

R-14540

T. 1079

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, BROMATOLOGÍA,  
TOXICOLOGÍA Y MEDICINA LEGAL.

FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

**EFFECTO PROTECTOR DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES Y  
NEUROPROTECTORES (MELATONINA Y 1-  
METILTETRAISOQUINOLINA) SOBRE LA DISFUNCIÓN  
MITOCONDRIAL, SÍNTESIS DE PROTEÍNAS Y ESTRÉS  
OXIDATIVO.**

7-

106

17-09-2001

Clara Raffo

**El Hadi Absi**

26/10/01

119046406

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, BROMATOLOGÍA,  
TOXICOLOGÍA Y MEDICINA LEGAL.

FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

**Tesis que presenta el Ldo. El Hadi Absi para optar al grado de  
Doctor en Biología.**

**Fdo. El Hadi Absi**

Fdo. Los Directores:

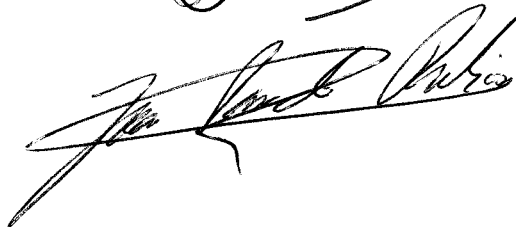
Dr. Alberto Machado de la Quintana



Dr. Antonio Ayala Gómez



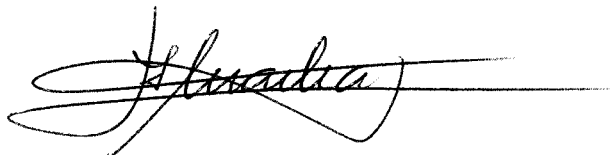
Dr. Juan Parrado Rubio



Alberto Machado de la Quintana Director del Departamento de Bioquímica, Bromatología, Toxicología y Medicina Legal de la Universidad de Sevilla.

**CERTIFICA:** Que la tesis doctoral titulada **“Efecto protector de compuestos antioxidantes y neuroprotectores (melatonina y 1-MeTIQ) sobre la disfunción mitocondrial, síntesis de proteínas y estrés oxidativo.”** presentada por el Ldo. **EL HADI ABSI** para optar al grado de Doctor en Biología, 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 conste, firmo el presente certificado en Sevilla, a 23 de Julio de 2001.

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

Fdo. Dr. Alberto Machado de la Quintana.

A la memoria de mi hermana (Amina) y a mis padres.

## **AGRADECIMIENTOS.**

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a:

Dr. Alberto Machado por la oportunidad que me ofreció de realizar este trabajo bajo su dirección y a los Drs. Antonio Ayala y Juan Parrado, quienes han sido unos excelentes directores. A todos quiero expresar mi más profundo agradecimiento por el conocimiento, capacidad de trabajo y experiencia que me han transmitido.

A los profesores: Josefina Cano, José Luis Venero, Consuelo Santa Maria, Juan Bautista, Javier Vitorica, Elisa Revilla, Martiniano Santiago, por sus consejos y buena disposición en todo momento.

A los compañeros del departamento: Antonio J, Angélica, Blanca, Diego, Esperanza, Mayka, Mari Cruz, Miguel, Mohammed, Paco, J. Antonio, Inma, J.Carlos, J.Pedro, Leila, Marisa, Mati, Marina, Monica, Sandro, Sonia, Pepe, Rachid, Rocio, por los momentos de amistad compartidos dentro y fuera del departamento.

A Enrique Fontiveros por su colaboración.

Finalmente, quiero agradecer a mis padres el apoyo material y moral que me han ofrecido durante estos años.

## ABREVIATURAS

AADA:	L-aminoácido aromático decarboxilasa.
Ac:	anticuerpo.
ADN:	ácido desoxirribonucleico.
ADP:	5'-difosfato de adenosina.
APS:	persulfato de amonio.
AAPH:	2,2'-Azobis (2-amidinopropano-hidrocloruro).
ARNm:	ácido ribonucleico mensajero.
ATP:	adenosil trifosfato
CO:	grupos carbonilos.
DNPH:	dinitrofenilhidrazina
DTT:	ditiotreitól.
FCCP:	carbonilcianuro p-trifluorometoxifenilhidrazona.
EDTA:	ácido etilen diamino tetraacético.
FE-2:	factor de elongación 2.
ERO:	especies reactivas de oxígeno.
FEA:	feniletilamina.
HC:	hidroperóxido de cumeno.
Hepes:	ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanol sulfónico
HFBA:	ácido heptafluorobutírico anhídrido.
KLH:	hemocianina de ojo de lapa.
MDA:	malondialdehído.
Mel:	melatonina
1-MeTIQ:	1-metil 1,2,3,4-tetrahidroisquinolina.
MPP <sup>+</sup> :	ion peridinio.
NADP <sup>+</sup> , NADPH:	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato y su forma reducida.
NO:	óxido nítrico.

PBS: tampón fosfato salino.  
PMSF: fenilmetanosulfonilo fluoruro.  
RL: radicales libres.  
SDS: dodecil sulfato sódico.  
TBA: ácido tiobarbitúrico.  
TCA: ácido tricloroacético.  
TEMED: N,N,N',N'-tetrametileno-etilenodiamina.  
Tris: tris-(Hidroximetil)-aminometano.

## ÍNDICE



## **1.- INTRODUCCIÓN.**

1.1.- Especies Reactivas de Oxígeno y estrés oxidativo.

1.2.- Fuentes intracelulares de ERO's: producción de estrés oxidativo por la mitocondria.

1.3.- Efecto de los RL sobre las biomoléculas.

1.3.1.- Peroxidación de lípidos.

1.3.2.- Oxidación del DNA.

1.3.3.- Oxidación de glúcidos.

1.3.4.- Oxidación de proteínas.

1.4.- Estrés oxidativo y envejecimiento.

1.4.1.- Proceso de envejecimiento.

1.4.2.- Inhibición de la síntesis de proteínas durante el envejecimiento.

1.5.- Estrés oxidativo y enfermedades neurodegenerativas.

1.5.1.- Enfermedad de Parkinson: Efecto del MPTP y otras neurotoxinas.

1.6.- Mecanismos de defensa frente al estrés oxidativo.

1.7.- Compuestos neuroprotectores: Función del compuesto 1-metil tetrahidroisoquinolina (1-MeTIQ).

## **2.- OBJETIVOS DEL ESTUDIO Y PLANTAMIENTO EXPERIMENTAL.**

## **3.- MATERIALES Y MÉTODOS.**

3.1.- Animales.

3.2.- Tratamientos.

3.3.- Aparatos.

3.4.- Reactivos.

3.5.- Métodos.

3.5.1.- Preparación de las mitocondrias hepáticas.

3.5.2.- Preparación de los sinaptosomas.

3.5.3.- Medida de la respiración mitocondrial.

3.5.4.- Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida-SDS.

3.5.5.- Transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa.

3.5.6.- Determinación de MDA.

- 3.5.7.- Determinación de los grupos carbonilos específicos.
  - 3.5.7.1.- Derivatización.
  - 3.5.7.2.- Inmunodetección de DNPH unida a los grupos carbonilos de las proteínas.
- 3.5.8.- Determinación espectrofotométrica de grupos carbonilos totales.
- 3.5.9.- Determinación de la capacidad antioxidante.
- 3.5.10.- Inyecciones intraestriatales e inmunocitoquímica.
  - 3.5.10.1.- Procedimiento quirúrgico.
  - 3.5.10.2.- Inmunocitoquímica.
- 3.5.11.- Producción de anticuerpos policlonales anti-factor de elongación 2.
- 3.5.12.- Inmunización de los animales con el péptido sintético unido a la proteína transportadora (KLH).
- 3.5.13.- Homogeneización de tejidos para ensayos del FE-2
- 3.5.14.- Inmudetección de la molécula de FE-2.
- 3.5.15.- Síntesis de 1-MeTIQ.
- 3.5.16.- Determinación de la actividad enzimática de la síntesis de 1-MeTIQ en distintas áreas del cerebro "in vivo".
- 3.5.17.- Extracción y cuatificación del 1-MeTIQ de suero por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC/MS).
- 3.5.18.- Medida de la recaptación de dopamina "in vitro".
- 3.5.19.- Hibridación in situ.
  - 3.5.19.1.- Obtención de la ribosonda.
  - 3.5.19.2.- Reacción de hibridación.
  - 3.5.19.3.- Análisis de la señal de hibridación y cuantificación.
- 3.5.20.- Determinación de la cantidad de proteínas.
- 3.5.21.- Análisis estadístico.

#### **4.- RESULTADOS.**

- 4.1.- Estudio del MPP<sup>+</sup> sobre la respiración mitocondrial y el daño oxidativo de lípidos y proteínas mitocondriales: Efecto de la melatonina y 1-MeTIQ.

4.1.1.- Estudio "in vitro" del efecto del MPP<sup>+</sup> sobre la respiración mitocondrial.

4.1.1.1.- Estudio "in vitro" del efecto de MPP<sup>+</sup> (metabolito del MPTP) sobre la respiración mitocondrial en mitocondrias aisladas de hígado.

4.1.1.2.- Efecto del MPP<sup>+</sup> en mitocondrias sinaptosomales de diferentes estructuras cerebrales.

4.1.2.- Efecto de la melatonina sobre la inhibición de la respiración mitocondrial producida por MPP<sup>+</sup>.

4.1.2.1.- Efecto de la melatonina sola sobre la respiración mitocondrial.

4.1.2.2.- Estudio "in vitro" de la melatonina sobre la inhibición de respiración mitocondrial inducida por MPP<sup>+</sup>.

4.1.2.2.1.- Efecto protector de la melatonina sobre la inhibición de respiración mitocondrial inducida por MPP<sup>+</sup> en mitocondrias hepáticas.

4.1.2.2.2.- Efecto protector de la melatonina sobre la inhibición de respiración mitocondrial inducida por MPP<sup>+</sup> en sinaptosomas estriatales.

4.1.2.3.- Estudio "in vivo" de la protección de melatonina sobre la acción tóxica del MPP<sup>+</sup> mediante inmunocitoquímica de TH.

4.1.3.- Efecto de 1-MeTIQ sobre la inhibición de la respiración mitocondrial producida por MPP<sup>+</sup>.

4.1.3.2.- Estudio "in vitro" del efecto del 1-MeTIQ sobre la inhibición de respiración mitocondrial inducida por MPP<sup>+</sup>.

4.1.3.2.1.- Efecto protector del 1-MeTIQ sobre la inhibición de respiración mitocondrial inducida por MPP<sup>+</sup> en mitocondrias hepáticas.

4.1.3.2.2.- Efecto protector del 1-MeTIQ sobre la inhibición de respiración mitocondrial producida por MPP<sup>+</sup> en sinaptosomas estriatales.

- 4.1.3.3.- Estudio "in vivo" del efecto protector del 1-MeTIQ frente a la toxicidad del MPP<sup>+</sup>: Inmunodetección de TH.
- 4.1.4.- Estrés oxidativo en lípidos y proteínas provocado por MPP<sup>+</sup> y su prevención por parte de la melatonina.
  - 4.1.4.1.- Estudio "in vitro" del estrés oxidativo en lípidos y proteínas mitocondriales producido MPP<sup>+</sup> y su prevención por parte de la melatonina.
    - 4.1.4.1.1.- Estrés oxidativo en lípidos mitocondriales.
    - 4.1.4.1.2.- Estrés oxidativo en proteínas mitocondriales.
  - 4.1.4.2.- Estudio "in vivo" del estrés oxidativo en lípidos y proteínas en el sistema dopaminérgico de ratas tratadas con MPP<sup>+</sup> y papel protector de la melatonina.
    - 4.1.4.2.1.- Niveles de MDA en estriado y sustancia negra de ratas tratadas con MPP<sup>+</sup>.
    - 4.1.4.2.2.- Grupos carbonilos totales y específicos en estriado y sustancia negra de ratas tratadas con MPP<sup>+</sup>.
- 4.1.5.- Medida de la capacidad antioxidante de 1- MeTIQ.
- 4.1.6.- Actividad MeTIQasa en distintas áreas cerebrales.
  - 4.1.6.1.- Medida de la actividad 1-MeTIQse en distintas áreas cerebrales en ratas jóvenes y viejas.
- 4.1.7.- Medidas en suero de enfermos de Parkinson: medida de los niveles de 1-MeTIQ, capacidad antioxidante, grupos carbonilos y MDA.
- 4.2.- Efecto de las oxidaciones sobre la síntesis de proteínas: efecto de la melatonina.
  - 4.2.1.- Estudio "in vitro" del efecto de diferentes agentes oxidantes sobre el FE-2: prevención por parte de la melatonina.
    - 4.2.1.1.- Efecto de diferentes agentes oxidantes sobre el FE-2, y sobre grupos carbonilos de proteínas específicas en homogeneizados hepáticos.
    - 4.2.1.2.- Efecto del HC sobre el FE-2 en cortes hepáticos y cerebrales.

4.2.1.3.- Efecto de distintos compuestos oxidantes sobre los niveles de MDA en homogeneizado de hígado y en cortes de tejido.

4.2.2.- Estudio "in vivo" del FE-2 y del estrés oxidativo en lípidos y proteínas: efecto protector de la melatonina.

4.2.2.1.- Alteración del FE-2 durante el envejecimiento: efecto de la melatonina.

4.2.2.2.- Efecto del envejecimiento sobre los niveles de proteínas oxidadas.

4.2.2.3.- Efecto del envejecimiento sobre los niveles de MDA: papel protector de la melatonina.

## **5.- DISCUSIÓN.**

5.1.- Efecto protector de melatonina frente a la acción del MPP<sup>+</sup>: protección de la cadena respiratoria.

5.2.- Efecto protector de 1-MeTIQ frente a la acción tóxica de MPP<sup>+</sup>: Medida de la preservación de la integridad celular y mitocondrial y de la actividad 1-MeTIQsa.

5.3.- Medida de 1-MeTIQ y algunos parámetros de estrés oxidativo en sueros de enfermos de Parkinson.

5.4.- Efecto protector de la melatonina sobre la síntesis de proteínas alterada por compuestos oxidantes y en el envejecimiento.

## **6.- CONCLUSIONES.**

## **7.- BIBLIOGRAFÍA.**

## **INTRODUCCIÓN**

## 1.- INTRODUCCIÓN.

### 1.1.- Especies Reactivas de Oxígeno y estrés oxidativo.

Durante el curso del metabolismo normal de los organismos aeróbicos, se producen inevitablemente **especies reactivas de oxígeno** (ERO's), las cuales incluyen radicales libres y compuestos no radicales como el agua oxigenada (Tabla 1).

Varias fuentes de ERO's existen en los organismos (Figura 1), siendo la cadena respiratoria y las reacciones de detoxificación los procesos metabólicos en los que más compuestos reactivos de oxígeno se producen (Schoenberg y Beger, 1995). El radical superóxido se forma por la reducción con un electrón del oxígeno mediada por enzimas tales como la NADPH oxidasa, xantina oxidasa (Krause, 2000; Aruoma y col., 1989; Suzuki y Schmid-Schonbein, 1999; Goldstein y col., 1982; Halliwell y Gutteridge, 1990a) o la cadena respiratoria (Nohl y Heinger, 1978; sohal, 1997). La vida media del ión superóxido en los tejidos depende de la presencia de la enzima superóxido dismutasa en los diferentes compartimentos celulares.

El radical hidroxilo (OH) es el más reactivo de todas las ERO's (Reiter, 1998; Olanow, 1990). Se forma in vivo por acción de las radiaciones (por ejemplo, rayos X) sobre la molécula de agua (Berlett y Stadtman, 1997) o a partir del agua oxigenada en una reacción catalizada por metales (Imlay y col., 1988; Halliwell y Gutteridge, 1990a). La radiación U.V. no tiene suficiente energía para romper la molécula de agua pero sí puede romper la molécula de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para dar el radical hidroxilo (Kuwabara y col., 1982). Debido a su alta reactividad, este radical reacciona inmediatamente con moléculas cercanas al sitio en que ha sido generado (Arouma y col., 1989).

$O_2^{\cdot-}$	<b>Radical Superoxido</b>
$OH\cdot$	<b>Radical Hidroxilo</b>
$ROO\cdot$	<b>Radical Peroxilo</b>
$H_2O_2$	<b>Peroxido de Hidrogeno</b>
$^1O_2$	<b>Oxigeno Singlete</b>
$NO\cdot$	<b>Oxido Nitrico</b>
$ONOO^-$	<b>Peroxinitrito</b>

**Tabla 1.** Especies reactivas de oxígeno generadas bajo condiciones fisiológicas y fisiopatológicas



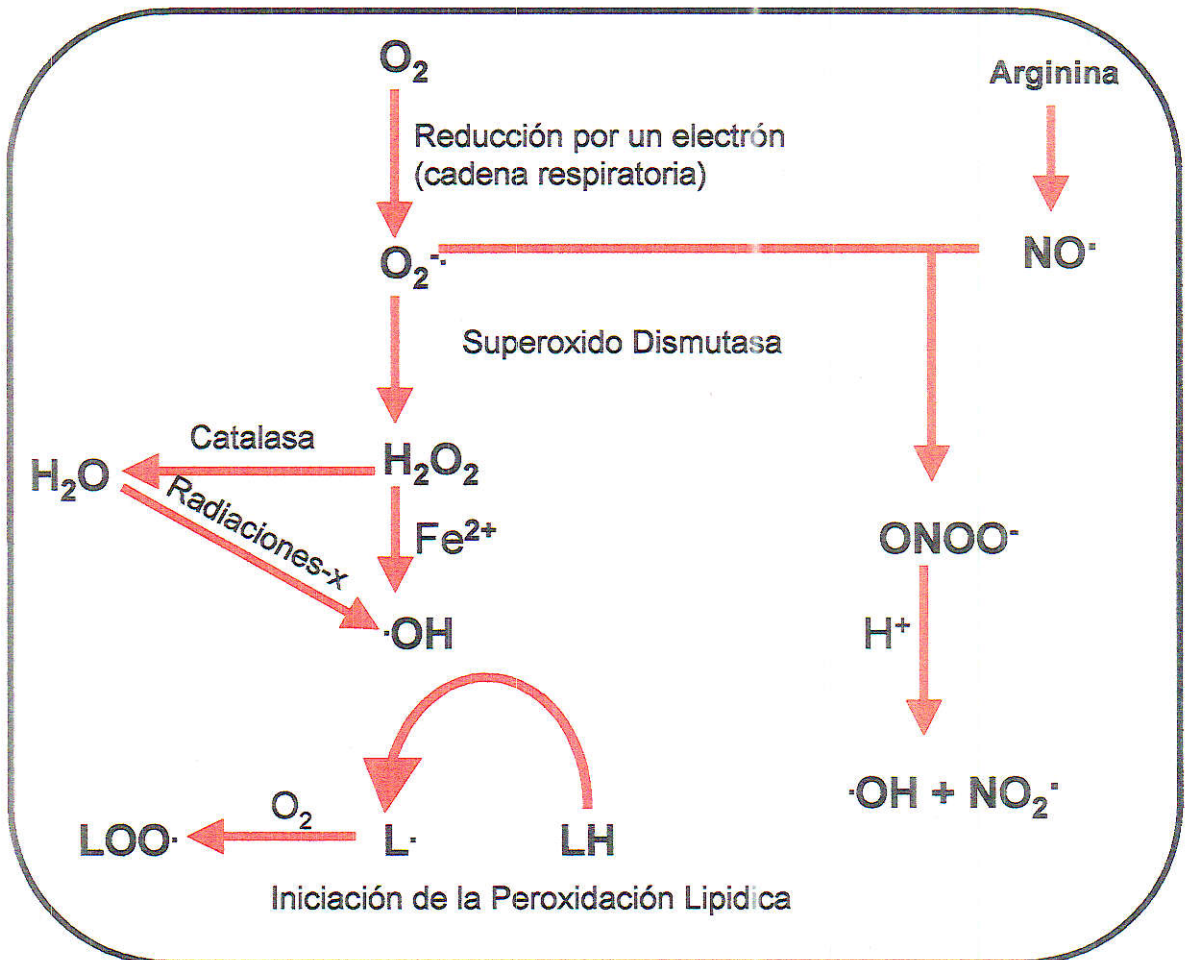


Figura 1. Rutas de formación de las especies reactivas de oxígeno.

El radical peroxilo ( $\text{ROO}\cdot$ ) puede ser generado en el proceso de peroxidación lipídica que se inicia por la eliminación de un átomo de hidrógeno de los ácidos grasos poliinsaturados (Fujita y Fujimoto, 1992). Otros productos generados en los procesos de peroxidación lipídica son los aldehídos (Uchida y col., 2000). La reacción de los aldehídos con los grupos aminos de péptidos y proteínas constituye uno de los mecanismos de modificación de las lipoproteínas (Arlt y col., 2000).

Las ERO's también se producen por los componentes del sistema inmune. Así, las células fagocíticas como los neutrófilos y los macrófagos generan  $\text{O}_2^-$  y óxido nítrico para eliminar agentes extraños (Krause, 2000; Crawford y col., 1994). Ambos compuestos pueden combinarse para formar peroxinitrito ( $\text{ONOO}\cdot$ ) (Myatt y col., 2000), una especie reactiva de oxígeno capaz de producir peroxidación lipídica en las lipoproteínas (Bloodsworth y col., 2000; Berliner y Heinecke, 1996).

Por otro lado hay que mencionar que además de estas fuentes internas de productos oxidantes, los organismos están expuestos a ERO's de origen externo tales como las quinonas de la dieta, los componentes del humo del tabaco, etc (Pryor, 1992).

Las especies reactivas de oxígeno son altamente perjudiciales a nivel celular y molecular y su extremada reactividad hace que ocasionen importantes alteraciones moleculares (Levine y col., 1993; Keherer, 1993). El conjunto de daños causados por las ERO's se denomina **estrés oxidativo**. El estado o grado de estrés oxidativo está determinado por la tasa de producción de ERO's, por el nivel de los sistemas antioxidantes y la velocidad a la que el daño es reparado (Figura 2). Actualmente, es ampliamente aceptado que aquellos individuos con elevado grado de estrés oxidativo presentan una mayor probabilidad de sufrir las denominadas enfermedad relacionadas con la edad (Berlett y Stadtman., 1997; Reiter y col., 1998).

