenobarbital treatment, during drug oxidations and in selenium deficiency. *Eur.J.Biochem.* 89:113-118
268. Sies, H., Wendel, A., and Burk, R. F.(1981) Selenium and non-selenium glutathione peroxidases. *Enzymology and cell physiology.* En: *Proceedings of The Third International Symposium on Oxidase and*

BIBLIOGRAFIA

- Related Redox Systems (Kings, T. E., Mason, H. S., and Morrison, M. Academic Press.
269. Spencer, Jeremy P. E, Jenner, Peter, Daniel, Susan E, Lees, Andrew J., Marsden, David C., y Halliwell, Barry(1998) Conjugates of catecholamine with cysteine and GSH in Parkinson's Disease: possible mechanism of formation involving reactive oxygen species. *J.Neurochem.* 71:2112-2122
 270. Spencer, Jeremy P. E, Jenner, Peter, y Halliwell, Barry(1995) Superoxide dependent depletion of reduced glutathione by L-DOPA and dopamine. Relevance to parkinson's Disease. *Neuroreport* 6:1480-1484
 271. Spina, M. B. y Cohen, G.(1989) Dopamine turnover and glutathione oxidation: implications for Parkinson's Disease. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 86:1398-1400
 272. Stadman, E. R.(1992) Protein oxidation and aging. *Science* 257:1220-1224
 273. Stadtman, E. R.(1986) Oxidation of protein by mixed function oxidation system: implications in protein turnover, ageing and neurotrophil function. *Trends Biochem.Sci.* 11:11-12
 274. Stadtman, E. R.(1990) Metal-ion catalyzed oxidation of protein biochemical mechanism and biological consequences. *Free Rad.Biol.Med.* 9:315-325
 275. Steffen, V., Vizuite, M. L., Machado, Alberto, y Cano, Josefina(1993) The effect of a vitamin E deficient diet on amino acid levels in the substantia nigra, striatum and hippocampus of rats. *Life Sci.* 54:375-379
 276. Stephens, J. K., Masserano, J. M., Vulliet, P. R., Weiner, N., y Nakane, P. K.(1981) 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
 277. Sulzer, David, Maidment, N. T., y Rayport, Stephen(1993) Amphetamine and other weak bases act to promote reverse transport of dopamine in ventral midbrain neurons. *J.Neurochem.* 60:527

278. Tank, A. W., Lewis, E. J., Chikaraishi, D. M, y Weiner, N.(1985) Elevation of RNA coding for TH in rat adrenal gland by reserpine treatment and exposure to cold. *J.Neurochem.* 45:1030-1033
279. Tanner, C. M.(1989) The role of environmental toxins in the etiology of Parkinson's disease. *TINS* 12:49-54
280. Timmerman, W., Duvocobich, M. L., Westerink, B. H. C., de Vries, J. B., Tepper, P. G., y Horn, A. S.(1989) *Eur.J.Pharmacol.* 166:1
281. Timmerman, W., Westerink, B. H. C., de Vries, J. B., Tepper, P. G., y Horn, A. S.(1989) *Eur.J.Pharmacol.* 162:143
282. Tipton, K. F.(1985) Determination of monoamine oxidase. *Meth.Find.Expl.Pharmacol.* 7:361-367
283. Toffa, S., Kunikowska, G. M., Zeng, B. Y, Jenner, Peter, y Marsden, David C.(1997) Glutathione depletion in rat brain does not cause nigrostriatal pathway degeneration. *J.Neurol.Trans.* 104:67-75
284. Towbin, J., Staehlin, T., y Gordon, J(1981) Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioionated protein A. *Anal.Biochem.* 112:195-203
285. Trepanier, G., Furling, D., Puymirat, J, y Mirault, M. E.(1996) Immunocytochemical localization of seleno-glutathione peroxidase in the adult mouse brain. *Neuroscience* 75:231-243
286. Tse, D. C. S., McCreery, R. L., y Adams, R. N.(1976) Potential oxidative pathways of brain catecholamines. *J.Med.Chem.* 19:37-40
287. Turski, L., Bressler, K., Rettig, K. J., Löschmann, P. A, y Wachtel, H.(1991) Protection of substantia nigra from MPP+ neurotoxicity by N-methyl-D-aspartate antagonists. *Nature* 349:414-418
288. Usdin, T. B., Mezey, E., Chen, C., Brownstein, M. J., y Hoffman, B. J.(1991) Cloning of the cocaine-sensitive bovine dopamine transporter. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 88:11168-11171
289. Vaccari, A., Biasconi, R., y Timiras, P. S.(1983) Selective effects of neonatal hypothyroidism on monoamine oxidase activities in brain. *J.Neurochem.* 40:1019-1025