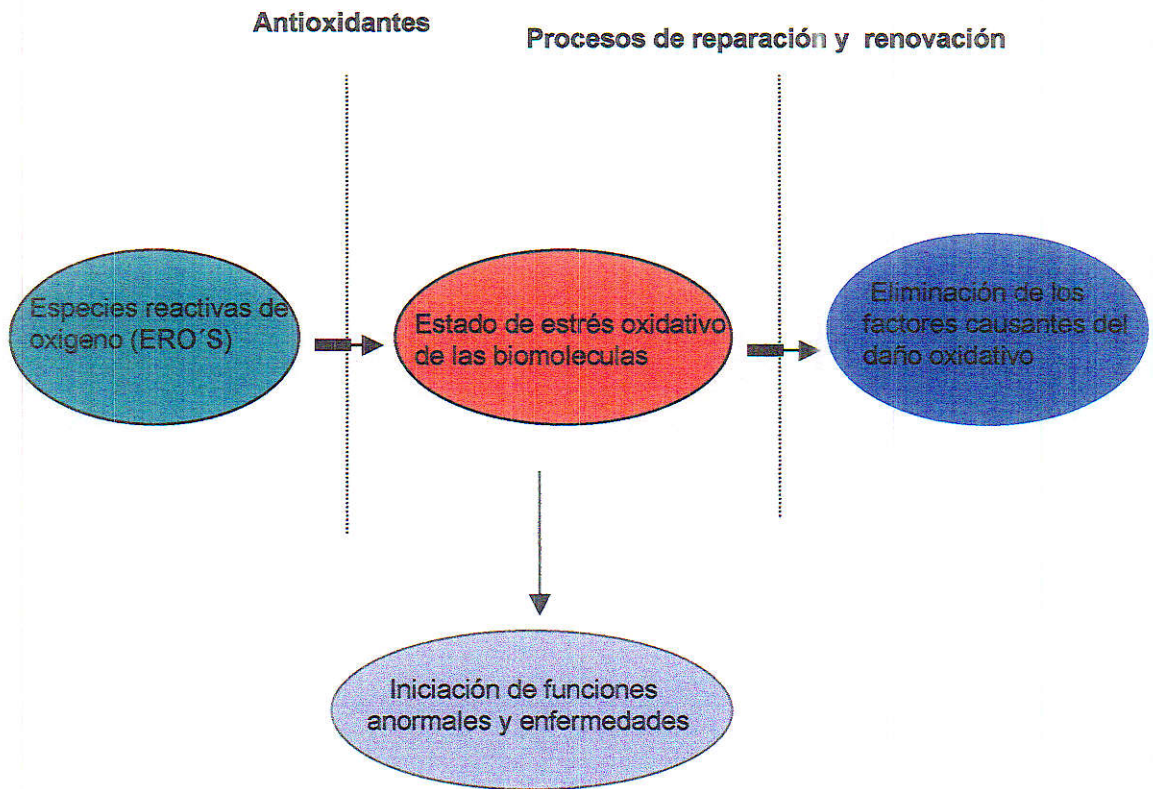


Figura 2. Factores que determinan el estado de estrés oxidativo

## **1.2.- Fuentes intracelulares de ERO's: producción de estrés oxidativo por la mitocondria.**

Aunque son varias las fuentes generadoras de ERO's, se considera que la mitocondria es la más importante. La mitocondria consume cerca del 90 % (Ramsey y col., 2000) del oxígeno que utiliza la célula. Cuando el oxígeno es utilizado en el metabolismo, la mayor parte finaliza combinado con el hidrógeno para formar agua, para lo cual se necesitan cuatro electrones (Figura 3). Cuando la mitocondria está funcionando, algunos de los electrones que pasan por la cadena respiratoria escapan de la secuencia normal de flujo y pasan directamente al oxígeno, formando ión superóxido; si el oxígeno toma un electrón, o agua oxigenada, cuando el oxígeno toma dos electrones. Bajo condiciones fisiológicas, entre el 1-5 % de oxígeno consumido por la mitocondria es convertido en ión superóxido y peróxido de hidrógeno (Chance y col., 1979; Richter y col., 1995). Los principales sitios en los que se producen estas ERO's son el complejo I (Turrens y Boveris, 1980; Hansford y col., 1997) y el complejo III (Nohl y col., 1996) (Figura 4), los cuales tienen ubiquinona como componente común. El complejo II constituido por succinato deshidrogenasa es muy poco activo en la producción de estas especies (Feuers, 1998).

La producción de ERO's por la mitocondria depende de su estatus metabólico, siendo esta producción fuertemente incrementada por la inhibición del transporte electrónico en la cadena respiratoria (Boveris y col., 1973; Turrens y col., 1980). Así, la ausencia de ADP que determina una baja tasa de respiración mitocondrial, produce una gran cantidad de agua oxigenada. De igual forma, la antimicina aumenta en gran medida la producción de agua oxigenada (Turrens y Boveris, 1980; Hasegawa y col., 1990a).

La producción de ERO's por la cadena respiratoria está implicada en varios procesos fisiológicos y patológicos, particularmente en el envejecimiento, las enfermedades degenerativas y el cáncer (Wallace y col., 1992a; Cortopassi y

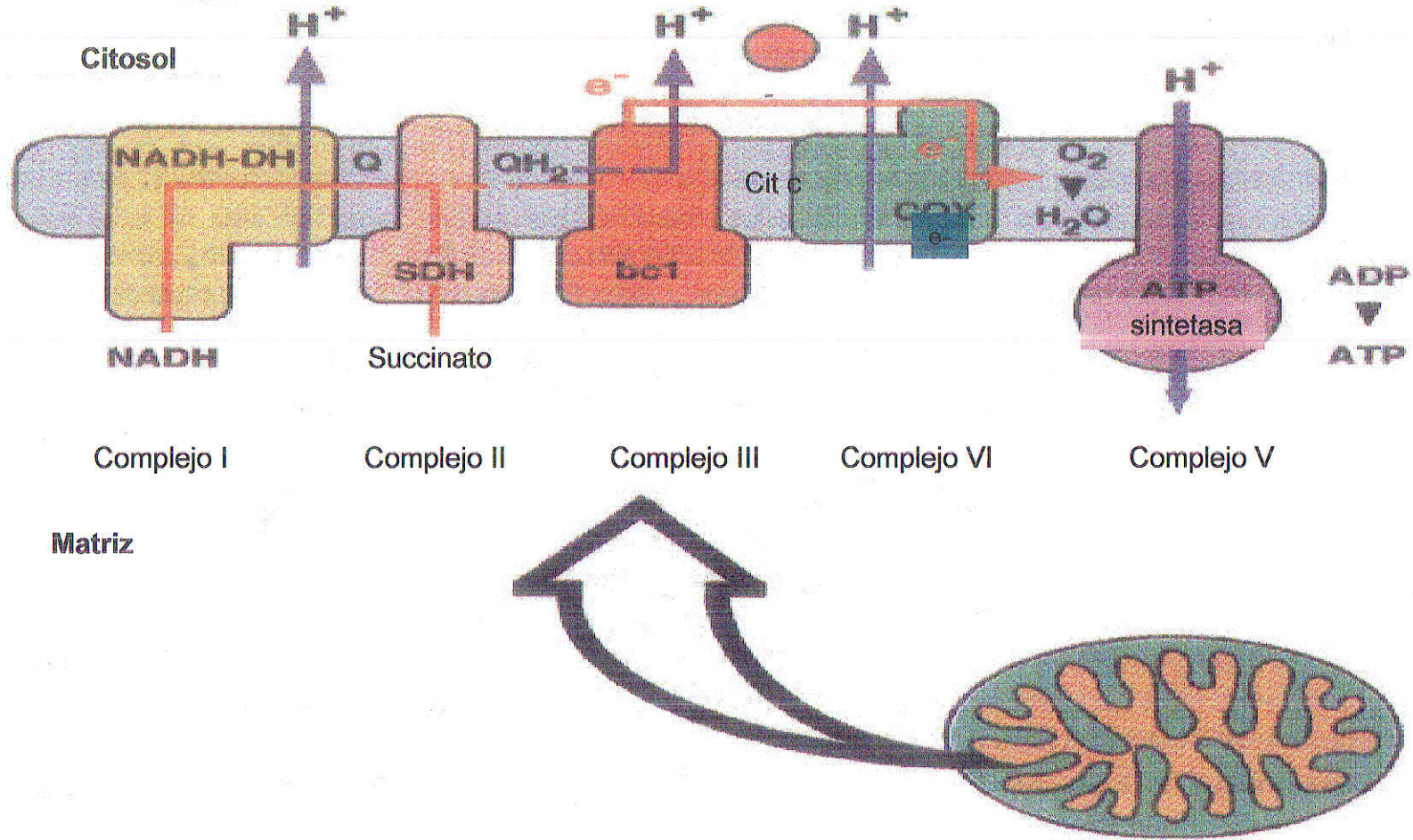


Figura 3. Estructura y función de la cadena respiratoria mitocondrial.

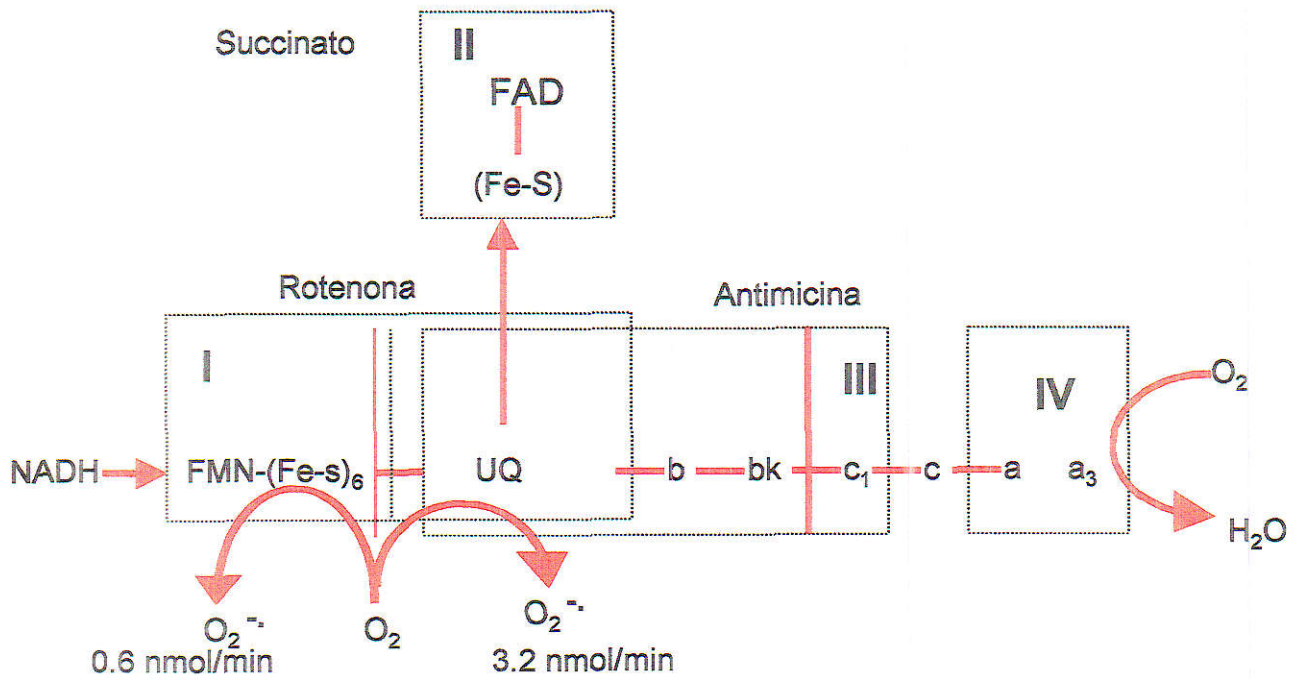


Figura 4. Esquema de los sitios y velocidad de producción del ión superóxido en la cadena respiratoria.

Arnheim, 1990; Ames y col., 1993; Shigenaga y col., 1994; Sohal y Dubey, 1994; Wang y Cortopassi, 1994; Ames y col., 1995; Cortopassi y Wang, 1995), si bien otros autores han descrito que la producción de ERO's en la mitocondria no es la causa inmediata del proceso de envejecimiento y lo relacionan con la disminución de los mecanismos protectores frente a los mismos (Forman y Azzi, 1997).

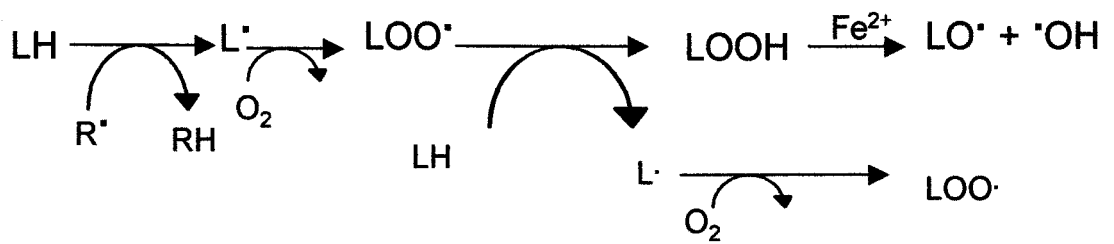
### **1.3.- Efecto de los RL sobre las biomoléculas.**

Las ERO's pueden dañar todo tipo de biomoléculas (lípidos, DNA, glúcidos y proteínas) y estos daños se consideran como mecanismos implicados en la iniciación o progresión de varias enfermedades (Markesbery y Carney, 1999). La reacción inicial genera un segundo radical, que puede reaccionar con una segunda macromolécula para continuar la cadena de reacciones (Mylonas y Kouretas, 1999; Sakac. V y Sakac.M, 2000).

#### **1.3.1.- Peroxidación de lípidos.**

Entre las moléculas más susceptibles al ataque de las ERO's están los ácidos grasos poliinsaturados. La reacción de peroxidación lipídica se inicia cuando el radical hidroxilo (OH) sustrae un átomo de hidrógeno de una molécula de ácido graso insaturado y crea un nuevo radical orgánico, el cual reacciona rápidamente con el oxígeno para dar un radical peroxilo (Figura 5). Este último puede atacar a una segunda molécula para producir un nuevo radical (Mylonas y Kouretas, 1999).

La peroxidación de lípidos presentes en las membranas biológicas alteran la fluidez, el potencial y la permeabilidad a los protones y otros iones y afectan ciertas proteínas de membrana como transportadores y enzimas (Benedetti y col., 1988; Halliwell y Gutteridge, 1990b), provocando roturas que liberan el contenido de las células y orgánulos, como las enzimas hidrolíticas lisosomales (Ollinger y Brunk, 1995; Yoshikawa y col., 1982). Además, la oxidación de los lípidos de la membrana plasmática por la acción oxidativo de las especies reactivas de oxígeno



**Figura 5.** Proceso de la peroxidación lipídica y su propagación



se relaciona con la aparición de varias enfermedades como arteriosclerosis, asma, Parkinson etc (Mylonas y Kouretas, 1999). Por otro lado, los peróxidos lipídicos y/o sus derivados aldehídicos citotóxicos pueden bloquear la acción de macrófagos, inhibir la síntesis de proteínas, destruir bacterias, inactivar enzimas, agregar proteínas, generar trombinas y actuar como agentes quimiotácticos para los fagocitos (Barrowcliffe y col., 1984; Esterbauer y col., 1988).

Para determinar el grado de oxidación lipídica de un tejido se suele determinar el malondialdehído (Ollinger y Brunk, 1995; Draper y Hadley, 1990) y el 4-hidroxinonenal, productos de la peroxidación (Figura 6) (Esterbauer y Cheeseman, 1990). La detección y la medida de la peroxidación de lípidos ha sido muy utilizada en el estudio del papel de los RL en distintas patologías (Markesbery y Carney, 1999).

### **1.3.2.- Oxidación del DNA.**

Los ácidos nucleicos también pueden ser atacados por las ERO's. El daño del DNA afecta a todos los niveles estructurales del ácido nucleico (Reiter, 1997; Hazlewood y Davies, 1996; Waters, 1992). Los radicales libres inducen cambios en la secuencia del DNA en forma de mutaciones puntuales, deleciones y amplificación de genes. Estos cambios pueden dar lugar a la activación de algunos proto-oncogenes y/o la inactivación de genes supresores de tumores. De hecho, existe un gran número de trabajos que indican la existencia de una relación estrecha entre las ROS y la carcinogénesis (Aimee y col., 2001). Uno de los productos de oxidación del DNA es la 8-hidroxioxo-2'-desoxiguanosina, cuya determinación en muestras biológicas ha sido usada como biomarcador de estrés oxidativo (Shigenaga y col., 1990; Bernstein, 1991).

Diversos estudios han puesto de manifiesto que el DNA mitocondrial es más vulnerable a las ERO's que el DNA nuclear (Richter, 1988). El DNA mitocondrial es particularmente susceptible al daño oxidativo, probablemente por la ausencia de histonas protectoras, por la capacidad de reparación limitada y su proximidad a

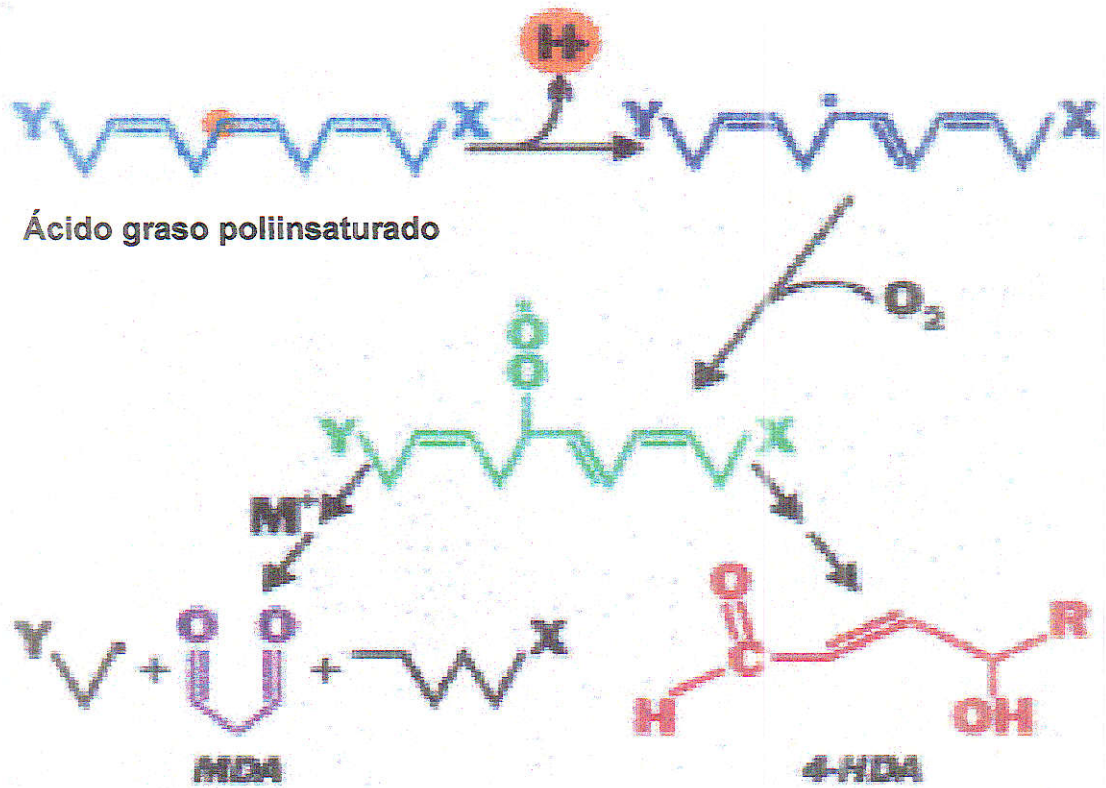


Figura 6. Reacciones de formación de los malondialdeído (MDA) y del 4-hidroxi-2,3-trans-nonenal (4-HDA) después de la reacción de iniciación de la peroxidación lipídica. M<sup>+</sup>: metales de transición.

la cadena de transporte electrónico (Linnane y col., 1989, Schoffner y Wallace 1990; Wallace y col., 1992b; Richter, 1988; Wallace y col., 1986). Este daño por oxidación en el DNA mitocondrial se ha relacionado con enfermedades específicas como la degeneración neuronal o las enfermedades cardiovasculares y el envejecimiento (Ames y col., 1993; Tritschter y Medori, 1993; Shigenaga y col., 1994; Wallace y col., 1992a).

### **1.3.3.- Oxidación de glúcidos.**

Los glúcidos son también dañados por las ERO's, pero en menor proporción que otras moléculas. Compuestos como la glucosa, el manitol, o ciertos desoxiazúcares pueden reaccionar con el radical hidroxilo para producir sustancias reactivas (Chace y col., 1991; Grootveld y col., 1991). Asimismo, los polisacáridos pueden sufrir el ataque de los radicales libres, en este caso, fragmentándose a unidades más sencillas (Frati y col., 1997; Moseley y col., 1997). Otros autores (Greenwald y Moy, 1980; Dunn y col., 1991) han demostrado que el ácido hialurónico se despolimeriza en presencia de concentraciones elevadas de radical hidroxilo, provocando un descenso de la viscosidad del líquido sinovial de las articulaciones.

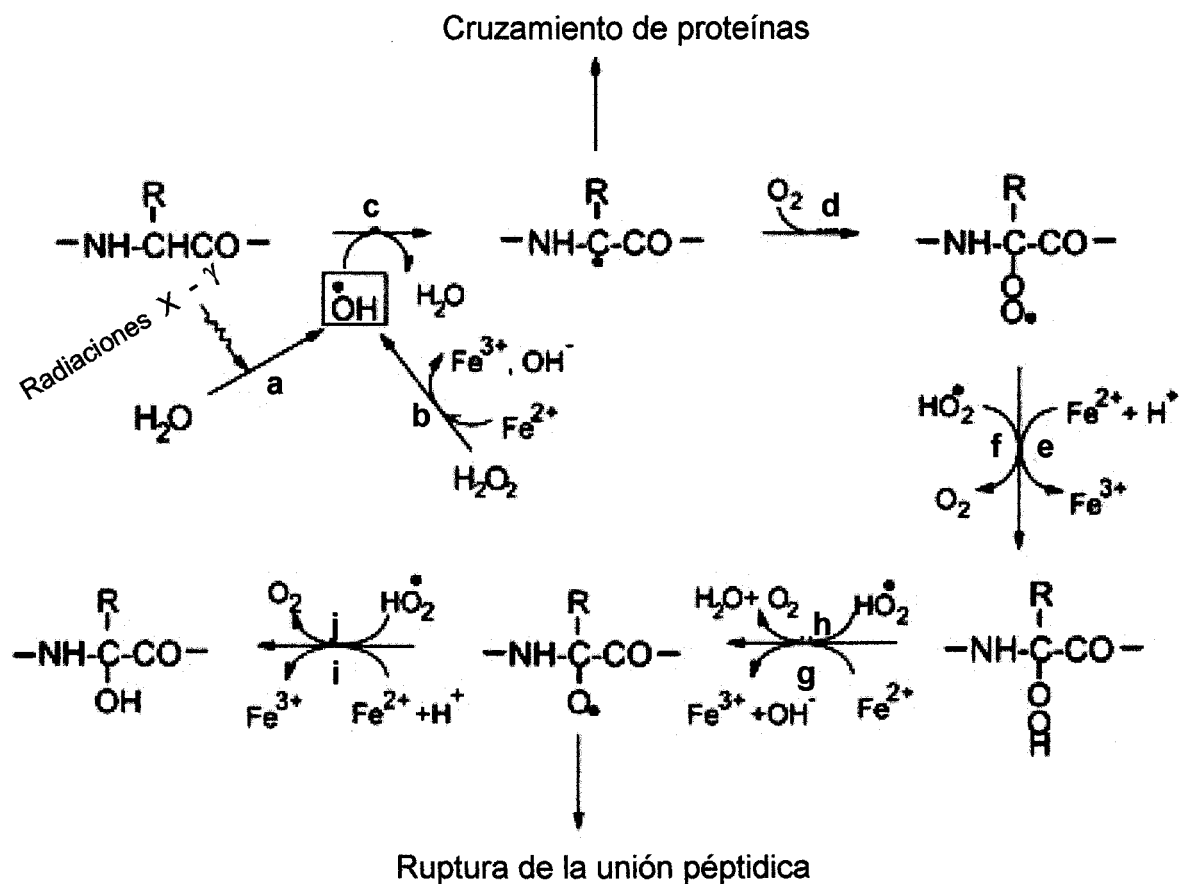
### **1.3.4.- Oxidación de proteínas.**

Las ERO's modifican tanto la estructura como la función de las proteínas. Existe un gran número de trabajos (Stadman, 1986; Stadman, 1993; Levine, 1983; Davies, 1987; Davies, y col 1987a; Davies y Delsignore, 1987; Gordillo y col., 1988; Gordillo y col., 1989) que ponen de manifiesto el efecto inactivador que producen una gran variedad de sistemas oxidativos sobre muchas enzimas. Estas oxidaciones, junto con la glicosilación, constituyen una de las modificaciones post-traduccionales que parecen tener mayor repercusión sobre las actividades de las proteínas (Berlett y stadman, 1997).

Estas oxidaciones introducen grupos carbonilos en la molécula de proteínas, cuya determinación se usa como índice del daño oxidativo en las proteínas (Olivier y col., 1987; Garland y col., 1988; Lenz y col., 1989; Starke-Reed y Olivier., 1989; Funabiki y col., 1991; Stadtman y col., 2000). Se han desarrollado diversos procedimientos para la detección y cuantificación de grupos carbonilos (Levine y col., 1990), siendo el más utilizado el método espectrofotométrico en el que se emplea el reactivo 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). La reacción del DNPH con las proteínas oxidadas es la siguiente:



También se ha observado que la inactivación de enzimas por oxidación activa la degradación proteolítica de las mismas (Davies y col., 1987b; Merker y Grune, 2000; Chang TC y col., 2000). Esta degradación implica, generalmente, dos pasos (Cervera y Levine, 1988; Pacifici y col., 1989). En el primero, la enzima es oxidada dando lugar a una forma catalíticamente inactiva. En esta etapa se oxidan los aminoácidos por la acción combinada de hierro y de agua oxigenada, dando lugar a derivados carbonílicos. En el segundo paso, la forma oxidada es degradada rápidamente por una serie de proteasas intracelulares y/o por acción directa de las ERO's (Berlett y Stadtman, 1997) (Figura 7). Así, se ha comprobado que la inactivación de la glutamina sintetasa de *E. coli* está producida por conversión de la His<sub>269</sub> en Asn (Farber y Levine, 1986) y de la Arg<sub>324</sub> en un derivado del semialdehído glutámico (Climent y Levine, 1991). Estos dos residuos de aminoácidos están implicados en los sitios de unión del metal al centro catalítico de la enzima (Almassy y col., 1986). La susceptibilidad de la enzima al siguiente paso de degradación por proteasas está asociada con la modificación de un segundo residuo de His, el cual está situado en el segundo sitio de unión del metal a la enzima (Levine, 1983; Almassy y col., 1986).



**Figura 7.** Oxidación de proteínas mediada por RL. El ataque oxidativo de la cadena polipeptídica es iniciada por el  $\text{OH}\cdot$ , substrayendo el hidrógeno  $\alpha$  del aminoácido (Fig7, c). El  $\text{OH}\cdot$  necesario para esta reacción puede ser obtenido por radiolisis de agua o por la ruptura de  $\text{H}_2\text{O}_2$  catalizada por los metales (a y b). El radical formado reacciona rápidamente con el  $\text{O}_2$  para formar un radical alquilperoxilo intermediario (d), el cual se convierte en alquilperoxido (f), después se forma el radical alcoxilo (h), lo cual se transforma en un derivado hidroxilado de proteína (j) susceptible de sufrir fragmentación. varios pasos de esta ruta son catalizados por  $\text{Fe}^{2+}$  (e, g y i).

Se ha podido comprobar que la cantidad de proteínas oxidadas en diversos tipos celulares aumentan exponencialmente con la edad del donante (Lenz, 1989). También, se han obtenido resultados interesantes al examinar fibroblastos procedentes de pacientes con Progeria y con el Síndrome de Werner (Oliver y col., 1987), en los que se produce un envejecimiento prematuro. Estas células presentan niveles de grupos carbonilos más elevados que las procedentes de individuos normales de la misma edad.

Según algunos cálculos, hasta la mitad de las proteínas de una persona de edad avanzada podrían quedar inactivas a causa de las oxidaciones (Lissi y col., 1991). Estas proteínas que sufren modificaciones oxidativas irreversibles se acumulan durante el envejecimiento (Stadtman y col., 2000). Por otra parte, los productos de oxidación de las proteínas (restos alquilo, alcoxilperoxilo y alcoxilo) contribuyen a la propagación del proceso oxidativo y, por lo tanto, a la ruptura de la cadena del péptido (Figura 8). Además, las proteínas pueden sufrir oxidaciones por parte de los productos de la peroxidación lipídica, o por su reacción con cetoaminas y cetoaldehidos generados como consecuencia de la reducción de los glúcidos o bien por la reacción de estos productos oxidados con un residuo de lisina de las proteínas (Berlett y Stadtman, 1997).

#### **1.4.- Estrés oxidativo y envejecimiento.**

##### **1.4.1.- Proceso de envejecimiento.**

El envejecimiento biológico se puede definir como el conjunto de cambios y alteraciones que se producen con la edad como consecuencia de procesos intrínsecos que dan lugar a la pérdida generalizada de las funciones óptimas de un organismo (Cutler, 1984).

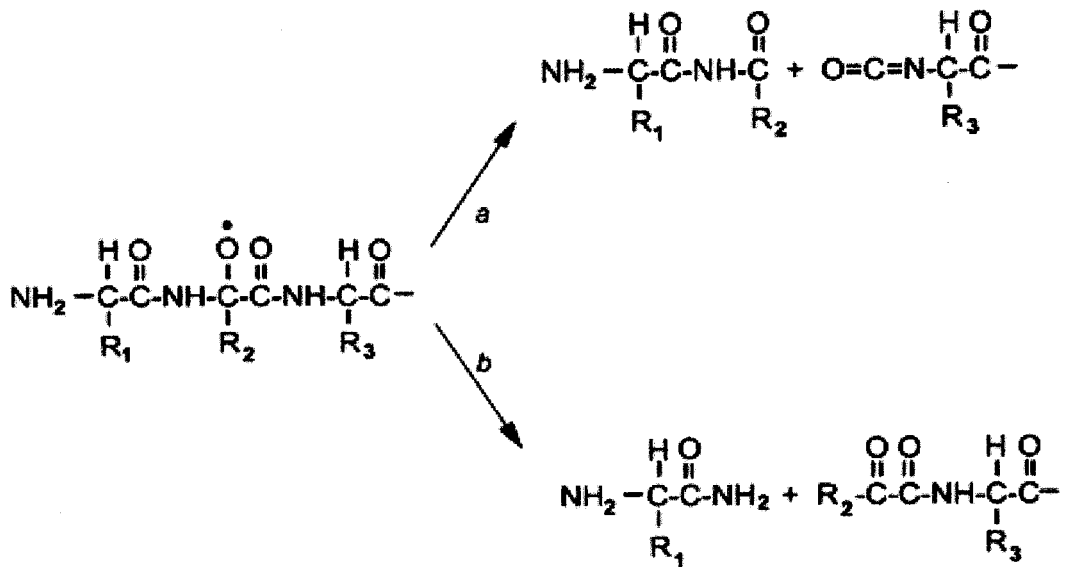


Figura 8. Modelo de fragmentación peptídica tras la oxidación.

Aunque son muchas las hipótesis que han intentado establecer las causas del envejecimiento, ninguna de ellas explica en su totalidad el mecanismo de los cambios moleculares fenotípicos y genotípicos asociados con la edad (Tabla 1).

Algunas de estas hipótesis no sólo han intentado explicar el mecanismo por el cual envejecen los organismos, sino también las bases bioquímicas de la longevidad de las diferentes especies (Cutler, 1984).

Entre todas estas teorías, **la teoría de los radicales libres y envejecimiento de Harman (1956)** es una de las más aceptadas.

### **Tabla 1. TEORIAS SOBRE EL ENVEJECIMIENTO Y LA LONGEVIDAD.**

Teoría de la Pleitropía Antagonista	Williams, 1957.
Teoría de las mutaciones somáticas	Orgel, 1963. Curtis, 1963, 1966.
Teoría del soma desechable	Kirkwood, 1988.
Teoría de los radicales libres	Harman, 1956, 1968. Stadtman, 1992 Sohal and Weindruch, 1996.
Teoría de la desdiferenciación	Cutler, 1982.
Envejecimiento y capacidad proliferativa celular. Telómeros.	Harley y col., 1990,1995.

Según esta teoría, los radicales libres dañan todo tipo de biomoléculas, lo que da lugar a una pérdida de la capacidad de la célula para desempeñar una función y esto conlleva a un debilitamiento de tejidos y órganos y al envejecimiento y muerte del organismo. Esta teoría permite explicar la relación del envejecimiento y el desarrollo de enfermedades relacionadas con la edad.



Muchos trabajos se han centrado en el efecto específico de los radicales libres en la mitocondria. Puesto que la mitocondria tienen poca capacidad de reparación cuando son dañadas por las ERO's, este daño resulta irreversible (Brown y Squier, 1996; Ferrari, 1996; Richter y col., 1988). Otros investigadores afirman que este daño activa la muerte celular (Götz y col., 1994). No obstante, la conexión entre el daño oxidativo en la mitocondria y el proceso de envejecimiento no está totalmente esclarecida (Forman y Azzi, 1997).

#### **1.4.2.- Inhibición de la síntesis de proteínas durante el envejecimiento.**

Un cambio que ocurre en todos los organismos cuando envejecen es la disminución considerable de la capacidad de síntesis de proteínas. (Tessari, 2000; Rattan, 1996; Richardson, 1981; Makrides, 1983). Esta disminución de la síntesis de proteínas con la edad se ha descrito en diferentes tejidos de ratón, incluyendo el hígado (Mainwaring, 1969; Blazejowski y Webster, 1983), músculo esquelético (Tessari, 2000; Britton, 1975; Blazejowski y Webster, 1983), riñones (Blazejowski y Webster, 1983), cerebro (Blazejowski y Webster, 1983) y timo (Azelis y col., 1982).

El efecto del envejecimiento sobre las diferentes etapas de la síntesis de proteínas también ha sido estudiado por diferentes autores. En *Drosophila melanogaster*, estudiando la unión del metionil-tRNA al complejo de iniciación 40S y la formación del complejo de iniciación 80S, se observó una disminución en esta unión del 12-20% en *Drosophila* "vieja". Estudios similares realizados en extractos celulares de hígado y riñón de ratas jóvenes y viejas (Gabiús y col., 1983) y ratones (Blazejowski y Webster, 1984) revelaron cambios parecidos con la edad. En cuanto al mecanismo de esta disminución, se ha descrito que el factor de iniciación eIF-2 sufre una disminución de actividad en cerebro en ratas viejas (Vargas y Castañada, 1983; Calés y col., 1986).

Además de estos factores de iniciación, los factores de elongación han sido también objeto de estudio, sobre todo los factores de elongación EF-1 y FE-2.

Usando como modelo experimental *Drosophila*, nematodos y roedores se ha demostrado que la fase de elongación de la síntesis de proteínas sufre una bajada significativa con la edad (Webster, 1985, 1986; Richardson y Semsei, 1987). En cuanto a las características del EF-1, este factor está constituido por dos partes: una proteína de unión de nucleótidos, EF-1 $\alpha$ , y un complejo de proteínas de intercambio de nucleótido, EF-1 $\beta\gamma$  (Riis y col., 1990). En cuanto al EF-1 $\alpha$ , Cavallius y col (1986) han observado una disminución en la cantidad y actividad de EF-1 $\alpha$  durante el envejecimiento de fibroblastos humanos. Una bajada similar de la cantidad y la actividad del EF-1 $\alpha$  fue determinada en ratones viejos e hígado de ratas (Rattan y col., 1987). No obstante, no se detectó ninguna diferencia en la cantidad y actividad del EF-1 $\alpha$  en hígado de ratas viejas (Fischer 344), alimentada con dieta pobre en calorías respecto a ratas controles, a pesar de la diferencia observada en la tasa de síntesis de proteínas totales (Rattan, col., 1991).

En relación al factor de elongación-2 (FE-2), responsable de la translocación del ribosoma a lo largo del m-RNA, se han publicado varios resultados contradictorios sobre los cambios en la cantidad y actividad relacionados con la edad. Así, Webster (1985) no detectó ninguna diferencia en la actividad de FE-2 en extractos celulares de *Drosophila* de diferentes edades. La actividad específica de este factor tampoco resultó modificada en ratones jóvenes y viejos (Takahashi y col., 1985b). Sin embargo, se ha descrito en los fibroblastos humanos MRC-5 una disminución del 64% en la cantidad de FE-2 activo determinado indirectamente por el ensayo de la toxina diftérica (Riis y col., 1990).

El FE-2 es una cadena polipeptídica que contiene 857 aminoácidos en los eucariotes superiores, con una diferencia de solamente 8 aminoácidos entre el hámster y el humano (Rapp y col., 1989). Su peso molecular relativo es de 95-100 kDa y tiene un pI de alrededor de 7. Contiene 18 grupos sulfidrilos. El FE-2 es también un miembro de la familia de proteínas ligantes de nucleótidos de guanina y contiene la secuencia correspondiente a esta proteína descrita por Dever y col (1989). El enlace que se establece entre el factor FE-2 y el GTP produce una

transformación en la conformación de la enzima, aumentando de este modo su afinidad por los ribosomas (Nygard y Nilsson, 1985; Sontag y col., 1993). La acción del FE-2 depende del complejo ternario FE-2, GTP y ribosoma. Durante su acción catalítica, el FE-2 hidroliza una molécula de GTP y tiene una afinidad cinco veces mayor por el GDP que por el GTP (Kd: 2.5  $\mu$ M y 0.5  $\mu$ M, respectivamente). *In vivo*, esta diferencia de afinidad está compensada por la alta concentración de GTP citosólica.

### **1.5.- Estrés oxidativo y enfermedades neurodegenerativas.**

Se han descrito una serie de enfermedades en las que las ERO's juegan un papel importante bien siendo la causa de las patologías bien agravando el efecto de otros factores que producen la enfermedad. Cáncer, enfermedades cardiovasculares, degeneración muscular, diabetes, Alzheimer y Parkinson son ejemplos de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo (Berlett y Stadtman, 1997; Reiter, 1998; Mylonas y Kouretas, 1999). El sistema nervioso es particularmente sensible al daño mediado por los radicales libres debido a varias razones: el cerebro tiene un alto contenido de hierro-metal que participa en la generación de radicales libres, es rico en ácidos grasos muy susceptibles a la oxidación y, además, posee niveles bajos de defensas antioxidantes respecto de las halladas en otros órganos. La actividad de los complejos mitocondriales y las alteraciones del DNA mitocondrial han sido muy estudiadas en diversas enfermedades neurodegenerativas por su posible relación en la patogenia de dichas enfermedades (Klivenyi y Vecsei; 1997 Wallace; 1992 a,b; 1998).

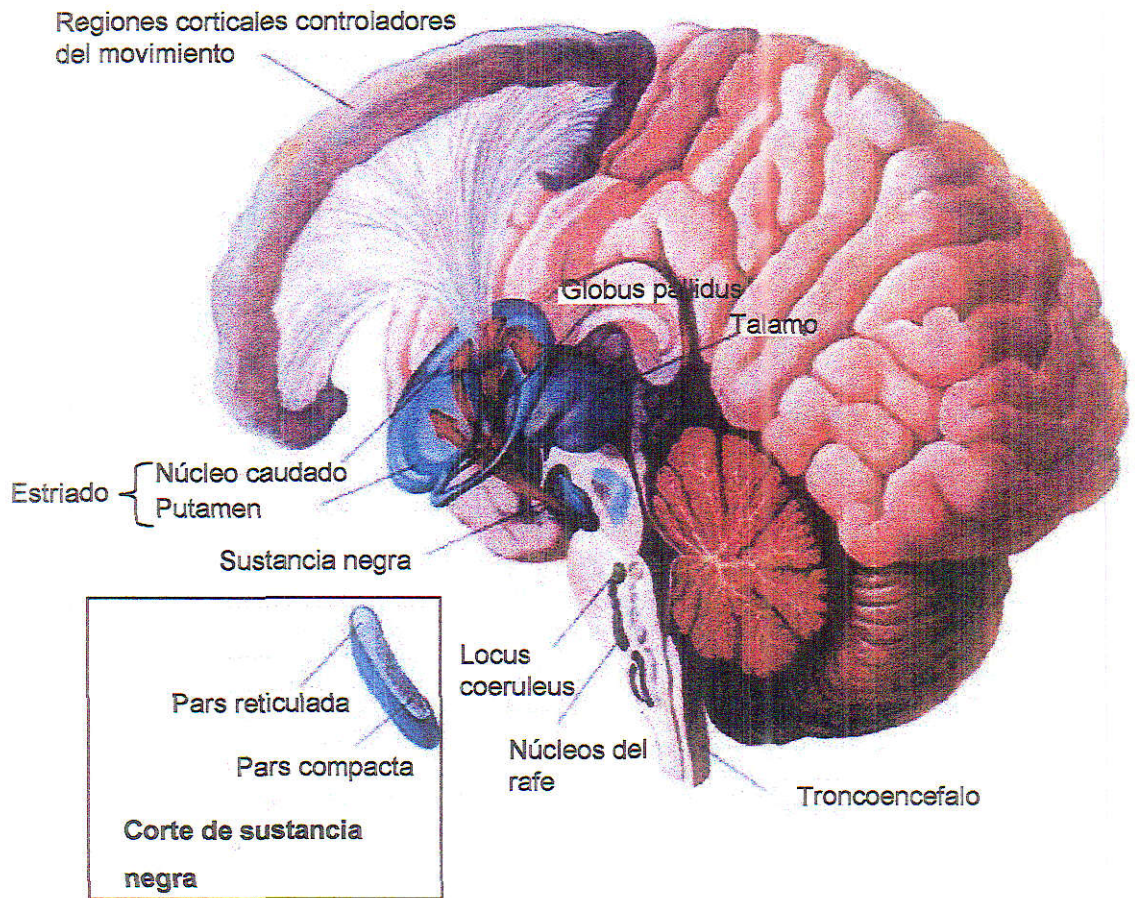
#### **1.5.1.- Enfermedad de Parkinson: Efecto del MPTP y otras neurotoxinas.**

La enfermedad de Parkinson (EP) o parkinismo se caracteriza clínicamente por temblor, rigidez muscular, lentitud de movimientos o bradiquinesia y alteración de

la marcha y de los reflejos posturales. En etapas tardías aparecen problemas psicológicos que pueden llegar a convertirse en demencia. Desde la aparición de los primeros síntomas, éstos se van agravando, llegando a la discapacidad en el transcurso de 5 a 15 años. Desde el punto de vista neuropatológico, en la EP se produce una degeneración de las neuronas ricas en melanina de la sustancia negra, que conlleva una disminución de la liberación de la dopamina en el cuerpo estriado desde las terminales nerviosas de la vía negro-estriada (Figura 9).

La etiología de la EP es desconocida, aunque se ha sugerido que ésta podría ser multifactorial: estrés oxidativo, alteraciones de la función mitocondrial (Gabbita y col., 1998; Takeshige y col., 1994), o la acción de neurotoxinas exógenas y/o endógenas (Ohta y col., 1987; Naoi y col., 1993) podrían constituir el origen de los procesos de muerte celular que ocurren en esta enfermedad. Sin embargo, la teoría más extendida, es la que supone que la neurodegeneración en la EP es producida por un aumento del daño oxidativo debido a radicales libres (Cohen, 1984; Jenner, 1991).

El descubrimiento de que el derivado piridínico MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina) era capaz de inducir un cuadro parkinsoniano parecido a la EP, tanto en humanos como en animales ha ayudado a comprender algunos de los posibles mecanismos etiopatogénicos de dicha enfermedad (Davis y col., 1979; Burns y col., 1983; Langston y col., 1984). El MPTP que atraviesa con facilidad la barrera hematoencefálica, es transformado por la monoamino oxidasa B (MAO-B) en el compuesto intermediario dihidroperidinio (MPDP<sup>+</sup>), que se transforma rápidamente en piridinio 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP<sup>+</sup>), metabolito responsable de la acción neurotóxica (Heikkila y col., 1985). El MPP<sup>+</sup> es un sustrato para el transportador de dopamina (DA), transportándose, así, al interior de las células dopaminérgicas (Javitch y col., 1985), donde se vesícula. Cuando alcanza unos determinados niveles produce la inhibición del complejo I (NADH deshidrogenasa) de la cadena respiratoria (Nicklas y col., 1985; Ramsay y col., 1986). El bloqueo de la respiración conduce a una rápida disminución de la concentración intracelular de ATP (Di Monte y col., 1986), lo que conlleva a una muerte neuronal (Kass y col.,



**Figura 9.** Situación de las regiones del cerebro que resultan mas afectadas física y funcionalmente en la enfermedad de Parkinson (sustancia negra y estriado).

1988). Hay que resaltar que el  $MPP^+$  es un inhibidor reversible débil de la NADH deshidrogenasa, requiriéndose concentraciones milimolares para inhibirla. La acción inhibitoria de la cadena respiratoria mitocondrial por  $MPP^+$  no es específica de ningún órgano sino que afecta a todas las mitocondrias de las células de los mamíferos. Estas acciones inhibitorias sobre complejos enzimáticos mitocondriales son también ejercidas por análogos endógenos de las tetrahydroisoquinolinas, que han sido implicadas en la EP (Soto-Otero y col., 2001; Nagatsu y Yoshida, 1988; Yoshida y col., 1993; Kawai y col., 1998). Además de la bajada de la producción de energía, la inhibición del complejo I provoca la formación de ERO's (ión superóxido y agua oxigenada) (Hasegawa y col., 1990b), responsables del daño oxidativo en las biomoléculas mitocondriales. Se ha demostrado "in vivo" y "in vitro" que antioxidantes como la selegina protege las neuronas dopaminérgicas del daño inducido por  $MPP^+$  (Wu y col., 1995) y que la inclusión de glutatión, el ascorbato o catalasa protege la actividad de la NADH-CoQ reductasa de la inhibición mitocondrial producida con  $MPP^+$  (Shershen y col., 1985; Wegner y col., 1985; Cleeter y col., 1992).

### **1.6.- Mecanismos de defensa frente al estrés oxidativo.**

Las células de mamífero cuentan con varios sistemas (enzimáticos y no enzimáticos) de protección contra las ERO's (Figura 10). Dos rutas importantes son las catalizadas por la superóxido dismutasa que cataliza la dismutación del ión superóxido en agua oxigenada y oxígeno y la conversión de agua oxigenada en agua por la glutatión peroxidasa o hasta oxígeno y agua por acción de la catalasa. Puesto que la concentración de metales como el hierro cataliza la formación de algunas ERO's los niveles de este metal se mantienen bajos mediante la unión con las proteínas ferritina, transferrina y lactoferrina, lo cual evita que este hierro estimule la peroxidación lipídica (Berlett y Stadtman, 1997; Octave y col., 1983; Goldstein y col., 1982). Por último, los compuestos antioxidantes secuestradores de radicales libres (como la vitamina E) interrumpen la cadena de reacciones

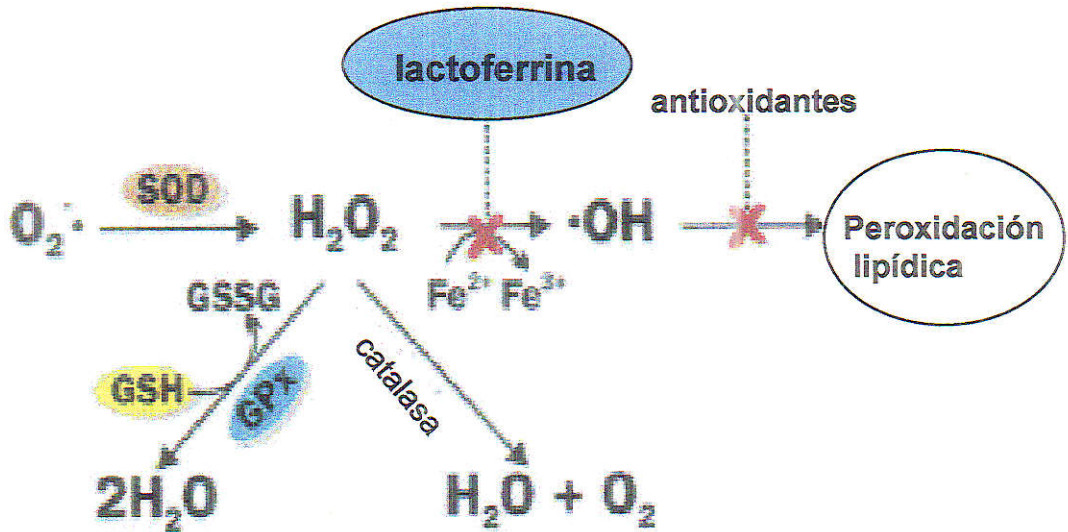


Figura 10. Mecanismos de acción de los sistemas antioxidantes (enzimáticos y no enzimáticos) frente a los sistemas de generación de radicales libres.

desencadenadas por las ERO's al reaccionar ellos mismos con los radicales libres. Si bien estos antioxidantes dan lugar a nuevos radicales libres, estos intermediarios suelen tener poca reactividad, con lo cual no contribuyen a la propagación de los radicales (Hardeland y col., 1993) .