BIBLIOGRAFIA

290. Venero, J. L., Revuelta, M., Cano, Josefina, y Machado, Alberto(1997) Time course changes in the dopaminergic nigrostriatal system following transection of the medial forebrain bundle: detection of oxidatively modified proteins in substantia nigra. *J.Neurochem.* 68:2458-2468
291. Vicent, S., Hockfelt, T., Christenson, I, y Terenius, L.(1982) Immunohistochemical evidence for a dynorphin immunoreactive striatonigral pathway. *Eur.J.Pharmacol.* 85:251-252
292. Vizuete, M. L., Steffen, V., Machado, Alberto, y Cano, Josefina(1994) MPP+ has greater neurotoxic effect after Selenium deficiency than after vitamin E deficiency in rat striatum. *Eur.J.Pharmacol.* 270:183-187
293. Ward, N. E., Pierce, D. S., Chung, S. E, Gravitt, K. R., y O'Brian, C. A.(1998) Irreversible inactivation of protein Kinase C by glutathione. *J.Biol.Chem.* 273:12558-12566
294. Warner, H. R., Fernandes, G., y Wang, E(1994) A unifying hypothesis to explain the retardation of aging and tumorigenesis by caloric restriction. *J.Gerontol.* 50A:B107-B109
295. Wefers, H. y Sies, H.(1988) The protection by ascorbate and glutathione against microsomal lipid peroxidation is dependent on vitamin E. *Eur.J.Biochem.* 174:353-357
296. Weiser, M., Baker, H., y Joh, T. H.(1994) Gene expression in central cholinergic neurons in response to axotomy and deafferentation. *Synapse* 16:81-92
297. Weiser, M., Baker, H., Wessel, T. C., y Joh, T. H.(1993) Axotomy induced differential gene induction in neurons of the locus ceruleus and substantia nigra. *Mol.Brain Res.* 17:319-327
298. Westerink, B. H. C., Tuntler, J., Damsma, G., Rollema, H., y de Vries, J. B.(1987) *Naunyn Schmied Arch.Pharmacol.* 336:502
299. Westlund, K. N., Denney, R. M., Kochersperger, L. M, y Rose, R. M.(1985) Distinct monoamine oxidase A and B populations in primate brain. *Science* 230:181-183
300. White, R. J. y Reynolds, I. J(1996) Mitochondrial depolarization in glutamate-stimulated neurons. An early signal specific to excitotoxic exposure. *J.Neurosci.* 16:5688-5697