Unos de los compuestos cuya capacidad antioxidante ha sido últimamente muy estudiada es la **melatonina**. La melatonina, una hormona segregada durante la noche por la glándula pineal, la melatonina, es capaz de proteger todo tipo de biomoléculas celulares frente al daño oxidativo debido a su alta liposolubilidad y cierta hidrosolubilidad (Reiter y col., 1998b). Aunque en los mamíferos la melatonina es sintetizada en la glándula pineal, retinas, tracto gastrointestinal y posiblemente en pequeñas cantidades en otros tejidos, la melatonina presente en la sangre deriva exclusivamente de glándula pineal. En algún casos la melatonina interacciona con receptores de la superficie de las células (Godson y col., 1997), y en otros casos puede estar unido a alguno sitio del citoplasma por ejemplo la calmodulina (Huerto-Delgadillo y col 1994; Pozo y col., 1997) y/o a sitios específicos a nivel del núcleo celular (Carlberg y col., 1995). La estructura indólica de la melatonina es la responsable de su capacidad antioxidante al igual que ocurre con diversos metabolitos del triptófano (Christen y col., 1990; Tan y col 1993a). También ha sido demostrado que algunos metabolitos de la melatonina, la *N*-acetil-5-metoxi-kinurenamina, y un análogo estructural de la misma, la indometacina, inhibían la producción de radicales libres generados durante la síntesis de prostaglandinas (Leach y Thorburn, 1980; Salari y col., 1984). La indometacina previene también la diabetes inducida por aloxano (Xu y Yu, 1992).

En 1993 aparecieron los primeros trabajos relacionados con la capacidad antioxidante de la melatonina. Así, Tan y col. (1993a) demostraron "in vitro" que la melatonina era aproximadamente 5 veces más potente que el glutatión y 14 veces más potente que el manitol como secuestrador de radicales OH' (Tan y col., 1993a; Reiter, 1998b). En el mismo año, Pierrefiche y col (1993a) demostraron "in vivo "

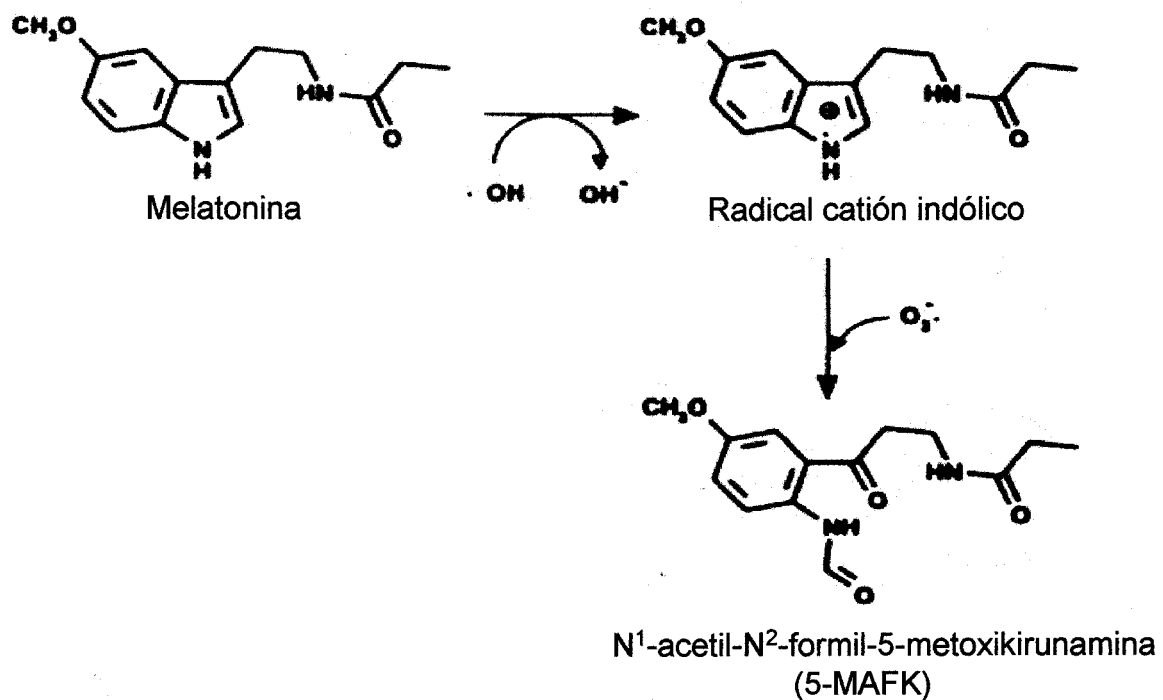


que la melatonina posee efectos protectores frente a la diabetes inducida por aloxano en ratones.

En cuanto a su mecanismo de acción antioxidante de la melatonina, este es debido a que la melatonina es una molécula altamente electroreactiva que actúa primeramente como un potente dador de electrón. De esta manera neutraliza la toxicidad de ERO debida a la deficiencia de electrón que les falta. En este proceso de donación de electrones, la melatonina se convierte en melatonil, un radical catión indólico (Figura 11), que al tener menos reactividad (Hardeland y col 1993), no puede ser reciclado a melatonina (Reiter y col.,1998b), pero puede reaccionar con el radical  $O_2^{\cdot-}$ , formando el metabolito no enzimático de la melatonina, N<sup>1</sup>-acetil-N<sup>2</sup>-formil-5-metoxikirunamina, que es eliminado en la orina.

La capacidad de la melatonina para secuestrar al radical  $O_2^{\cdot-}$  es muy importante no por la toxicidad del radical  $O_2^{\cdot-}$  sino por reducir la formación del radical hidroxilo  $\cdot OH$ , altamente tóxico (después de su conversión a  $H_2O_2$  y  $ONOO^-$  (Reiter y col., 1994a, 1998b; Hardeland y col.,1993).

La capacidad antioxidante de la melatonina no está limitada sólo a los radicales hidroxilos sino que se extiende también a los radicales peroxilo ( $ROO\cdot$ ) (Reiter y col 1997a; Melchiorri y col., 1996; Garcia y col., 1997; Reiter y col., 1998c). Se ha demostrado que esta hormona tienen una capacidad antioxidante dos veces más potente que la vitamina E para inhibir la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados (Pieri y col., 1994), aunque en otros estudios se encontró que la vitamina E es más eficiente que la melatonina (Escames y col., 1997). Sin embargo las dos moléculas antioxidantes son capaces de prevenir la lisis de los eritrocitos humano expuestos a un agente oxidante como el AAPH (Reiter y col., 1998b). Los daños oxidativos generados "in vivo" en hígado y pulmón de ratas sometidos a un intenso estrés oxidativo inducido por paraquat (Melchiorri y col., 1995), o por la administración de endotoxinas a animales como el lipopolisacárido (Sewerynek y col., 1995), o por sustancias naturales, como el glutamato o el kainato, en cultivos de neuronas



**Figura 11.** Reacción de la melatonina con el radical hidroxilo  $\text{OH}\cdot$ . La melatonina neutraliza la toxicidad de las ERO'S por donación de un electrón convirtiéndose en melatonil que reacciona con el radical  $\text{O}_2^{\cdot-}$  formando 5-MAFK.

cerebrales, (Giusti y col., 1995), fueron atenuados por el tratamiento con melatonina. Estos resultados apoyan los primeros estudios realizados "in vitro" por Pieri, 1994. Además, la melatonina demostró tener efectos protectores contra la toxicidad molecular iniciada por el oxígeno singlete  $^1\text{O}_2$ . De hecho, la melatonina reduce la citotoxicidad producida por la luz absorbida por la protoporfina (agente fotosensible) de la retina (Reszka y col., 1996; Reiter, 1998b), el daño de ADN generado en ratas por el safrol, un agente cancerígeno, y el daño generado por la exposición a radiaciones ionizantes de linfocitos humanos (Tan y col., 1993b; Reiter, 1998b; Vijayalaxmi y col., 1995; Karbownik y col., 2000).

El papel citoprotector de la melatonina no sólo se relaciona a su capacidad antioxidante directa sino también de su acción indirecta estimulando la actividad de la enzima antioxidante la glutatión peroxidasa (GSH-Px). Dicho aumento en la actividad parece estar relacionado con un discreto incremento en los niveles de ARNm de la misma (Antolín y col., 1996). Otros efectos protectores de la melatonina relacionados con cambios en los niveles de ARNm han sido demostrados recientemente, observándose incrementos en la expresión de la manganeso, de la Cobre-Zinc SOD (Antolín y col., 1996). La melatonina afecta igualmente a dos importantes enzimas prooxidantes inhibiendo su actividad como son la óxido nítrico sintasa (Pozo y col., 1994; 1997) y la 5-lipoxigenasa (Steinhilber y col., 1995). El precursor de melatonina, N-actilserotonina, no parece tener capacidad para detoxificar el radical hidroxilo (Tan y col., 1993a). También se ha visto que la serotonina tiene un efecto antioxidativo débil y un potencial prooxidativo (Tan y col., 1993a; Matuszak y col., 1997). Queda por profundizar la cuestión de la capacidad antioxidante de algunos de los metabolitos de la melatonina, como la 6-hidroximelatonina (Pierrefiche y col., 1993).

La melatonina ejerce también una acción protectora contra la toxicidad del MPTP,  $\text{MPP}^+$  y neurotoxinas productoras de la enfermedad de parkinson (EP) (Acuña-Castroviejo y col., 1997; Iacovitti y col., 1997; Jin y col., 1998; Reiter, 1998; Kim y col., 1998). Por último hay que resaltar la melatonina, como agente antioxidante

previene la acción inhibitoria del rojo de rutenio a nivel de la mitocondria, evitando la alteración del metabolismo energético (Reiter y col, 1998).

### **1.7.- Compuestos neuroprotectores: Función del compuesto 1-metil tetrahidroisoquinolina (1-MeTIQ).**

Las tetrahidroisoquinolinas son una familia de alcaloides que han sido identificados como componentes endógenos del metabolismo en plantas y animales. Se ha sugerido que estos alcaloides juegan un papel importante como neuromoduladores de la acción de los neurotransmisores. Recientemente, se ha postulado su contribución en la patogénesis de la EP.

Dentro de esta familia de compuestos, la mayoría ejercen una acción neurotóxica, siendo los más representativos la tetrahidroisoquinolina (TIQ), 1-Benzil-TIQ y 2-MeTIQ. La neurotoxicidad y la estructura de estos compuestos es similar a la del MPTP, produciendo la EP en animales de experimentación (Nagatsu y Yoshida, 1988; Yoshida y col, 1993; Kawai y col, 1998).

Sorprendentemente, un compuesto muy similar a estas neurotoxinas, desde el punto de vista estructural, ejerce una acción totalmente opuesta. Este compuesto es el 1-metiltetrahidroisoquinolina (1-MeTIQ), el cual es considerado como un posible agente preventivo de la EP, encontrándose en ratas, ratones, monos y humanos (Khono y col., 1986; Niwa y col., 1987; Ohta y col., 1987; Sotero-Otero y col, 2001). 1-MeTIQ ejerce una acción neuroprotectora frente a la toxicidad producida tanto por neurotoxinas exógenas (MPTP, MPP<sup>+</sup>) como endógenas (tetraisoquinolinas, 1-Benzil-tetraisoquinolinas). Así, se ha comprobado que los síntomas fisiológicos (bradiquinesia, anormalidades en el comportamiento) inducidos por estas se evitan con pretratamientos de 1-MeTIQ (Tasaki, y col, 1991; Kotake y col, 1995).

Se ha demostrado que los niveles de 1-MeTIQ disminuyen en cerebros de enfermos de Parkinson y durante el envejecimiento (Ohta y col., 1987; Ayala y col., 1994). Recientemente, se ha descubierto una enzima (1-MeTIQsa) la cual es responsable de la síntesis endógena de 1-MeTIQ en cerebro de rata (Yamakawa y Ohta, 1999; 1997), siendo los sustratos precursores piruvato y 2-feniletilamina. Esta enzima está localizada en la fracción mitocondrial-sinaptosomal. La actividad de esta enzima se inhibe por los otros alcaloides de la familia con capacidad neurotóxica y por otra neurotoxinas relacionadas con la EP (MPTP, MPP<sup>+</sup>,  $\alpha$ -carbolinas, etc) (Yamakawa y Ohta, 1999; 1997).

## **2.- OBJETIVO DEL ESTUDIO Y PLANTAMIENTO EXPERIMENTAL.**

Nuestro objetivo ha sido centrado en el estudio de algunas de las alteraciones que sufren dos funciones celulares importantes con el envejecimiento y el tratamiento con compuestos oxidantes y neurotóxicos. Estas funciones son la síntesis de proteínas y la respiración mitocondrial. Estas alteraciones se han examinado fundamentalmente en hígado y áreas cerebrales. El estudio se ha realizado analizando los cambios que sufren las enzimas más relevantes de estas rutas: el factor de elongación-2 de la maquinaria de traducción y el complejo I de la cadena respiratoria. Las modificaciones se han estudiado en algunos casos en animales jóvenes y viejos tratados con oxidantes y neurotóxicos. Otras veces, los experimentos se han realizados "in vitro" en homogeneizados controles tratados con los mismos compuestos que los animales, bien en mitocondrias.

En las mismas situaciones experimentales, para determinar si el estrés oxidativo podría desempeñar un papel causal en la pérdida de las funciones estudiadas, en todos los casos se ha determinado una serie de marcadores de daño oxidativo en las biomoléculas.

Si importante es describir los cambios en moléculas relevantes que pudieran justificar la inhibición de la síntesis de proteínas con el envejecimiento y la respiración mitocondrial en animales en animales tratados con compuestos neurotóxicos, mucho más importante sería determinar la manera de evitar todas estas alteraciones. Es por ello por lo que se ha estudiado el posible papel protector de una serie de compuestos (melatonina y 1-MeTIQ) que en mayor o menor medida ejercen su acción protectora por mecanismos que se describen en la tesis.

## **MATERIALES Y METODOS**

### **3.- MATERIALES Y MÉTODOS.**

#### **3.1. 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 ratas machos de raza Wistar de tres meses de edad de peso comprendido entre 250-300 g y ratas viejas machos y hembras de 22 meses con un peso medio de 650 g. Los animales se mantuvieron con libre acceso de 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 de humedad.

Los animales utilizados en los experimentos 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. Todas las estructuras se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron hasta su utilización. Los tejidos usados para la obtención de mitocondrias o sinaptosomas fueron procesados inmediatamente tras su disección.

Los animales destinados a la medida de RNA mensajero fueron decapitados, extrayéndoles seguidamente los cerebros, que 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).

#### **3.2. Tratamientos.**

3.2.1. Tratamiento con melatonina de ratas viejas: Las ratas viejas de 22 meses se dividieron en dos grupos: a) Experimental (n= 7) tratadas durante 2 meses por



vía oral entre las 7 y 8 horas p.m con una solución de melatonina de 20 µg/ml disuelta en solución salina-etanol, de manera que la concentración final de solución no supere el 0,01 % de etanol y (aproximadamente recibían 86 nM /día/rata). b) Control (n=7) a los que se administró solución salina-etanol en igual proporción.

3.2.2. Tratamiento con melatonina de ratas jóvenes para los experimentos de mRNA: Para examinar el papel que puede jugar la melatonina sobre la expresión de mRNA de varios tipos en distintos centros cerebrales, las ratas jóvenes de 3 meses se dividieron en dos grupos: a) Experimental (n=6) tratadas intraperitonealmente durante un mes con 1,5 mg/Kg, 0,5 mg /ml de melatonina disuelta en solución salina-etanol (etanol 0,1%) entre las 7 y 8 horas p.m. b) Control (n=7) a los que se inyectó solución salina-etanol en igual proporción.

3.2.3. Tratamiento con melatonina de ratas jóvenes para los experimentos de protección frente al MPTP: Para estudiar el posible efecto protector de melatonina, sobre la neurotoxicidad del MPP<sup>+</sup>, ratas jóvenes de 3 meses se trataron intraperitonealmente con melatonina disuelta en etanol al 1% y solución salina al 0.9% a una dosis de 10 mg/Kg. Las inyecciones se hicieron cada hora durante 4 horas antes de sacrificarlas. En la primera hora de tratamiento la melatonina se administró intraperitonealmente 30 min antes de lesionar intracerebralmente el estriado izquierdo con MPP<sup>+</sup>. Los animales controles (n=5) fueron inyectados con 2 µl del vehículo (salino/etanol) en el estriado izquierdo y el derecho sirvió como control no operado. Los animales experimentales (n=5) fueron inyectados en el estriado izquierdo con 1 µl de solución de MPP<sup>+</sup> y 1 µl del etanol correspondiente.

3.2.4.- Administración intracerebral de MPP<sup>+</sup> y 1- MeTIQ. El efecto neurotóxico y neuroprotector del MPP<sup>+</sup> y de 1-MeTIQ "in vivo" fue estudiado mediante inyección intracerebral en el estriado de rata. Para ello, 1-MeTIQ se disolvió en etanol a una concentración de 2µg/µl. El MPP<sup>+</sup> se disolvió en solución salina al 0.9%. Los

animales controles fueron inyectados con 2  $\mu\text{l}$  del vehículo (salino/etanol) en el estriado izquierdo y el derecho sirvió como control no operado. Los animales experimentales fueron inyectados en el estriado izquierdo con 1  $\mu\text{l}$  de solución de  $\text{MPP}^+$  y 1  $\mu\text{l}$  del etanol correspondiente. En el derecho con una mezcla de 1  $\mu\text{l}$  de solución de  $\text{MPP}^+$  y 1  $\mu\text{l}$  de 1-MeTIQ.

3.2.5. Tratamiento "in vivo" de rata con  $\text{MPP}^+$ . El efecto neurotóxico del  $\text{MPP}^+$  sobre el estado molecular de FE-2 fue estudiado en EL estriado y la sustancia negra de ratas jóvenes de 3 meses por una inyección intracerebral de  $\text{MPP}^+$  (2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), las cuales fueron sacrificadas 4 días después la inyección. Los animales controles (n=5) fueron inyectados con 2  $\mu\text{l}$  del vehículo (salino/etanol) en el estriado izquierdo y el derecho de la misma rata sirvió como control no operado. Los animales experimentales (n=5) fueron inyectados en el estriado izquierdo con 1  $\mu\text{l}$  de solución de  $\text{MPP}^+$  y 1  $\mu\text{l}$  del etanol correspondiente.

### **3.3. Aparatos.**

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

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

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

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

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

Para las inyecciones intranigrales o intrestriatal se usó un estereotáxico Kopf Instruments (Tujunga, CA, USA).

En la determinación de 1-MeTIQ y TIQ se utilizó un cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas, (Hewlett Packard, 6890) equipado de una columna

capilar de gel de sílica fundido (30 m, 0,25 mm i.d.) con 5 % de fenilo metilsilicona (espesor de la capa 0,25  $\mu\text{m}$ ). El programa de temperatura fue 70 - 280 °C, 20°C / min (Jacobson y col, 1995).

Los cortes de tejido de 300 $\mu\text{m}$  se realizaron con un cortador de McIlwain tissue chopper equipado de un micrometro ( 1mm / 30 S, Ref 04820 / 2178).

La medida de la capacidad antioxidante se ha realizado en cubetas de poliestireno, en un espectrofluorímetro Kontron SFM 25, equipado con agitación magnética y control de temperatura.

Las secciones de cerebro para el experimento de hibridación "in situ" se obtuvieron mediante un criostato Jung CM 1800.

La determinación de la expresión del ARNm se realizó mediante de un analizador de imágenes por videodensitometría Densirag Biocom (Paris).

### **3.4. Reactivos.**

Los productos usados en los experimentos de respiración mitocondrial carbonil cianuro p-trifluorfenilhidrazona, piruvato y succinato fueron suministrados, respectivamente, por Sigma Chemical Co, Boehringer-Mannheim y Panreac.

El etilacetato y ácido heptafluorobutírico anhidro usados para derivatizar las muestras analizadas por GC/MS fueron suministrados por Pierce. El cloroformo, diclorometano, eter y acetona fueron suministrados por Merck.

Los reactivos empleados en los experimentos de hibridación "in situ" fueron de calidad para Biología Molecular.

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

Para el estudio inmunocitoquímico de TH se usaron anticuerpo monoclonal anti-TH y un segundo anticuerpo avidina-biotina-peroxidasa suministrados por Boehringer-Mannhheim.

Para la identificación de la molécula de FE-2 se utilizaron un anticuerpo policlonal anti-FE-2 producido en el laboratorio y un secundario anti rabbit IgG-POD suministrado por Boehringer-Mannhheim.

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

Para las medidas de grupos carbonilos se utilizó 2,4-Dinitrofenilhidrazina como agente derivatizador y un anticuerpo anti-DNPH (anti-dinitrofenilhidrazina) para su inmunodetección .

Para la medida de la síntesis de proteínas se utilizó valina radioactiva (L-3,4 (n)-<sup>3</sup>H Valine) de Pierce.

Para la medida de la capacidad antioxidante se utilizó Ficoeritrina y Trolox suministrados por Sigma Chemical Co.

Para el ensayo de la recaptación de dopamina se utilizó dopamina tritiada (3,4-[7-<sup>3</sup>H]-dopamina) de Sigma Chemical Co.

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

Los productos oxidantes usados en los experimentos hidropéroxido de cumeno, agua oxigenada, 2,2´Azobis (2-amidinopropano-hidrocloruro) y el ión 1-metil-4-fenilpiridinio fueron suministrados, respectivamente, por Sigma Chemical Co, Merck, Polyscience, Inc y RBI (Natick, MA, U.S.A).

### **3.5.- MÉTODOS.**

#### **3.5.1.- Preparación de las mitocondrias hepáticas.**

Las mitocondrias fueron aisladas según el método de Bougria y col (1994). El hígado se extrajo rápidamente, se trituró con tijeras y se lavó con una solución de 10 mM Tris/HCl, 0,32 M sacarosa, 1mM de EDTA , 0.1%(p/v) BSA mantenida en frío a 4°C, pH 7,4. Se homogenizó el tejido en la misma solución. Después, se centrifugó el homogenizado a 1000xg durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se

centrifugó a 12500xg durante 15 min a 4°C. Después de precipitar las mitocondrias se resuspendieron en la misma solución a una concentración de 5 mg/ml de proteínas.

### **3.5.2.- Preparación de los sinaptosomas.**

Los sinaptosomas del estriado de la rata se prepararon según el método de Wheeler y col (1993). Después de su extracción y determinación del peso, el estriado fue homogenizado en 20 volúmenes de sacarosa 0.32 M a 4°C , con un pistilo de teflón. El homogenizado se centrifugó a 1.000xg durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se volvió a centrifugar a 17.000xg durante 20 min a 4°C. El precipitado de sinaptosomas se guardó a 4°C y se resuspendió en 0,32 M de sacarosa para su posterior uso.

### **3.5.3.- Medida de la respiración mitocondrial.**

El consumo de oxígeno por las mitocondrias se midió con un microelectrodo tipo Clark (Hansatech,UK). Las mitocondrias hepáticas o sinaptosomales se incubaron en un volumen total de 500 µl de solución 10 mM Hepes, 0.32 M sacarosa , 0,1% (p/v) BSA, 5 mM ácido piruvico y 5 mM ácido malico, pH 7,4 (Bougria y col. 1994). La cantidad de proteínas en la cubeta fue del orden de 0,1-0,4 mg. Tras un periodo de incubación de 5-10 min a 30°C, se midió el consumo de oxígeno de las mitocondrias en reposo (estado 4). Para medir la actividad de complejo I (estado 3) se le añadió el FCCP 5 µM (Nicholls y col. 1982).

La solución de MPP<sup>+</sup> se preparó extemporáneamente para cada experimento en 140 mM de NaCl, 5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM de Tris-HCl, pH 7,4. Su efecto se determinó utilizando concentraciones 10<sup>-6</sup> a 10<sup>-3</sup> M. Por encima de estas concentraciones, el MPP<sup>+</sup> no afectó el pH del medio de incubación. Igualmente, se examinó el efecto de la melatonina de 10 mM preparada inicialmente en etanol y diluida en el medio de incubación de manera que la concentración de etanol

final en la cubeta no superara el 0.01 %. De este modo se pudo determinar el efecto de melatonina a unas concentraciones del rango de  $10^{-6}$  a  $10^{-3}$  M. La concentración de etanol utilizada para disolver la melatonina no afectó la respiración mitocondrial ni al pH del medio de incubación.

### 3.5.4.- Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida-SDS.

Las electroforesis en geles de poliacrilamida, en presencia de SDS, se realizaron según el método descrito por Laemmli, (1970). Para la preparación de los geles se utilizaron las siguientes soluciones de partida.

Sol.a : 30% de acrilamida.

Sol.b : 1% de bisacrilamida

Sol.c : 1,5 M Tris/HCl, 0,4% SDS, pH 8,8

Sol.d : 0,25 M Tris/HCl, 0,2% SDS, pH 6,8

Sol.e : 50% APS.

El gel separador se separó según el siguiente protocolo:

Sol.a:	4.0	ml
Sol.b:	1.56	ml
Sol.c:	2.54	ml
Sol.e:	0.0127	ml
TEMED	0.00634	ml
Agua dEstilada	1.88	ml

El gel espaciador se preparó por combinación de las soluciones de partida en las siguientes proporciones:

Sol. a:	0.830 ml
Sol. b:	0.665 ml
Sol. d:	2.485 ml
Sol. e	0.0199 ml
TEMED	0.0099 ml
Agua destilada	0.995 ml

Las muestras se mezclaron en proporción 1:1 con el tampón cuya composición se detalla a continuación hirviéndolas posteriormente a 100 °C durante 5 min.

0,01 M Tris/HCl,pH 6,8  
20 % Glicerol  
10 %  $\beta$ -Mercaptoetanol  
2,3% SDS  
0,005% Azul de bromofenol  
Agua destilada hasta 50 ml

Como tampón de corrido se empleó una solución cuya composición fue 0,05M Tris, 0,383 M Glicina, pH 8,3 y 0,1% SDS.

La electroforesis se llevó acabo a 15 mA para un gel de 0,75 mm durante una 1 h 30' aproximadamente.

### **3.5.5.- Transferencia de proteínas a membrana de nitrocelulosa**

Tras la electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS se procedió a la transferencia de las proteínas a membranas de nitrocelulosa (0,45 mm de  $\phi$ ). La transferencia se realizó según el método descrito por Towbin (1979). El tampón de transferencia contenía 25 mM Tris, pH 8,3, 192 mM glicina, 20% metanol y 0,05 % SDS. Las condiciones de transferencia fueron 30 V, 0,2 A a 4 °C durante toda la noche.

### 3.5.6.- Determinación de MDA.

La medida de MDA con tiobarbitúrico (TBA) es el método más usual para la determinación de la peroxidación lipídica. Una parte de hígado fue homogenizada en 6 volúmenes de tampón de homogenización compuesto 20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 50 mM DTT, pH 7.5. El PMSF se preparó a una concentración inicial de 20 mM en etanol absoluto y se añadió al tampón de homogenización de manera que la concentración final de PMSF era de 0,2 mM. El homogeneizado de hígado fue centrifugado a 3500 r.p.m durante 5 min. A 500  $\mu$ l del sobrenadante se le añadió 1 ml de ácido tricloroacético al 10 % p/v para precipitar las proteínas. La mezcla se centrifugó a 13.000 r.p.m durante 10 min. A 1 ml del sobrenadante se le añadió un volumen igual de TBA al 0.67 % p/v. La mezcla se calentó en agua en ebullición durante 10 min. Tras enfriar a 4°C, se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a 535 nm ( $\epsilon = 153 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

### 3.5.7- Determinación de los grupos carbonilos específicos

#### 3.5.7.1.- Derivatización.

Para realizar esta medida, se procedió a la derivatización de los grupos carbonilos de la muestra según el método de Schacter y col. (1994). Para ello, se toman 225  $\mu$ l de muestra con una concentración de 5 mg/ml a la que se añadieron 75  $\mu$ l de SDS al 24 %. Después, la mezcla se puso a hervir durante 3 min para desnaturalizar a las proteínas. Tras dejar enfriar las muestras durante 10 min a temperatura ambiente, se añadió un volumen de 100  $\mu$ l de una solución 10 mM de DNPH preparada en ácido trifluoroacético al 10%, incubando durante 10 min a 25°C, para que reaccionaran los grupos carbonilos con el DNPH. A continuación la solución fue neutralizada y preparada para inyectarla en geles de SDS-poliacrilamida al 12%, añadiendo 100 $\mu$ l de una solución de 2 M de Tris/HCl , 30% de glicerol (v/v) y 15 % de  $\beta$ - mercaptoetanol (v/v).



### **3.5.7.2.- Inmunodetección de DNPH unida a los grupos carbonilos de las proteínas.**

Tras la transferencia se procedió a la inmunodetección de las proteínas oxidadas con anticuerpos anti-DNPH. Para ello, la membrana fue sometida a los siguientes tratamientos:

Las soluciones usadas fueron:

- TBS (Tris-Buffer saline): 20 mM Tris-HCl, 500 mM, NaCl, pH 7,5.
- TTBS: 20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 0,05% (v/v), Tween-20, pH7,5.
- Solución de bloqueo 2% de leche en polvo exenta de lípidos en TTBS.
- Anticuerpo primario diluido anti-DNPH 1:2000 en TTBS.
- Anticuerpo secundario marcado con peroxidasa (POD) diluido 1:3000 en TTBS.
- Solución A conteniendo luminol (diacilhidrazida), cuya oxidación libera nitrógeno y luz (Boehringer Mannheim).
- Solución B conteniendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, substrato de la peroxidasa y el 4-idofenol, un compuesto que incrementa la luminescencia (Boehringer Mannheim). Reveladores y fijadores KODAK LX24 Y KODAK AL4, respectivamente.

El procedimiento fue el siguiente:

- 1.- Lavado con TBS durante 10 min.
- 2.- Incubación en 5% de solución de bloqueo durante 1 hora. Lavado con TTBS.
- 3.- Incubación con el anticuerpo primario anti-DNPH diluido en solución de bloqueo durante 1 hora con agitación a temperatura ambiente o toda la noche a 4 °C sin agitación.
- 4.- Lavado 3 veces con TTBS durante 10 min cada vez.
- 5.- Incubación con anticuerpo secundario unido a POD diluido 1:3000 durante 1 hora a temperatura ambiente.
- 6.- Lavado 4 veces con TTBS durante 15 min cada vez.

7.- Incubación con 125  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  de las soluciones A+B (100:1) durante 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad.

Para el revelado se colocó un film de KODAK (X-OMAT S film, 24x18 cm) sobre la membrana durante 10-60 segundos. Inmediatamente después, el film se sumergió en revelador, cambiando a la solución de fijación al aparecer las bandas específicas.

### **3.5.8.- Determinación espectrofotométrica de grupos carbonilos totales.**

Los grupos carbonilos totales de las proteínas se cuantificaron por reacción con 2,4- dinitrofenilhidrazina (DNPH), según el método descrito por Levine y col., (1990). Después de la derivatización de la muestra según el método citado anteriormente, se cogió un volumen de 800  $\mu\text{l}$  de la solución derivatizada que contenía una concentración de proteínas de 1 mg/ml al que se añadió ácido tricloroacético a una concentración final del 10%. Tras centrifugar a 13000 r.p.m, el precipitado fue lavado tres veces con 1ml de etanol / acetato de etilo (1:1). El precipitado se solubilizó en 500  $\mu\text{l}$  de guanidina 6 M (disuelta en una solución de 50% de ácido fórmico) durante 15 min a 37°C. Para quitar las partículas insolubles se centrifugó a 13 000 r.p.m durante 5 min. La concentración de los grupos carbonilos se determinó espectrofotométricamente a 366 nm ( $\epsilon=21000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

### **3.5.9.- Determinación de la capacidad antioxidante.**

Esta determinación se ha hecho según el método descrito por Glaser (1990). Las soluciones de partida fueron: tampón fosfato sódico 75 mM, pH 7.0, solución de Ficoeritrina de  $1.7 \times 10^{-6} \text{ M}$ , solución de AAPH 40 mM en tampón fosfato sódico y una solución de Trolox de 10 mM preparado en metanol : agua (1:1). La longitud de onda de excitación fue 540 nm y la de emisión fue 575 nm La mezcla de reacción se preparó usando los volúmenes siguientes:

Tampón fosfato 75 mM,	0.89 ml
pH 7	
Ficoeritrina ( $1.7 \times 10^{-6}$ M)	10 $\mu$ l
AAPH (40 mM)	10 $\mu$ l

La fluorescencia de la ficoeritrina se midió durante 10-15 min, tras lo cual se añadió el el AAPH incubándolo 5 min antes de medir la capacidad antioxidante del plasma humano.

### **3.5.10.- Inyecciones intraestriatales e inmunocitoquímica .**

#### **3.5.10.1.- Procedimiento quirúrgico.**

Los animales (ratas machos de la raza Wistar de 3 meses) tras ser anestesiados con hidrato de cloral (i.p., 400 mg/Kg), se fijaron en un estereotáxico (Kopf Instruments. Tujunga, CA, U.S.A.). La aguja de inyección fue bajada a través de un orificio realizado en el cráneo de acuerdo con las coordenadas del atlas de cerebro de Paxinos y Watson (1986), que para el estriado son: 0.5 mm posterior  $\pm$  2.5 mm lateral, y 6.5 mm ventral desde el punto bregma. Las inyecciones se realizaron en 3 min y la aguja se dejó en el estriado durante 5 min más para evitar el reflujo.

#### **3.5.10.2.- Inmunocitoquímica.**

A distintos tiempos tras la inyección, los animales fueron anestesiados y perfundidos con 100 ml de solución salina heparinizada (10 U/ml), seguido de 200 ml de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato, pH 7.4. Posteriormente, se

extrajeron los cerebros, para evitar daños al tejido por la congelación, sumergiéndolos secuencialmente en sacarosa al 10% durante 24 h y al 30% hasta que se hundieron en la solución (2-5 días). Los cerebros se congelaron en isopentano a  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se cortaron con ayuda de un criostato; finalmente, las secciones coronales ( $25\text{ }\mu\text{m}$ ) alternativas, a nivel de estriado, se montaron en porta objetos cubiertos de gelatina. Para cada tratamiento se utilizaron 4 animales. Para visualizar las terminales dopaminérgicas en el estriado, las secciones se incubaron con el anticuerpo primario (anti-TH monoclonal 1:200 Boëhringer-Manheim) durante 24 horas a temperatura ambiente y tras varios lavados con tampón fosfato pH 7.4, se incubaron durante 2 horas con el anticuerpo secundario biotinilado (anti-IgG de ratón obtenido en caballo, Hamilton Burlingame, CA, U.S.A.) y se revelaron con diamino bencidina (DAB) usando el sistema avidina – biotina –peroxidasa (Kit ABC, Vector) según el método descrito por Venero y col (1997). Para inactivar la peroxidasa endógena, y así evitar marcaje inespecífico al revelar con DAB, las secciones se preincubaron con  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 0.3% en metanol.

Para llevar acabo la medida cuantitativa de las áreas lesionadas, identificadas por una expresión reducida de terminales TH-positivas, se dibujaron éstas con la ayuda de un trazador a una ampliación de 20x y se calculó el área utilizando un programa de análisis de imagen (PCBAS versión 2.08e). Para cada área se usaron diez secciones corónales alternativas que corresponden al área donde la lesión ha sido óptima (desde 1.1 a - 0.1 mm anteroposterior a bregma). Los datos se expresaron en  $\text{mm}^2$  como media  $\pm$  desviación estándar de los cuatro animales inyectados (4 o 24 horas después de la inyección). La diferencia entre las áreas dañadas de los estriados derecho e izquierdo se calculó con el test *t* de Student pareado.

### **3.5.11.- Producción de anticuerpos policlonales anti-factor de elongación 2.**

Para preparar el anticuerpo policlonal anti FE-2 se usó el péptido sintético H-CGTRFTDTRKDEQGC-NH<sub>2</sub>, de peso molecular 1715,9 Da, que corresponde a

una zona de la cadena polipeptídica del FE-2 de máxima hidrofilia. El péptido fue sintetizado por Chiron Mimotopes peptide systems (Australia).

Con el fin de aumentar su capacidad inmunogénica, el péptido se unió a la proteína transportadora hemocianina de ojo de lapa (Harlow y cols, 1988) usando los reactivos comercializados por Pierce. La reacción de acoplamiento se realizó con carbodiimida (EDC) mediante el siguiente procedimiento:

- 1.- El péptido se disolvió (2 mg/ml) en una solución 140 mM NaCl, 8,0 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,7 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,5 (PBS).
- 2.- Se añadió EDC hasta una concentración final de 50 mM y se incubó 5 min a temperatura ambiente, ajustando el pH entre 7 y 7,5 con NaOH.
- 3.- Se añadió un volumen igual (péptido + EDC) de KLH y la mezcla fue incubada 2 horas con agitación suave a temperatura ambiente.
- 4.- Se paró la reacción añadiendo acetato sódico, pH 4,2, hasta una concentración final de 100 mM.
- 5.- El péptido que no había reaccionado fue eliminado por diálisis frente a PBS durante 12 horas a 4 °C.
- 6.- La solución conteniendo el péptido unido a la KLH se fraccionó y se congeló a -20 °C hasta su utilización.

### **3.5.12.- Inmunización de los animales con el péptido sintético unido a la proteína transportadora (KLH).**

Los conejos fueron inmunizados con el péptido acoplado a KLH. Se utilizaron 300-400 mg de antígeno por inoculación. En la primera inoculación los conejos fueron inyectados subcutáneamente a lo largo de la columna vertebral (10 pinchazos) con el antígeno emulsionado por sonicación en adyuvante completo de Freund (1:1 v/v). Posteriormente, se realizaron 3 inoculaciones subcutáneas más, a intervalos de 2 semanas en adyuvante incompleto de Freund (1:1 v/v). Los animales fueron

sangrados antes de la primera inyección (muestras preinmunes) y 10 días después de cada inoculación.

### **3.5.13.- Homogeneización de tejidos para ensayos del FE-2.**

Los tejidos (hígado, cerebro total, estriado, sustancia negra) fueron homogenizados en 5 volúmenes de tampón (20 mM Tris-HCl, pH=7.5, 1 mM EDTA, 50 mM DTT, 0,2 mM PMSF). El homogenizado fue centrifugado a 3000 r.p.m durante 10 min, obteniéndose un sobrenadante libre de restos celulares. El sobrenadante obtenido fue fraccionado y congelado a -40 °C para futuros ensayos.

### **3.5.14.- Inmudetección de la molécula de FE-2.**

Después de la transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa se procedió a la inmunodetección del FE-2 con anticuerpos específicos.

Las soluciones usadas fueron:

- TBS (Tris-Buffer saline): 20 mM Tris-HCl, 500 mM, NaCl, pH 7,5.
- TTBS: 20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 0,05% (v/v), Tween-20, pH7,5.
- Solución de bloqueo 2% de leche en polvo exenta de lipidos en TTBS.
- Anticuerpo primario diluido anti- FE-2 1:2000 en TTBS.
- Anticuerpo secundario marcado con peroxidasa (POD) diluido 1:3000 en TTBS.
- Solución A conteniendo luminol (diacilhidrazida), cuya oxidación libera nitrógeno y luz (Boehringer Mannheim).
- Solución B conteniendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, substrato de la peroxidasa y el 4-idofenol, un compuesto que incrementa la luminescencia (Boehringer Mannheim).
- Reveladores y fijadores KODAK LX24 Y KODAK AL4, respectivamente.

El procedimiento fue:

- 1- La membrana fue lavada con TBS 10 min.

- 2- Se incubó en 2% de solución de bloqueo durante una hora. Después fue lavada con TTBS.
- 3- La membrana se incubó con el anticuerpo primario diluido 1:2000 en solución de bloqueo durante una hora sin agitación a temperatura ambiente.
- 4- La membrana fue lavada con TTBS 10 min.
- 5- El anticuerpo secundario unido a la POD diluido 1:4000 fue añadido a la membrana e incubado un hora a temperatura ambiente.
- 6- La membrana fue lavada 3 veces con TTBS durante 15 min cada vez.
- 7- Para visualizar las bandas de proteínas específicas, se incubó la membrana con 125 (I/cm<sup>2</sup>) de las soluciones A+B (1:1) durante 5 min a temperatura ambiente y en oscuridad.
- 8- Para el revelado se colocó el film de KODAK (X-OMAT S FILM, 24X18CM) sobre la membrana durante 10-60 s. inmediatamente después, se sumergió el film en revelador, en agua al aparecer las bandas específicas y al final se cambia en la solución de fijación para fijar las bandas.

### **3.5.15.- Síntesis de 1-MeTIQ.**

1-MeTIQ se sintetizó de la manera siguiente: se añadió ácido acético gota a gota a 0°C a una solución de 2-feniletilamina en cloruro de metileno y piridina. Esta solución se agitó durante 30 min. La solución resultante conteniendo N-acetil-2-feniletilamina se evaporó y el residuo formado fue disuelto en tolueno. Para la ciclación de este compuesto la mezcla fue tratada con pentóxido de fósforo a reflujo durante 3 horas para obtener 1-metil-3,4-dihidroisoquinolina. El 1-MeTIQ fue obtenido mediante una reducción con el borohidruro de sodio en una solución de etanol durante 1 hora a 0°C. La pureza del producto se examinó por GC-MS.

### **3.5.16.- Determinación de la actividad enzimática de la síntesis de 1-MeTIQ en distintas áreas del cerebro "in vivo".**

La medida de la actividad enzimática de síntesis de 1-MeTIQ se llevó a cabo según el método descrito por Takahiro y col. (1997). Como sustratos se utilizaron feniletilamina y piruvato<sup>14</sup>C (frío y caliente de una actividad específica de 647,5 MBq/mmol) a una concentración de incubación final de 1 mM. Las estructuras fueron diluidas 10 veces en un tampón Hepes-NaOH 0,1 M, EDTA 1mM, pH 7,4 con inhibidores de proteasas (PMSF, leupeptina y pepstatina) a una concentración final de 1 µg/ml para cada uno de ellos. El volumen total de incubación para cada estructura fue 2 ml conteniendo 400 µl de homogenizado de los centros extraídos de ratas, 20 µl de piruvato, 20 µl de piruvato <sup>14</sup>C y 20 µl de feniletilamina para disparar la reacción. Tras incubar durante 60 min a 37 °C. La reacción se paró con 500µl del ácido perclórico al 25 %. La solución se homogeneizó con un agitador y fue alcalinizado con 300 µl de NaOH 10 N y a continuación se añadió 3 ml de benceno. La fase orgánica se centrifugó a 4500 r.p.m durante 15 min, usando 2 ml del sobrenadante para la medida de radioactividad.

### **3.5.17.- Extracción y cuatificación del 1-MeTIQ de suero por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC/MS).**

A 1 ml del suero humano se le añadió una solución de perclórico de 25%. La mezcla se centrifugo a 13.000 r.p.m . El sobrenadantes fue extraído con 20 ml de éter. A la fase acuosa (parte inferior) se le añadieron 750 µl de NaOH 10 N para alcalinizar la solución y se extrajo con diclorometano (2 X10 ml ). La fase orgánica se secó con carbonato sodico anhídrido (CO<sub>3</sub>Na<sub>2</sub>). Tras evaporar el disolvente, el residuo fue derivatizado con 60 µl de etilo acetato y 40 µl de ácido heptafluorobutírico anhidro a 70°C durante 30 min. La solución resultante se secó en la Savant y se resuspendió con 25 µl de cloroformo.

### **3.5.18.- Medida de la recaptación de dopamina “in vitro”.**

Para la medida de la recaptación de dopamina en sinaptosomas del cuerpo estriado de rata, incubados en solución de Krebs se siguió el método descrito por



(Lapchack y Hefti,1992). La composición de la solución Krebs fue : NaCl, 124 mM, KCl 5 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM, MgSO<sub>4</sub> 1,3 mM, NaHCO<sub>3</sub>, 26 mM, glucosa 0.45% y 100 µl de CaCl<sub>2</sub> 1,8 M. El tejido se homogenizó a 4 °C en 1,2 ml de sacarosa 0.32 M. Después, se centrifugó a 3400 r.p.m durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se recogió y se volvió a centrifugar a 14.000 r.p.m durante 20 min. El sedimento obtenido en esta segunda centrifugación se resuspendió en 400 µl de sacarosa 0,32 M. A continuación 25 µl de esta solución de sinaptosomas se preincubaron a 37°C, durante 5 min en 0,5 ml de Krebs con ácido ascórbico (1 mg/ml), pargilina (10 µM) e imipramina (10 µM). Con el fin de medir la recaptación de dopamina tritiada, se añadieron a esta solución 2µCi de 3,4-[7-<sup>3</sup>H]-dopamina y se incubó durante 20 min. Se detuvo la reacción poniendo la solución en hielo y se volvió a centrifugar rápidamente a 13.000 r.p.m durante 10 min. Por ultimo, se resuspendió el sedimento procedente de esta centrifugación en 100 µl de Tritón X-100 al 1% y se añadió 1 ml de liquido de centelleo. El contenido de dopamina tritiada se midió en un contador de centelleo (Beckman Instruments).

### **3.5.19.- Hibridación in situ.**

#### **3.5.19.1.- Obtención de la ribosonda.**

En este estudio usamos diferentes clones:

C1-la ribosonda antisentido de la TH se genero desde un plásmido amablemente cedido por el Dr. P. Sokoloff (INSERM, Paris) que contiene un fragmento EcoRI-KpnI de 380 pdb del cDNA de la TH de rata clonada en el vector PGEM-4Z. Para preparar la sonda sentido de TH, el plásmido fue linealizado con EcoR1(Diaz y col., 1995). Para preparar la sonda sentido de TH, el plásmido se linealizó con SmaI usando 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, USA).

C<sub>2</sub>- La ribosonda antisentido del DAT se generó a partir de un plásmido amablemente cedido por el Dr. M. P. Martes (INSERM, Paris), que contiene un fragmento de 800 pdb del cDNA del DAT de rata clonada 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. La sonda sentido se hizo con el mismo plásmido linealizando con Hind3 y usado como molde con la T7 RNA polimerasa (Diaz y col., 1995).

La mezcla de reacción contenía: 20 unidades de polimerasa; el tampón proporcionado con esta. ATP.CTP Y GTP cada uno a 1 mM, uridina 5'-[a-tio] [<sup>35</sup>S]trifosfato(UTP) de Amersham nuclear como marcador del ARNm ([<sup>35</sup>S]UTP) 30μM (1300Ci7mmol), DTT 4mM y 7,2 U de inhibidor de ribonucleasa dietilpirocarbonato de Serva. La reacción de marcaje transcurrió durante 2h a 37°C y fue parada con EDTA 0,5 M. Seguidamente se separó el isótopo incorporado al RNAc del que no lo fue mediante paso por columna de Sephadex microcolumnas ProbeQuant G-50 de Pharmacia Biotech para la separación de UTP no incorporado a la sonda posterior centrifugación durante 2 min a 735g.

C<sub>3</sub>- La ribosonda antisentido de GAD se generó a partir del plásmido pBluescript SK que contiene la secuencia de DNAc para la enzima ácido glutámico decarboxilasa (GAD)67 (amablemente cedido por Dr.A. Tobin; UCLA, Los Ángeles, U.S.A). El DNAc (GAD)67 de 3,2 KB fué aislado de una biblioteca de 1gt-11cDNA hecha a partir poly(A) del RNA del cerebro de una rata adulta (Erlander et al., 1991). Los ribosondas de sentido y de antisentido usados para la hibridación in situ fueron transcritos en la presencia de [<sup>35</sup>S]UTP (1300Ci/mmol; Amersham Internacional, Reino Unido).

### **3.5.19.2.- Reacción de hibridación.**

La hibridación in situ de secciones de cerebros se llevó a cabo con leves modificaciones en el método detallado por Passineti y col., (1989). Las secciones

de 12  $\mu\text{m}$  se obtuvieron en criostato disponiéndose sobre portas previamente gelatinizadas. 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 tratados con trietanolamina 0,1M pH 8,0 por 1 min y seguidamente con anhídrido acético al 0,25% en trietanolamina 0,1M 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 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 [ $^{35}\text{S}$ ]ARNc con su consecuencia 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 50 mM, pirofosfato sódico 0,1%, ARN de levadura 0,1% mg/ml, esperma de arenque 0,1% mg/ml, EDTA 1mM y sal sódico de sulfato de dextrano.

La hibridación se llevó a cabo durante 3,5h 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 astringencia las secciones se pasaron por dos soluciones con contenido decreciente de SSC 2X con  $\beta$ -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 amoníaco 0,3 M y secadas al aire.