301. White, T. D. y Paton, D. M.(1972) Effects of external Na⁺ and K⁺ on the initial rates of noradrenaline uptake by synaptosomes prepared from rat brain. *Biochem.Biophys.Acta* 266:116-127
302. Williams, J. T. y Lacey, M. G(1989) Actions of cocaine on central monoamine neurons: intracellular recordings in vitro. *Natl.Inst.Drug Abuse Res.Monogr.Ser.* 90:234-242
303. Wills, E. D.(1969) Lipid peroxide formation in microsomes. The role of non-haem iron. *Biochem.J.* 113:325-332
304. Wilson, J. X. and Walz, W.(1988) Catecholamine uptake into cultured mouse astrocytes. En: *Trace Amines: Comparative and Clinical Neurobiology* (Boulton, A. A., Juorio, A. A., and Downer, R. G. R.301-305Clifton, NJ: Humana press.
305. Winterbourn, C. C. y Metodiewa, D.(1988) The reaction of superoxide with reduced glutathione. *Arch.Biochem.Biophys.* 314:284-290
306. Wolf, M. E. y Roth, R. H(1990) Autoreceptor regulation of dopamine synthesis. *Ann.N.Y.Acd.Sci.* 604:323-343
307. Worthington, D. J. y Rosemeyer, M. A.(1974) Human glutathione reductase: purification of the cristaline from erythrocytes. *Eur.J.Biochem.* 48:166-177
308. Yang, N. Y. J. and Desai, J. D.(1978) Glutathione peroxidase and vitamin E inter-relationship. En: *Tocopherol, Oxygen and Biomembranes* (deDuve, C. and Hayashi, O.233-245Amsterdam: Elsevier.
309. Yehuda, S and Youdim, M. B. H.(1988) Brain iron deficiency. *Biochemistry and behaviour.* En: *Brain iron: Neurochemical and Behavioural Aspects* (Youdim, M. B. H.88-114London: Taylor and Francis.
310. Yoneda, Y. y Ogita, K.(1991) Neurochemical aspect of the N-methyl-D-aspartate receptor complex. *Neurosci.Res.* 10:1-33
311. Yoshida, S., Busto, R., Watson, B. D, Santiso, M., y Ginsberg, M. D.(1985) Postschismic cerebral lipid peroxidation in vitro: modification by dietary vitamin E. *J.Neurochem.* 44:1593-1601

BIBLIOGRAFIA

- 312. Yu, P. H.(1986) Monoamine oxidase. En: Neurotransmitters enzymes (Boulton, A. A., Baker, G. B., and Yu, P. H235-272New Jersey: Humana Press.
- 313. Zaman, K. and Ratan, R.(1997) Glutathione and regulation of apoptosis in the nervous system. En: Glutathione in the Nervous System (Shaw, C. A.Washington: Taylor and Francis.
- 314. Zeevalk, G. D., Bernard, L. P., Albers, D. S., Mirochnitchenko, O., Nicklas, W. J., y Sonsallá, P.(1997) Energy stress-induced dopamine loss in glutathione peroxidase-overexpressing transgenic mice and in glutathione-depleted mesencephalic cultures. J.Neurochem. 68:426-429
- 315. Zetterström, T., Sharp, T, y Ungersted, U.(1993) Effect of neuroleptic drugs on striatal dopamine release and metabolism in the awake rat studied by intracerebral microdialysis. Eur.J.Pharmacol. 106:27
- 316. Zetterström, T., Sharp, T., y Ungersted, T.(1985) Effect of neuroleptic drugs on striatal dopamine release and metabolism in the awake rats studied by intracerebral dialysis. Eur.J.Pharmacol. 106:27-37
- 317. Zigmond, M. J., Abercrombie, E. D., Berger, T. W., and Stricker, E. M(1993) Compensatory response to partial loss of dopaminergic neurons: Studies with 6-hydroxydopamine. En: Current Concepts in Parkinson's Disease Research (Schneider, J. S. and Gupta, M.Toronto: Hogefre and Huber.
- 318. Zigmond, M. J., Acheson, A. L., Stachowiak, M. K., y Stricker, E. M(1984) Neurochemical compensation after nigrostriatal injury in animal model of preclinical parkinsonism. Arch.Neurol. 41:856-890

[Handwritten signatures and scribbles]

MARINA LUMERO RAMOS
EFFECTO DE LA DISMINUCION DE LA CAPACIDAD DE
PROTECCION FRENTE A EXTRACTOS SOBRE EL SISTEMA
DOPAMINERGICO NIGRO-ESTRIADO
SOPRESALIENTE CON LAURE