### **3.5.19.3.- 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 autoradiográfica. 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. Debido a los niveles altos de marcaje. A la disposición típica de las agrupaciones sobre los cuerpos y al alto aumento la delimitación fue inequívoca. Solo 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 10 células para cada uno (Paxinos y Waston.,1986). En los experimentos de las ratas tratadas con melatonina, se obtuvieron las imágenes TIF mediante un microdensitómetro (NIKON Scantouch 210). Estas imágenes se analizaron mediante el programa informático PCBAS 2.08. Previamente, se hizo una calibración con una microescala de the  $\Psi$  [ $^3\text{H}$ ] administrada por el proveedor del isótopo (Amersham International) asignándose unidades de marcaje a los valores de Densidad Óptica/ $\text{mm}^2$  obtenidos. El sistema identifica objetos usando una ventana definida por el usuario, midiendo  $\text{DO}/\text{mm}^2$ . En los experimentos con melatonina la medida se hizo mediante el programa DENSIRAG BIOCROM (Francia) midiendo las unidades de densidad óptica por célula.

### **3.5.21.- Determinación de la cantidad de proteínas.**

En todos los ensayos la medida del contenido proteico se hizo mediante el método descrito por Lowry utilizando albúmina bovina como estándar (Lowry y col.,1951).

### **3.5.22.- Análisis estadístico.**

Los datos fueron comprobados usando ANOVA seguido del test Tukey. Cuando el valor de p obtenido era  $< 0,05(*)$  o  $< 0,01 (**)$  la diferencia fue considerada estadísticamente significativa.

**RESULTADOS**

#### 4.- RESULTADOS.

En una primera parte, en esta tesis se ha estudiado las alteraciones de la respiración mitocondrial por compuestos neurotóxicos y la protección de esta respiración por compuestos protectores (Apartado 4.1). En el apartado de Introducción se ha hablado de la importancia de la mitocondria como fuente de ERO's y de cómo la inhibición de la cadena respiratoria conlleva a un aumento en la producción de estos compuestos oxidantes. Las ERO's producidas a nivel mitocondrial han sido relacionadas con el proceso de envejecimiento y la inhibición del flujo de electrones parece ser el mecanismo por el que compuestos como el MPTP ejercen su acción neurotóxica. En este trabajo, hemos medido en primer lugar el efecto "in vitro" del MPTP sobre la respiración mitocondrial (Apartado 4.1.1) y, en segundo lugar, la acción protectora de compuestos antioxidantes como la melatonina (Apartado 4.1.2) y 1-MeTIQ (Apartado 4.1.3). Por otro lado, puesto que ha sido sugerido que la acción tóxica del MPTP está mediada por especies reactivas de oxígeno, se ha determinado el estrés oxidativo en diferentes biomoléculas mitocondriales (lípidos y proteínas) (Apartado 4.1.4). Estas determinaciones de oxidaciones en lípidos y proteínas se han realizado "in vitro" (Apartado 4.1.4.1), e "in vivo" (Apartado 4.1.4.2), estudiando al mismo tiempo la acción protectora de la melatonina. Puesto que 1-MeTIQ protege del efecto tóxico del MPP<sup>+</sup>, se ha estudiado su capacidad antioxidante (Apartado 4.1.5). Del mismo compuesto se ha medido la actividad de la enzima que lo sintetiza en distintas áreas de cerebro y en ratas viejas (Apartado 4.1.6) y sus niveles en plasma de enfermo de parkinson (Apartado 4.1.7).

En relación a la síntesis de proteínas, otra de las funciones celulares estudiadas (Apartado 4.2), este trabajo se centra en el FE-2, cuyas alteraciones por oxidación se estudian "in vitro" (Apartado 4.2.1) , usando diferentes compuestos oxidantes, e "in vivo", usando ratas viejas, en las que se ha descrito una disminución

importante en los procesos de traducción (Apartado 4.4.2). En ambos casos, se ha estudiado también la acción protectora de la melatonina.

#### **4.1.- Estudio del MPP<sup>+</sup> sobre la respiración mitocondrial y el daño oxidativo de lípidos y proteínas mitocondriales: Efecto de la melatonina y 1-MeTIQ.**

##### **4.1.1.- Estudio “in vitro” del efecto del MPP<sup>+</sup> sobre la respiración mitocondrial.**

El efecto del MPP<sup>+</sup> sobre la velocidad de respiración mitocondrial se ha estudiado en mitocondrias aisladas de hígado y en mitocondrias de sinaptosomas. Para la determinación de esta velocidad de respiración se utilizan compuestos desacopladores del transporte electrónico y la fosforilación oxidativo como el carbonilcianuro p-trifluorometoxyfenilhidrazona (FCCP). El FCCP ejerce su efecto aumentando la permeabilidad de la membrana interna mitocondrial a los protones. Esto hace que el gradiente de protones se disipe sin producir ATP y, consecuentemente, estimula al máximo la velocidad de respiración.

##### **4.1.1.1.- Estudio “in vitro” del efecto de MPP<sup>+</sup> (metabolito del MPTP) sobre la respiración mitocondrial en mitocondrias aisladas de hígado.**

En todos los experimentos, las mitocondrias hepáticas se preincubaron durante 5 min a 30°C en la cubeta del electrodo de oxígeno. La velocidad máxima de respiración (21,8 nmoles O<sub>2</sub>/min/mg de proteínas) se determinó añadiendo FCCP (5µm). Después, se examinó el efecto inhibitor de MPP<sup>+</sup>. El MPP<sup>+</sup> actúa sobre la velocidad máxima de respiración mitocondrial inhibiendo el complejo I de la cadena respiratoria (Singer y col., 1987; Ramsay y col., 1991; Bougria y col., 1995; Bowling y Beal, 1995; Nicklas y col., 1985; Ramsay y col., 1986). Los resultados obtenidos en nuestro trabajo son similares a los encontrados anteriormente, en el



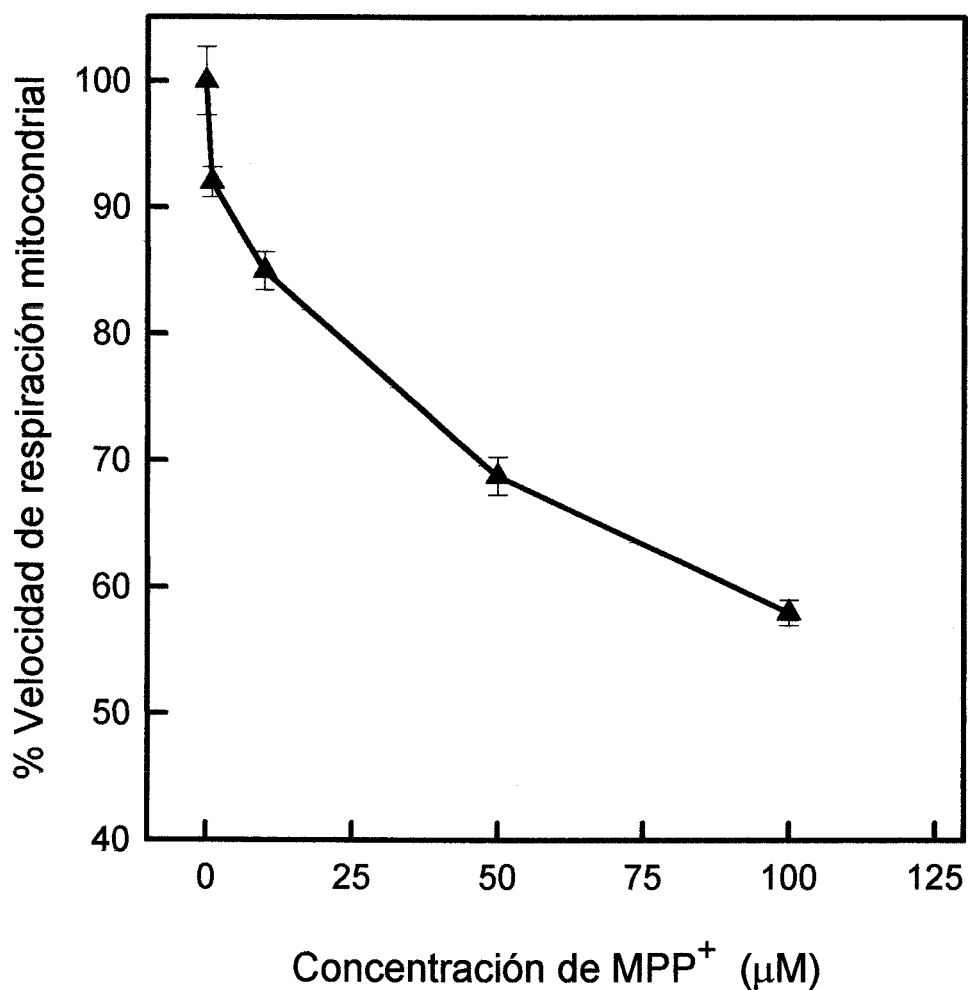
sentido de que la actividad de la respiración mitocondrial hepática se inhibe de una manera dosis dependiente por el MPP<sup>+</sup> (Figura 1). La IC<sub>50</sub> obtenida a partir de esta curva es 118 ± 19,6 μM.

El bloqueo de la respiración conduce una rápida disminución de la concentración intracelular de ATP (Di Monte y col., 1986) que conlleva a una pérdida del potencial de membrana y, por lo tanto, a la muerte neuronal mediante mecanismos que alteran la homeostasis de Ca<sup>2+</sup> (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. La acción inhibitoria del MPP<sup>+</sup> en la mitocondria no es específica de ningún órgano sino que afecta a todas las células de los mamíferos.

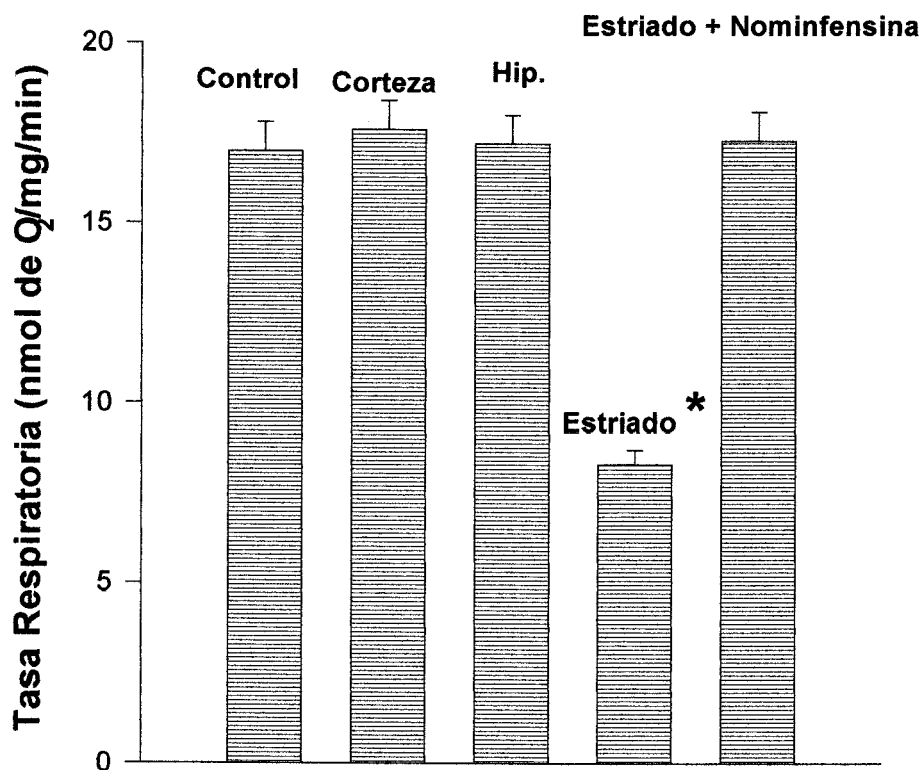
#### **4.1.1.2.- Efecto del MPP<sup>+</sup> en mitocondrias sinaptosomales de diferentes estructuras cerebrales.**

Los sinaptosomas son fracciones subcelulares preparadas a partir de las terminales sinápticas nerviosas en las que las mitocondrias están rodeadas por la membrana sinaptosomal, cuyas características dependen de la estructura cerebral de la cual proviene. Por lo tanto, la respuesta de estas estructuras al MPP<sup>+</sup> también va a depender de las características bioquímicas de la membrana sinaptosomal del centro cerebral.

El estudio de la inhibición de la respiración mitocondrial de los sinaptosomas por parte del MPP<sup>+</sup> ha sido realizado en varios centros del cerebro: estriado, corteza, e hipocampo. Tanto en corteza como en hipocampo, el MPP<sup>+</sup> (50 μM) no muestra acción inhibitoria sobre la respiración de las mitocondrias sinaptosomales (Figura 2). Sin embargo, la misma concentración de MPP<sup>+</sup> produjo una gran inhibición en estriado (Figura 2). Este resultado es debido a que el MPP<sup>+</sup> usa el sistema de transporte de recaptación de la dopamina para entrar en el interior de la neurona



**Figura 1. Efecto del MPP<sup>+</sup> sobre la velocidad de respiración máxima de mitocondrias hepáticas.** Las mitocondrias fueron incubadas con MPP<sup>+</sup> durante 5 min a 30°C. La respiración del complejo I en el estado 3 U fue iniciado por la adición de 5 μM de FCCP. Los valores son la media ± S.E.M de 5 experimentos independientes.



**Figura 2. Efecto de  $MPP^+$  sobre la velocidad de respiración de los sinaptosomas de estriado, corteza cerebral e hipocampo.** El estado 3 U de la respiración del complejo I fue iniciado por la adición de  $5 \mu M$  FCCP. Los valores son la media  $\pm$  S.E.M de 5 experimentos independientes. Significación estadística (ANOVA seguido del test t de Tukey) comparando con la velocidad de la respiración de los controles,  $F=62.29$ , \*  $p<0,05$ .

(Javitch y col., 1985; Bougria y col., 1995). Este efecto se corrobora utilizando nomifensina 10  $\mu$ M, (un inhibidor de la recaptación de dopamina). Así, al incubar al preincubar los sinaptosomas dopaminérgicos con nomifensina, el MPP<sup>+</sup> perdió su capacidad de inhibir la respiración mitocondrial al no poder entrar dentro del sinaptosoma. Este resultado sirve también como control de la integridad de los sinaptosomas preparados. Por otro lado, vimos que el MPP<sup>+</sup> no tenía efecto neurotóxico sobre la corteza cerebral e hipocampo debido a la ausencia o la escasez de transportador de dopamina en estos centros. Este resultado confirma que el MPP<sup>+</sup> es un inhibidor selectivo de centros dopaminérgicos como el estriado.

#### **4.1.2.- Efecto de la melatonina sobre la inhibición de la respiración mitocondrial producida por MPP<sup>+</sup>.**

Se ha descrito que la melatonina ejerce un efecto protector frente a la acción neurotóxica del MPP<sup>+</sup> y MPTP. Así, en lesiones estriatales y de hipocampo "in vivo" producidas por MPTP, la melatonina preserva la integridad de estas terminales nerviosas e impide la aparición de un procesos de estrés oxidativo (Acuña-Castroviejo y col., 1997). El mismo efecto se ha observado en cultivos de células (Iacovitti y col., 1997; Jin y col., 1998).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se ha procedido a estudiar el mecanismo de protección de la melatonina sobre la inhibición de la respiración mitocondrial producido por la neurotoxina MPP<sup>+</sup>.

##### **4.1.2.1.- Efecto de la melatonina sola sobre la respiración mitocondrial.**

Previo al estudio del posible efecto protector de la melatonina sobre la inhibición de la respiración mitocondrial por parte de MPP<sup>+</sup>, se estudió si la melatonina sola ejercía algún tipo de acción sobre dicho proceso tanto en mitocondrias hepáticas como en mitocondrias sinaptosomales.

En mitocondrias hepáticas se comprobó que a altas concentraciones la melatonina es también un inhibidor reversible y débil del complejo I, ya que tras la adición de succinato al medio de incubación las mitocondrias recuperaron el estado 3 de la respiración. Esta inhibición era dependiente de la concentración con una  $IC_{50}$  de  $(812 \pm 136) \mu M$  .(Figura 3).

De esta gráfica se deduce que concentraciones bajas de melatonina del orden de 1-5  $\mu M$  no tienen ningún efecto sobre la respiración mitocondrial. Consecuentemente, estas dosis fueron usadas en experimentos posteriores.

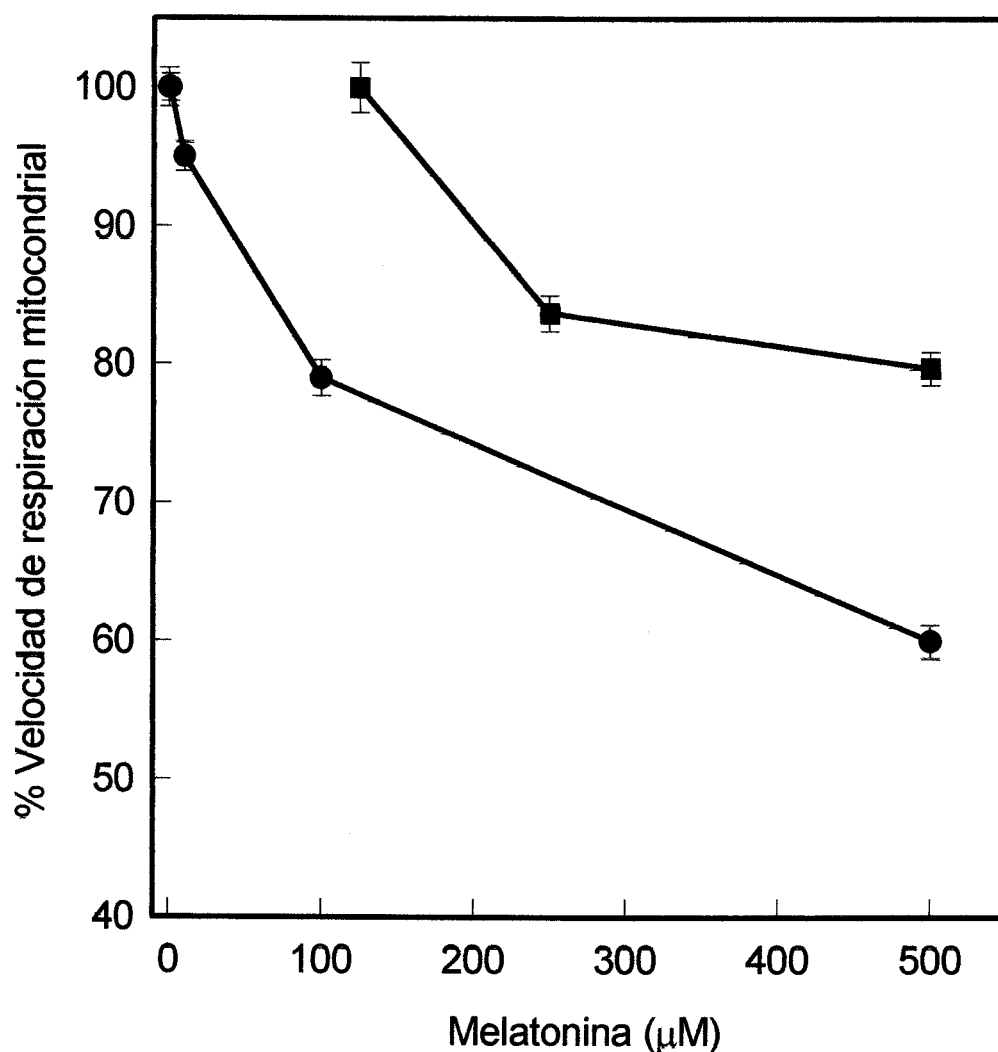
En relación a el efecto de la melatonina sobre la respiración mitocondrial sinaptosomal esta hormona se comporta también como un inhibidor débil (Figura 3), con la única diferencia de que la membrana de los sinaptosomas parece impedir el acceso rápido de la melatonina al interior de la mitocondria. De aquí, que la  $IC_{50}$  de los sinaptosomas sea mayor que la observada en las mitocondrias hepáticas.

Al contrario que el  $MPP^+$ , la inhibición de la respiración por altas concentraciones de melatonina se observó en todos los sinaptosomas de las áreas estudiadas (estriado, corteza e hipocampo), probablemente como consecuencia de su alta liposolubilidad.

#### 4.1.2.2.- Estudio "in vitro" de la melatonina sobre la inhibición de respiración mitocondrial inducida por $MPP^+$ .

Usando las concentraciones de melatonina que no tenían efecto inhibitor sobre la respiración mitocondrial, se ha estudiado si esta hormona era capaz de evitar los efectos del  $MPP^+$  en mitocondrias hepáticas y sinaptosomales.

##### 4.1.2.2.1.- Efecto protector de la melatonina sobre la inhibición de respiración mitocondrial inducida por $MPP^+$ en mitocondrias hepáticas.



**Figura 3. Efecto de melatonina sobre la velocidad de respiración máxima de las mitocondrias hepáticas aisladas y en sinaptosomas estriatales.** Los sinaptosomas fueron incubados durante 15 minutos en 30°C. El estado 3U de respiración del complejo I fue iniciado por la adición de 5 μM FCCP. (●) Hígado, (■) sinaptosomas. Los resultados se expresan como porcentaje de la respiración en ausencia del inhibidor y son la media ± S.E.M de 5 experimentos independientes. La velocidad de respiración fue determinada tras la adición de 5 μM de FCCP.

Para estudiar el posible efecto protector de melatonina sobre el efecto inhibitor de la respiración mitocondrial producida por  $MPP^+$  se añadió melatonina al medio de incubación antes de añadir el neurotoxico. En la Figura 4 se muestra que  $1 \mu M$  de melatonina es capaz de evitar totalmente la inhibición del complejo I producida por  $MPP^+$ , siendo esta protección menos pronunciada cuando el  $MPP^+$  está más concentrado ( $100 \mu M$ ).

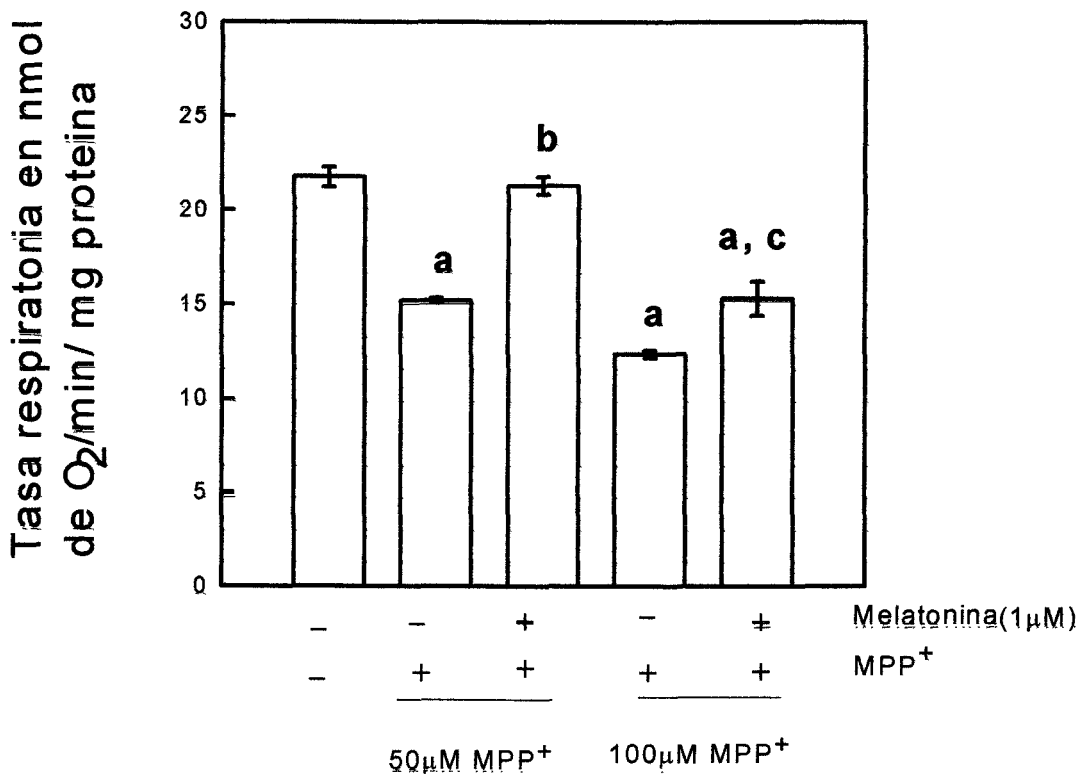
#### **4.1.2.2.- Efecto protector de la melatonina sobre la inhibición de respiración mitocondrial inducida por $MPP^+$ en sinaptosomas estriatales.**

El efecto protector de la melatonina frente a la inhibición de  $MPP^+$  en las terminales presinápticas fue también comprobado específicamente en sinaptosomas de estriado que es el centro diana de la neurotoxina. Los resultados muestran que la melatonina a concentraciones de  $1$  y  $5 \mu M$  evita parcialmente la inhibición producida por  $50 \mu M$  de  $MPP^+$ , manteniéndose la velocidad de respiración al  $83$  y  $87\%$ , respectivamente con respecto a los controles (Figura 5).

#### **4.1.2.3.- Estudio “in vivo” de la protección de melatonina sobre la acción tóxica del $MPP^+$ mediante inmunocitoquímica de TH.**

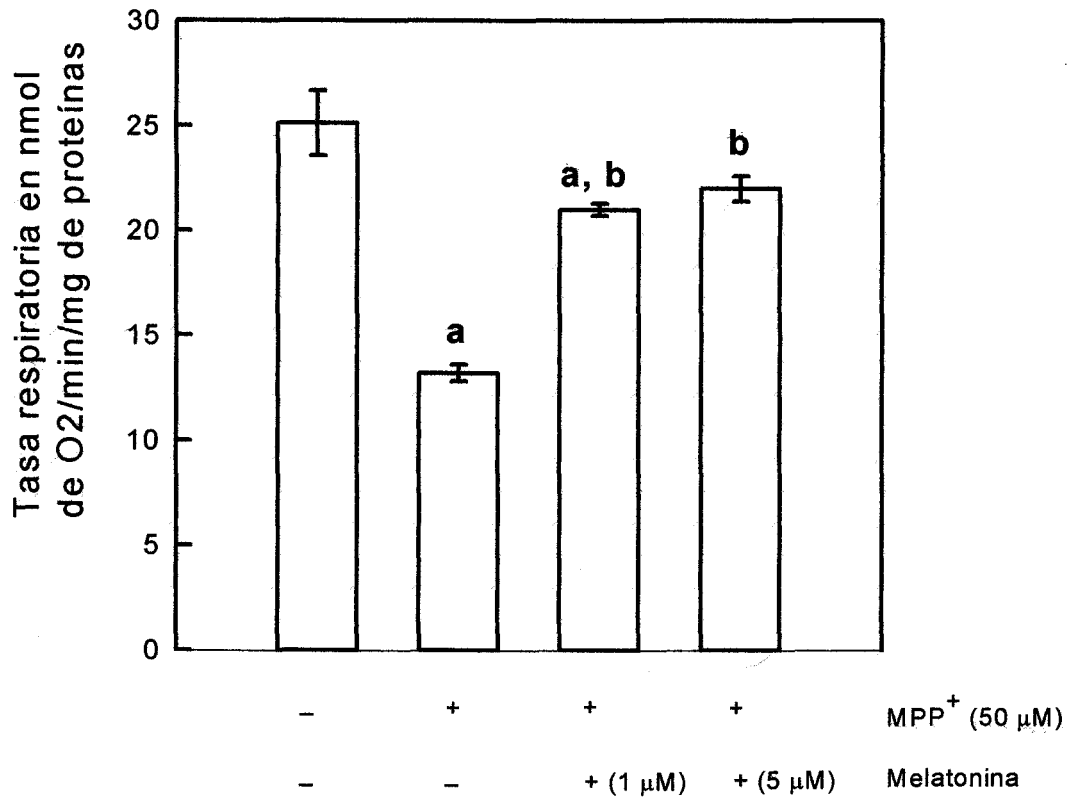
Puesto que los ensayos de estrés oxidativo mostraron que en las condiciones de estudio el  $MPP^+$  no aumentaba el daño oxidativo de lípidos y proteínas, no dejando “margen”, por tanto, para evaluar el papel protector de la melatonina, la acción “in vivo” de esta hormona se abordó mediante un ensayo de inmunodecección del TH.

Como puede verse, la inyección intraestriatal de  $MPP^+$  induce una degeneración progresiva de las neuronas terminales dopaminérgicas (Figura 6B). El tratamiento con melatonina intraperitonealmente (media hora antes la inyección intraestriatal de  $MPP^+$ , inmediatamente tras la inyección de  $MPP^+$  y cada hora durante tres horas)

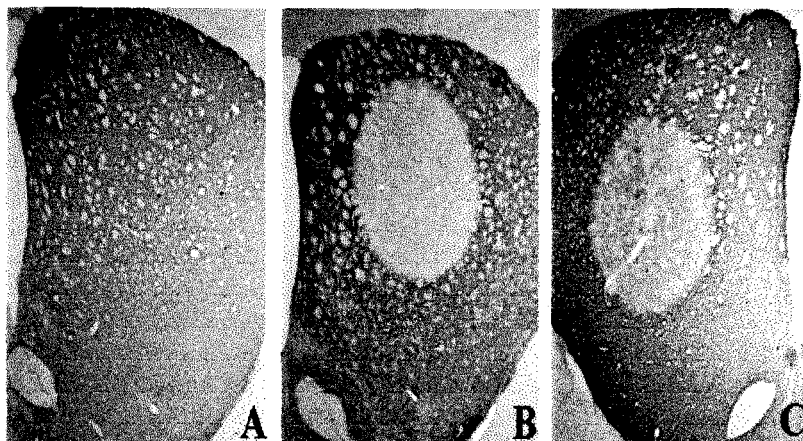


**Figura 4. Efecto protector de la melatonina sobre la inhibición por el MPP<sup>+</sup> de la velocidad de respiración mitocondrial en mitocondrias hepáticas.** Los valores son la media  $\pm$  S.E.M de 5 experimentos independientes. (a) significativamente diferente respecto a los niveles de mitocondrias controles; (b) significativamente diferente respecto a los niveles de mitocondrias tratadas con 50  $\mu$ M; (c) significativamente diferente respecto a los valores de mitocondrias tratadas con 100  $\mu$ M. (ANOVA seguido del test t de Tukey,  $F=62.29$ ,  $p<0,05$ ).





**Figura 5. Efecto de la melatonina sobre la inhibición de la velocidad de respiración máxima producida por MPP<sup>+</sup> en sinaptosomas del estriado.** Los valores son la media  $\pm$  S.E.M de 5 experimentos independientes. (a) significativamente diferente respecto a los niveles de mitocondrias sinaptosomales controles; (b) significativamente diferente respecto a los niveles de sinaptosomas tratados con 50  $\mu$ M de MPP<sup>+</sup>. (ANOVA seguido del test t de Tukey,  $F=34.10$ ,  $p<0,05$ ).



**Figura 6. Fotomicrografía de secciones coronales (secciones-cortados en criostáto) del estriado después de una inmunotinción de TH. A: Estriado de una rata inyectada con vehículo (salino/etanol). B: Estriado de una rata inyectada con MPP<sup>+</sup>. Cuatro horas post-inyección, se nota la ausencia de inmunoreactividad en el tejido inyectado. C: Estriado de una rata tratada con melatonina y MPP<sup>+</sup> como se indica en el texto.**

no alteró el número de cuerpos neuronales inmunopositivos deTH con respecto al que se observa en el estriado inyectado con MPP<sup>+</sup> sólo, lo que indica que la melatonina en este tratamiento no protege las neuronas dopaminérgicas del estriado dañadas por MPP<sup>+</sup>. Este efecto se encontró en animales analizados 4 o 24 h después la perfusión.

#### **4.1.3.- Efecto de 1-MeTIQ sobre la inhibición de la respiración mitocondrial producida por MPP<sup>+</sup>.**

1-MeTIQ es una amina endógena cuya presencia se ha descrito en ratas, ratones, monos y humanos (Khono y col., 1986; Niwa y col., 1987; Ohta y col., 1987). Este compuesto está relacionado estructuralmente con MPP<sup>+</sup> y una de sus principales características es la de poseer capacidad neuroprotectora frente a la toxicidad producida por neurotoxinas exógenas (MPTP, MPP<sup>+</sup>) y endógenas (tetraisoquinolinas, 1-benzil-tetraisoquinolinas). Así, se ha comprobado que los síntomas fisiológicos (bradiquinesia, anormalidades en el comportamiento, etc.) inducidos por neurotoxinas como MPTP, TIQ y 1-Benzil-TIQ se evitan con pretratamientos de los animales con 1-MeTIQ (Tasaki, y col, 1991; Kotake y col, 1995).

Para el estudio de cómo 1-MeTIQ protege de los efectos neurotóxicos del MPP<sup>+</sup>, se ha seguido el mismo planteamiento experimental que con la melatonina, es decir: 1.- Se ha estudiado el efecto "in vitro" del 1-MeTIQ sobre la respiración mitocondrial en mitocondrias hepáticas y sinaptosomales inhibidas con MPP<sup>+</sup>; 2.- En segundo lugar, se ha examinado la influencia "in vivo" del 1-MeTIQ sobre la neurotoxicidad generada por MPP<sup>+</sup> en estriado de rata mediante análisis inmunocitoquímicos.

##### **4.1.3.1.- Efecto del 1-MeTIQ solo sobre la respiración mitocondrial.**

Antes de estudiar el efecto protector del 1-MeTIQ sobre la inhibición de la respiración mitocondrial por parte de  $MPP^+$ , se estudió si esta isoquinolina sola ejercía algún tipo de acción sobre dicho proceso tanto en mitocondrias hepáticas como en mitocondrias sinaptosomales.

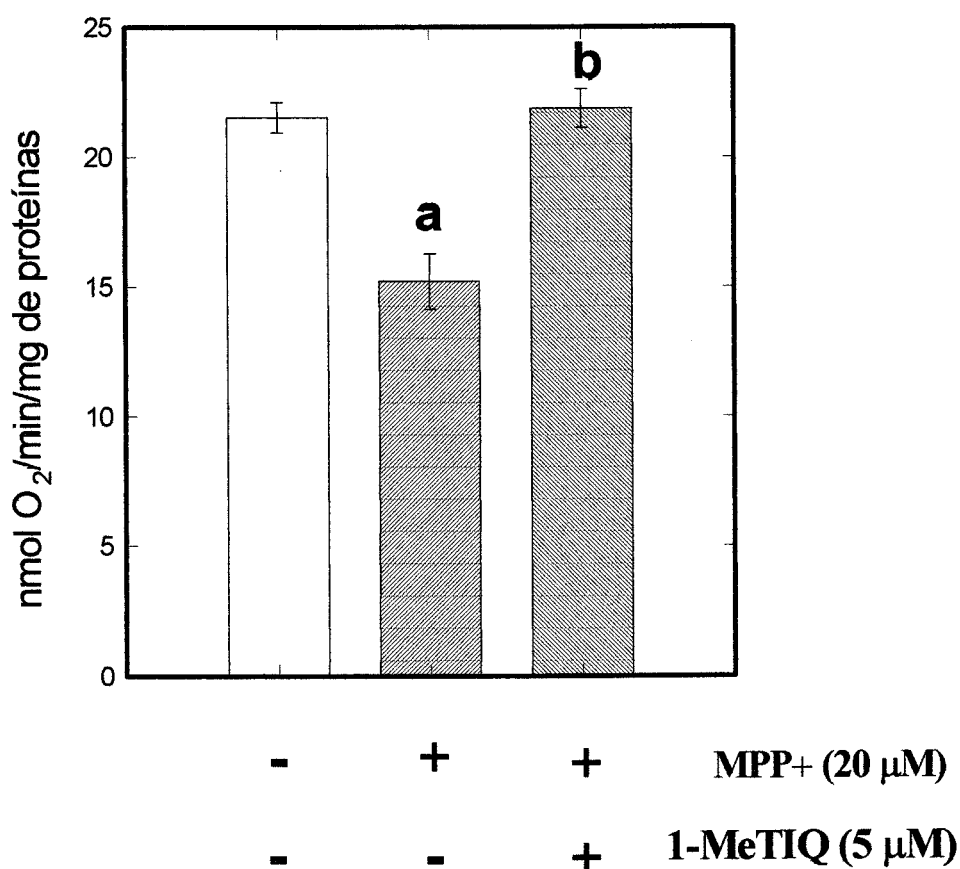
Como puede verse en la Tabla 1, tanto en mitocondrias hepáticas como en sinaptosomales, a altas concentraciones 1-MeTIQ también se comporta como un inhibidor reversible y débil del complejo I, ya que tras la adición de succinato al medio de incubación las mitocondrias recuperaron el estado 3 de la respiración. De estos resultados se deduce que concentraciones bajas de 1-MeTIQ del orden de 1-5  $\mu M$  no tienen ningún efecto sobre la respiración mitocondrial. Consecuentemente, una concentración de 5  $\mu M$  fueron usadas en experimentos posteriores. El 1-MeTIQ es también un inhibidor débil de la respiración mitocondrial en los sinaptosomas procedentes de corteza e hipocampo, debido, probablemente, a su alta liposolubilidad que le permite alcanzar todas las partes de la célula sin grandes obstáculos.

#### **4.1.3.2.- Estudio “in vitro” del efecto del 1-MeTIQ sobre la inhibición de respiración mitocondrial inducida por $MPP^+$ .**

Usando las concentraciones de 1-MeTIQ que no tenían efecto inhibitor sobre la respiración mitocondrial, se ha estudiado si este compuesto era capaz de evitar los efectos del  $MPP^+$  en mitocondrias hepáticas y sinaptosomales.

##### **4.1.3.2.1.- Efecto protector del 1-MeTIQ sobre la inhibición de respiración mitocondrial inducida por $MPP^+$ en mitocondrias hepáticas.**

El efecto del 1-MeTIQ sobre la inhibición de la respiración mitocondrial producida por el  $MPP^+$  se estudió añadiendo 1-MeTIQ a la cubeta del electrodo de oxígeno antes de incubar con  $MPP^+$ . Los resultados se muestran en la Figura 7. Como



**Figura 7. Efecto del 1-MeTIQ sobre la inhibición de la velocidad de la respiración mitocondrial hepática inducida por MPP<sup>+</sup>.** 1-MeTIQ fue añadido al medio de incubación un minuto antes de añadir MPP<sup>+</sup>. La velocidad de la respiración mitocondrial del estado respiratorio 3U fue iniciada añadiendo 5  $\mu$ M FCCP. Los resultados son expresados en nmolO<sub>2</sub>/min/mg de proteína y son la media  $\pm$  E.S.M de 5 experimentos independientes. (a) significativamente diferente respecto a los niveles de mitocondrias controles; (b) significativamente diferente respecto a los niveles de mitocondrias tratadas con 20  $\mu$ M (ANOVA seguido del test t de Tukey, F = 47.74; p < 0,005).

puede verse, la concentración de 5  $\mu\text{M}$  de 1-MeTIQ evitó totalmente la inhibición de la respiración mitocondrial hepática producida por el  $\text{MPP}^+$  (20  $\mu\text{M}$ ).

Concentration 1-MeTIQ	Mitocondria Hepática	Mit. Sinaptosomales
-	21.50 $\pm$ 0.53	25.11 $\pm$ 0.75
10 $\mu\text{M}$	20.20 $\pm$ 0.56	25.10 $\pm$ 1.38
100 $\mu\text{M}$	15.70 $\pm$ 0.80	21.58 $\pm$ 1.03

**Tabla 1. Efecto del 1-MeTIQ sobre la velocidad de respiración máxima en mitocondrias hepáticas y sinaptosomales.** Los sinaptosomas y las mitocondrias hepáticas fueron incubadas durante 15 min y 5 min respectivamente a 30°C. El estado respiratorio 3U fue iniciado por la adición de 5  $\mu\text{M}$  FCCP. Los resultados son expresados en  $\text{nmol. O}_2/\text{min}/\text{mg}$  de proteína y son la media de 5 experimentos independientes. Los valores son la media  $\pm$  E.S.M de 4 experimentos. \*  $p < 0,05$  (ANOVA seguido del test t de Tukey).

#### **4.1.3.2.2.- Efecto protector del 1-MeTIQ sobre la inhibición de respiración mitocondrial producida por $\text{MPP}^+$ en sinaptosomas estriatales.**

Como se ha mencionado anteriormente, el  $\text{MPP}^+$  (50  $\mu\text{M}$ ), (Figura 2) no afectó significativamente la velocidad máxima de la respiración sinaptosomal de corteza e hipocampo de rata. Sin embargo, el  $\text{MPP}^+$  tuvo un efecto inhibitor específico sobre los sinaptosomas estriatales, los cuales poseen el transportador de dopamina, utilizado por el  $\text{MPP}^+$  para entrar dentro de la neurona e inhibir al complejo I (Bougria y col.,1995). Por tanto, el efecto protector del 1-MeTIQ sobre

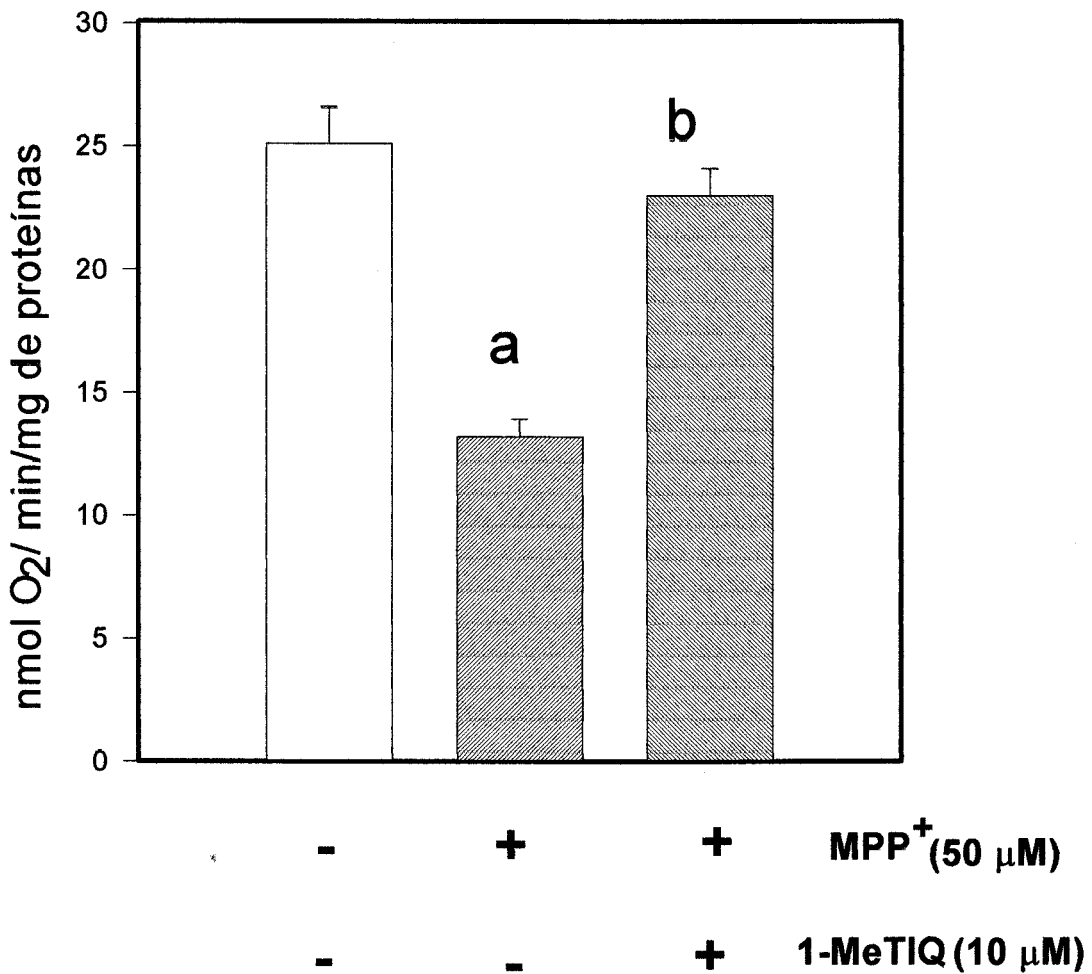
la inhibición producida por  $MPP^+$  se evaluó solamente en estriado, ya que es el centro diana de esta neurotoxina.

Como puede verse en la Figura 8, el 1-MeTIQ a una concentración de 10  $\mu M$  evitó parcialmente la inhibición producida por una concentración de 50  $\mu M$  de  $MPP^+$ , alcanzándose con ello una actividad del 91.5 % del valor inicial de la velocidad de respiración mitocondrial.

Para comprobar si el FCCP podría interferir en la protección ejercida por 1-MeTIQ frente a la inhibición de la respiración mitocondrial producida por  $MPP^+$ , se estudió el efecto de la estimulación de la cadena respiratoria con el ADP para mantener intacta la integridad de la maquinaria de respiración mitocondrial evitando el desacoplamiento del sistema del transporte electrónico y la fosforilación oxidativo. Los resultados indicaron que 1-MeTIQ produjo igualmente su efecto protector en presencia de ADP con la única diferencia de que el FCCP provocaba una velocidad de respiración mitocondrial más alta que el ADP.

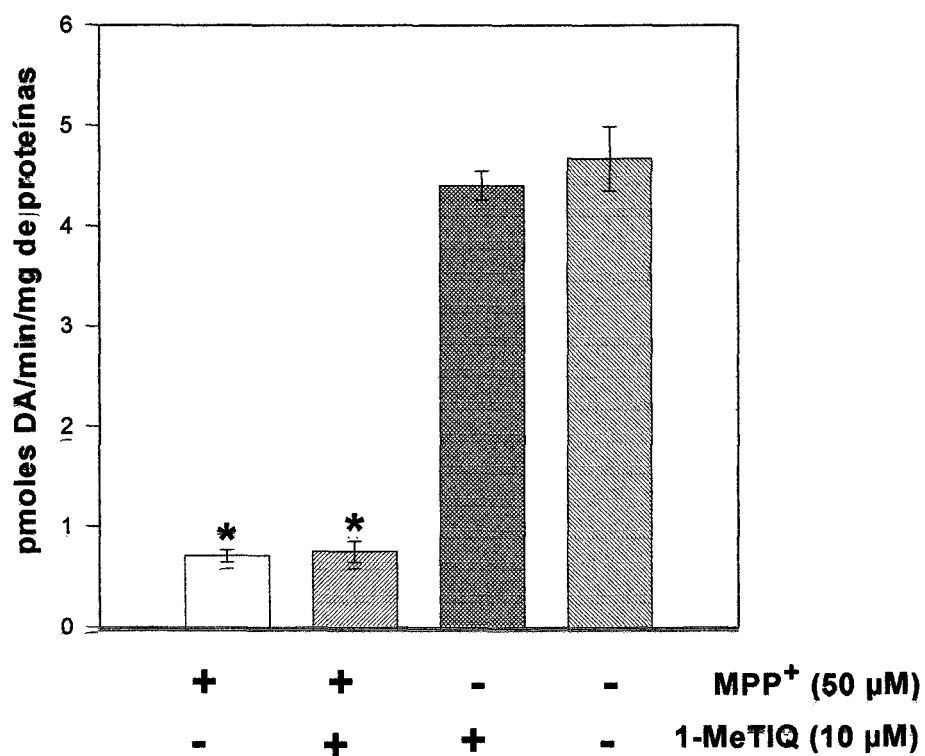
El  $MPP^+$  ejerce su acción neurotóxica específicamente en las células dopaminérgicas gracias a que utiliza el transportador de dopamina (Javitch y col., 1985). Para determinar si el efecto protector del 1-MeTIQ sobre la inhibición de la respiración mitocondrial se debe a una influencia en este sistema de transporte, se ha determinado si la recaptación del  $MPP^+$  estaba afectada por el 1-MeTIQ.

En la Figura 9 se muestra como el 1-MeTIQ no inhibe la recaptación de dopamina, no afectando ni utilizando este sistema para entrar en las células dopaminérgicas. El  $MPP^+$  se comporta de una manera distinta, ya que utiliza el transportador, compitiendo e impidiendo la entrada de dopamina. El mismo efecto se observa en presencia de 1-MeTIQ. Por lo tanto, 1-MeTIQ ni compete con  $MPP^+$  por el transportador de dopamina ni interfiere en su entrada celular.



**Figura 8. Efectos del 1-MeTIQ sobre la inhibición de la velocidad de la respiración mitocondrial sinaptosomal estriatal inducida por MPP<sup>+</sup>.** Se añadió 1-MeTIQ al medio de incubación un minuto antes de echar MPP<sup>+</sup>. La velocidad de la respiración mitocondrial del estado respiratorio 3U se inició añadiendo 5 μM FCCP. Los resultados son expresados en nmolO<sub>2</sub>/min/mg de proteína y son la media de 5 experimentos independientes. (a) significativamente diferente respecto a los niveles de mitocondrias sinaptosomales controles; (b) significativamente diferente respecto a los niveles de sinaptosomas tratados con 50 μM de MPP<sup>+</sup> (ANOVA seguido del test t de Tukey, F = 151.80; p < 0,005).





**Figura 9. Efectos de 1-MeTIQ y MPP<sup>+</sup> sobre la recaptación específica de dopamina por los sinaptosomas estriales.** La recaptación de dopamina fue determinada en presencia de MPP<sup>+</sup>, 1-MeTIQ, o bien en presencia de los dos compuestos como esta indicado en la gráfica. Los resultados se expresan en pmolDA/min/mg de proteína y son la media de 5 experimentos independientes. (ANOVA seguido del test de Tukey  $F = 151.80$ ;  $*p < 0,005$ ).

#### **4.1.3.3.- Estudio “in vivo” del efecto protector del 1-MeTIQ frente a la toxicidad del MPP<sup>+</sup>: Inmunodetección de TH.**

Para constatar el efecto protector del 1-MeTIQ observado “in vitro” sobre la acción tóxica del MPP<sup>+</sup>, se estudió este efecto “in vivo” estudiando el número de neuronas inmunopositivas de TH.

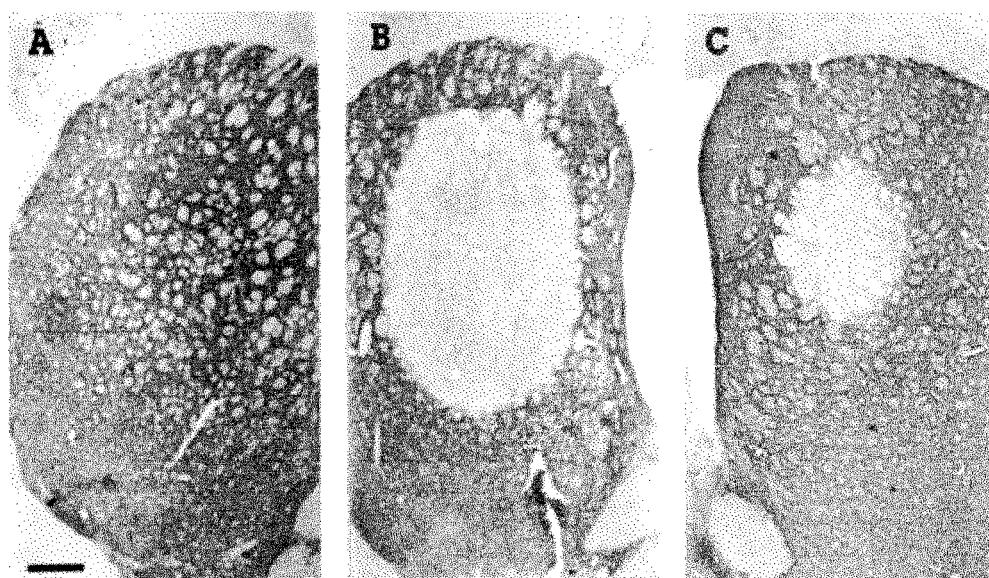
Como puede verse en la Figura 10 cuando se inyectó 1-MeTIQ con MPP<sup>+</sup>, el área que perdió la inmunotinción de TH fue menor que cuando se inyectó MPP<sup>+</sup> solo. Las áreas del estriado tratado con MPP<sup>+</sup> sólo y en presencia de 1-MeTIQ fueron, respectivamente,  $1.08 \pm 0.25$  y  $2.97 \pm 0.33$  mm<sup>2</sup> ( $p \leq 0.01$ ) 4h después la inyección.

Después de 24 h, las áreas del estriado tratado respectivamente con MPP<sup>+</sup> sólo y en presencia de 1-MeTIQ del estriado izquierdo fueron respectivamente ( $0.94 \pm 0.35$  y  $2.73 \pm 0.5$ ) mm<sup>2</sup> (\* $p \leq 0.05$ ).

#### **4.1.4.- Estrés oxidativo en lípidos y proteínas provocado por MPP<sup>+</sup> y su prevención por parte de la melatonina.**

Puesto que algunos trabajos sobre MPP<sup>+</sup> han sugerido que su acción tóxica está mediada por estrés oxidativo, hemos estudiado los niveles de grupos carbonilos de proteínas y de MDA en mitocondrias tratadas con MPP<sup>+</sup>. Paralelamente, también se han medido los mismos parámetros de oxidación en mitocondrias pretratadas con melatonina. Por otro lado, el estrés oxidativo producido por MPP<sup>+</sup> se ha estudiado “in vivo”, centrándonos en este caso en el sistema dopaminérgico de ratas tratadas con MPP<sup>+</sup> y estudiando la protección ejercida por la melatonina.

##### **4.1.4.1.- Estudio “in vitro” del estrés oxidativo en lípidos y proteínas mitocondriales producido MPP<sup>+</sup> y su prevención por parte de la melatonina.**



**Figura 10. Fotomicrografía de secciones coronales (secciones-cortados en criostáto) del estriado después de una inmunotinción de TH. A: Estriado de una rata inyectada con vehículo (salino/etanol). B: Estriado de una rata inyectada con MPP<sup>+</sup> tras 4 horas post-inyección. C: MPP<sup>+</sup> inyectado conjuntamente con 1-MeTIQ, Barra = 500  $\mu$ m.**

#### **4.1.4.1.1.- Estrés oxidativo en lípidos mitocondriales.**

El MDA es uno de los aldehídos más abundante que se producen cuando los hidroperóxidos lipídicos se hidrolizan en sistemas biológicos. Su determinación se realiza con ácido tiobarbitúrico (TBA) (Esterbauer, 1990). La incubación de mitocondrias hepáticas de rata joven con 50  $\mu\text{M}$  MPP<sup>+</sup> durante 60 min no produjo cambios significativos en los niveles de MDA como se muestra en la Tabla 2.

#### **4.1.4.1.2.- Estrés oxidativo en proteínas mitocondriales.**

Para determinar si MPP<sup>+</sup> induce modificaciones oxidativas en las proteínas mitocondriales, se han determinado los niveles de grupos carbonilos en proteínas totales de mitocondrias hepáticas incubadas con 50  $\mu\text{M}$  de MPP<sup>+</sup> sólo y en presencia de 1  $\mu\text{M}$  de melatonina.

Los resultados muestran que no hubo aumento significativo de los grupos carbonilos en ninguno de los tiempos usados (15 y 60 min) a pesar de que a los 15 minutos la inhibición de la respiración mitocondrial ya es patente (Tabla 2). La adición de melatonina al medio de incubación, tampoco alteró los niveles de grupos carbonilos totales.

	Control	15 min		60 min	
		MPP <sup>+</sup>	Melt/MPP <sup>+</sup>	MPP <sup>+</sup>	Melt/MPP <sup>+</sup>
Grupos carbonilos (nmoles/ mg prot)	1.39 ± 0.18	1.37 ± 0.34	1.36 ± 0.30	1.44 ± 0.42	1.37 ± 0.31
MDA (µmol/mg de prot)	0,41 ± 0,02	0,43 ± 0,01	*	0,46 ± 0,02	*

**Tabla 2. Niveles de grupos carbonilos totales y MDA en mitocondrias incubadas con MPP<sup>+</sup> solo y MPP<sup>+</sup> más melatonina.** El contenido de los grupos carbonilos y MDA fue medido como se ha descrito en Material y Métodos. Las alícuotas de mitocondrias incubadas fueron tomadas en los tiempos indicados (15 y 60 minutos de reacción). Las concentraciones de MPP<sup>+</sup> y de melatonina fueron de 50 µM y 1 µM, respectivamente. Los valores obtenidos son la media ± E.S.M. de 4 experimentos \* Estos valores no pudieron ser medidos debido a la interferencia de la melatonina en el ensayo.

Como no hubo aumento en los niveles de grupos carbonilos totales de las proteínas, se determinaron los grupos carbonilos en proteínas específicas separadas previamente en geles de poliacrilamida y transferidas a una membrana de nitrocelulos. La inmunodetección de grupos carbonilos en este caso se realizó Usando anticuerpos anti-DNPH. La Figura 11 muestra los niveles de oxidaciones de las proteínas mitocondriales después de incubarlas con MPP<sup>+</sup> solo y en presencia de melatonina. Como pudo verse, no hubo cambios significativos en el nivel de oxidaciones de proteínas específicas entre las muestras controles y las tratadas con la neurotoxina.



#### **4.1.4.2.- Estudio “in vivo” del estrés oxidativo en lípidos y proteínas en el sistema dopaminérgico de ratas tratadas con MPP<sup>+</sup> y papel protector de la melatonina.**

Debido a la no constatación de un fenómeno de estrés oxidativo “in vitro” en mitocondrias hepáticas tratadas con MPP<sup>+</sup>, se estudió “in vivo” la formación de MDA y grupos carbonilos en ratas a las que se les inyectó directamente MPP<sup>+</sup> en el estriado del MPP<sup>+</sup>, lo cual da lugar a la degeneración de neuronas terminales dopaminérgicas. La inducción de la muerte neuronal en el estriado se demostró mediante inmunotinción de la TH, tomándose como control el centro inyectado con solución salina. El daño oxidativo en lípidos y proteínas se determinó tanto en el centro inyectado directamente (estriado) como en la sustancia negra.

##### **4.1.4.2.1.- Niveles de MDA en estriado y sustancia negra de ratas tratadas con MPP<sup>+</sup>.**

El contenido en MDA no varió en el estriado izquierdo, lugar donde se inyectó la neurotoxina, con respecto al estriado derecho donde sólo se inyectó solución salina (Tabla 3). El mismo resultado se observó en la sustancia negra.

Lo único relevante observado fue que los niveles de MDA basales fueron superiores en sustancia negra con respecto al estriado.

##### **4.1.4.2.2.- Grupos carbonilos totales y específicos en estriado y sustancia negra de ratas tratadas con MPP<sup>+</sup>.**

El estado de oxidación en las proteínas citosólicas y mitocondriales, fue estudiado en estriado tratado con MPP<sup>+</sup> y en la sustancia negra correspondiente. En cuanto a los grupos carbonilos totales no se observaron diferencias, entre los centros tratados con MPP<sup>+</sup> y los controles. Al igual que el MDA, se observó que la

substancia negra tienen unos valores básales de oxidación de proteínas superiores al estriado (Tabla 3).

Para conocer si se producía una oxidación específica de proteínas, se determinaron los niveles de oxidación de proteínas separadas electroforéticamente, tal como se describió anteriormente.

Como puede verse, los niveles de oxidación de las proteínas mitocondriales del estriado izquierdo tratado con MPP<sup>+</sup> no presentan ningún cambio significativo en comparación con el estriado derecho de la misma rata. (Figura 12).

	ED	EI	SND	SNI
CO (nmol/mg prot)	1,42 ± 0,57	1,48 ± 0,45	2,45 ± 0,14	2,24 ± 0,51
MDA (nmol/mg prot)	10 ± 0,7	9,5 ± 0,7	26,5 ± 2,0	29,0 ± 1,4

**Tabla 3. Efecto de la inyección intracerebral de MPP<sup>+</sup> (2µg/2µl) en el estriado izquierdo de una rata joven de 3 meses, sobre los niveles de oxidación de las proteínas totales y de MDA del sistema dopaminérgico.** Los centros cerebrales fueron diseccionados 4 días después del tratamiento. Los valores son las medias ± E.S.M. de 4 experimentos independientes.

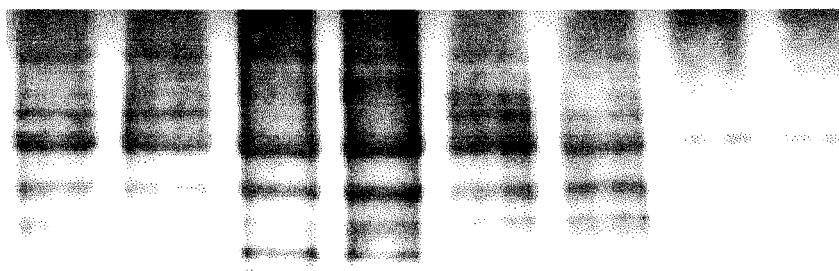
#### 4.1.5.- Medida de la capacidad antioxidante de 1-MeTIQ.

Debido a que la inclusión de antioxidantes como glutatión, ascorbato, o catalasa protege la actividad de la deshidrogenasa NADPH-CoQ reductasa en mitocondrias inhibidas con MPP<sup>+</sup>, se ha estudiado si el efecto protector "in vivo" producido por 1-MeTIQ pudiese ser debido a una actividad antioxidante.

La capacidad antioxidante fue determinada utilizando el ensayo de la Ficoeritrina (Glazer, 1988; Delange y Glazer, 1989), consistente en medir la pérdida de



$E_D$     $E_I$     $E_{CD}$     $E_{CI}$     $Sn_D$     $Sn_I$     $Sn_{CD}$     $Sn_{CI}$



**Figura 12.** Efecto de la inyección intracerebral de  $MPP^+$  ( $2\mu g/2\mu l$ ) en el estriado izquierdo de una rata joven de 3 meses, sobre los niveles de oxidación específicos de las proteínas mitocondriales del y citosólicas del sistema dopaminérgico.  $E_D$  (mitocondrias del estriado derecho),  $E_I$  (mitocondrias del estriado izquierdo),  $E_{CD}$  (citoplasma mitocondrial del estriado derecho),  $E_{CI}$  (citoplasma mitocondrial del estriado izquierdo),  $Sn_D$  (mitocondrias de la sustancia negra,  $Sn_I$  (mitocondrias de la sustancia negra izquierda),  $Sn_{CD}$  (citoplasma mitocondrial de la sustancia negra de la derecha)  $Sn_{CI}$  (citoplasma mitocondrial de la sustancia negra de la derecha).

fluorescencia de la FE cuando se pone en contacto con un compuesto oxidante (AAPH) en presencia o ausencia del compuesto cuya capacidad antioxidante se quiere determinar. El efecto antioxidante del 1-MeTIQ se midió por su capacidad de proteger la FE de la oxidación por el AAPH.

Para hacer este experimento, se disolvió 1- MeTIQ en etanol/agua (1:1 vol/vol). La bajada de la fluorescencia causada por AAPH fue de  $0,960 \pm 0,073$ . Sin embargo, cuando se añadió 2,5  $\mu\text{l}$  de una solución de 1- MeTIQ al medio de incubación anterior a una concentración final de 100  $\mu\text{M}$ , la pérdida de la fluorescencia fue  $0,495 \pm 0,02$  (media  $\pm$  E.S.M de 5 ensayos). Por otra parte, cuando se añadió sólo el solvente (metanol/agua) se observó prácticamente la misma bajada observada anteriormente ( $0,510 \pm 0,0196$ , media  $\pm$  E.S.M. de 5 ensayos). Estos resultados indican que esta amina endógena no posee actividad antioxidante.

#### **4.1.6.- Actividad 1-MeTIQasa en distintas áreas cerebrales.**

1-MeTIQ es una sustancia endógena con una actividad protectora frente al Parkinson, y se ha demostrado que su concentración disminuye en cerebros de enfermos de Parkinson y durante el envejecimiento (Ohta y col., 1987; Ayala y col., 1996). Recientemente, se ha descubierto una enzima denominada 1-MeTIQ sintetasa (1-MeTIQsa) la cual es responsable de la producción de 1-MeTIQ en cerebro de rata (Yamaha, y col., 1999), siendo los sustratos precursores piruvato y 2-feniletilamina y que se encuentra en la fracción mitocondrial-sinaptosomal.

Puesto que los niveles de 1-MeTIQ tienden a disminuir con la edad y en aquellas áreas que más se afectan con la enfermedad de Parkinson, se procedió a estudiar la distribución de esta enzima en diferentes centros cerebrales para ver si la disminución endógena de 1-MeTIQ durante el envejecimiento o la EP pudiese estar relacionada con una disminución en la actividad 1-MeTIQasa.

Para medir la actividad de esta enzima, FEA y piruvato fueron incubados en la presencia de un homogeneizado de rata como se indica en Material y Métodos, midiendo la aparición de 1-MeTIQ por GC/MS (Figura 13).

#### 4.1.6.1.- Medida de la actividad 1-MeTIQsa en distintas áreas cerebrales en ratas jóvenes y viejas.

La determinación de la actividad de 1-MeTIQsa en diferentes áreas cerebrales se llevó a cabo usando el método radioactivo. Los resultados muestran que la 1-MeTIQsa se encuentra en todos los centros cerebrales estudiados, teniendo una mayor actividad en centros dopaminérgicos, corteza cerebral e hipófisis. (Tabla 4).

Centros cerebrales	Actividad 1-MeTIQsa (nmoles/hora/mg proteína)
Estriado	0.89 ± 0.09
Sustancia negra	0.70 ± 0.09
Corteza cerebral	0.86 ± 0.04
Corteza prefrontal	0.58 ± 0.09
Hipocampo	0.48 ± 0.03
Hipotálamos	0.41 ± 0.00
Bulbo olfatorio	0.44 ± 0.00
Hipofisis	0.90 ± 0.10
Eminencia media	0.54 ± 0.07

**Tabla 4. Distribución de la actividad 1-MeTIQsa en diferentes centros cerebrales.** Los centros fueron diseccionados y homogeneizados. La incubación con 1mM FEA, 1mM [2-<sup>14</sup>C]-piruvato fue llevada a cabo durante 30 minutos.

La actividad de 1-MeTIQsa se determinó también en ratas de 24 meses. Los resultados (Figura 14) muestran que la actividad de esta enzima disminuye con la edad en los centros dopaminérgicos, corteza e hipófisis, permaneciendo inalterado en el resto de los centros estudiados.

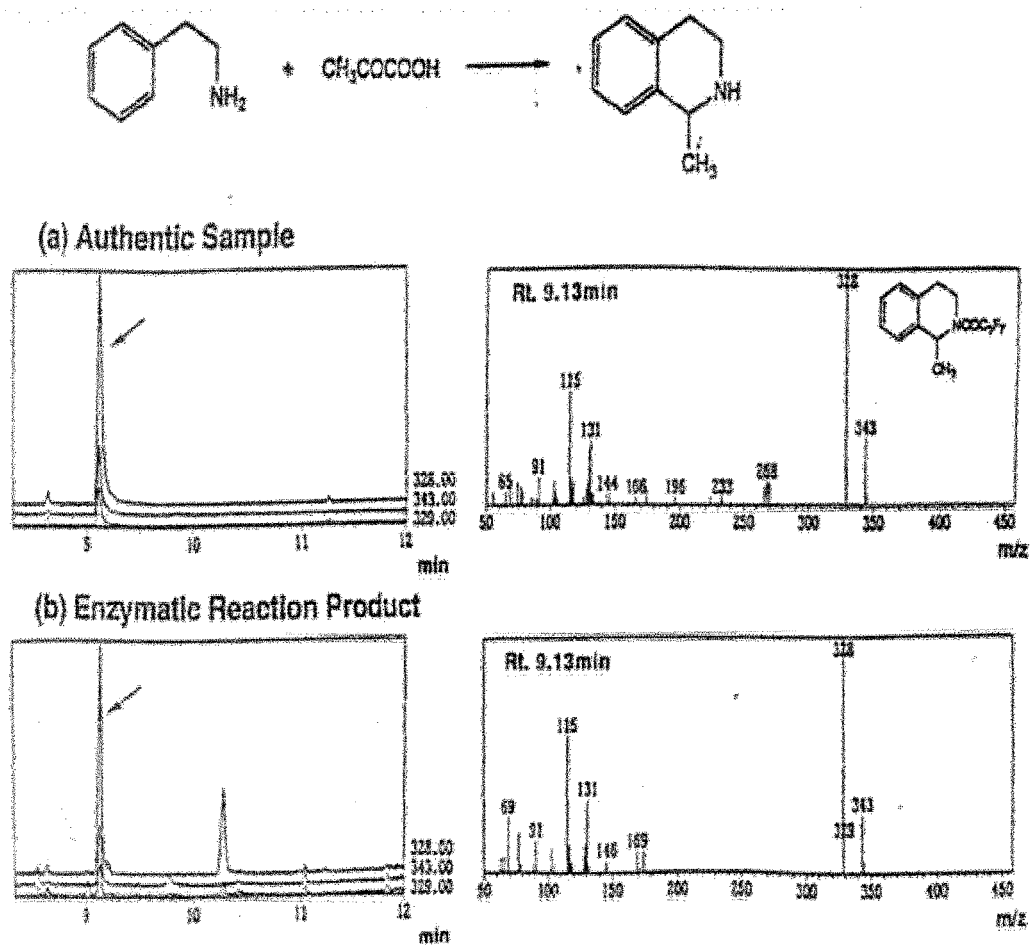
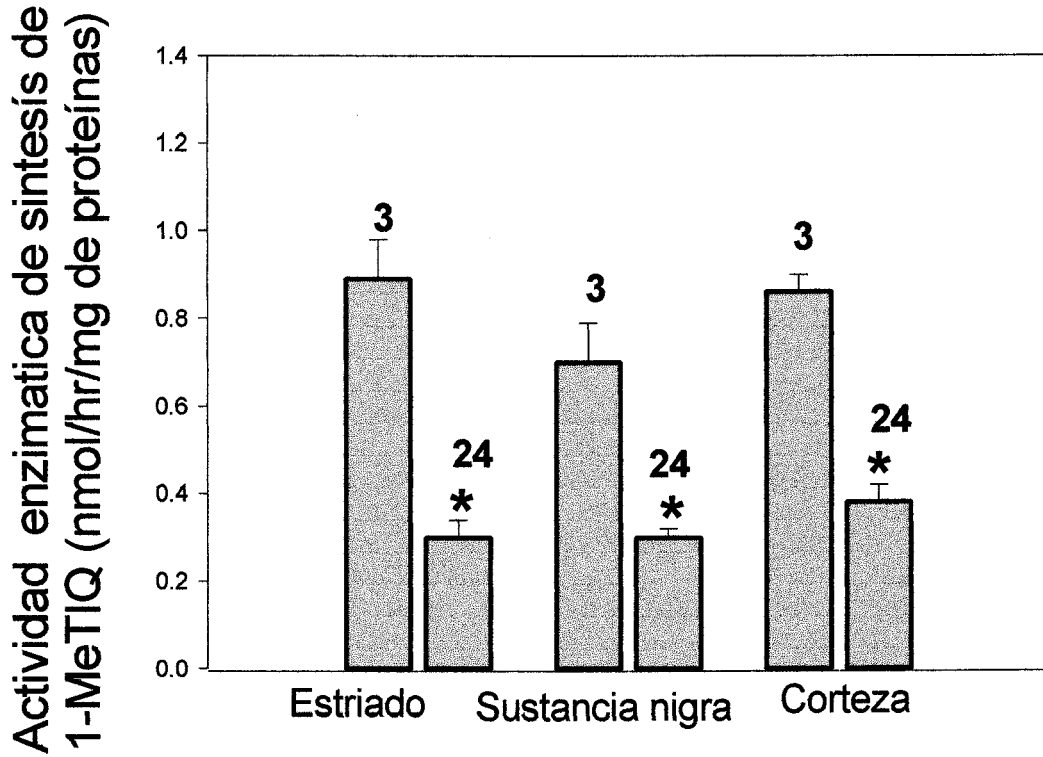


Figura 13. 1-MeTIQ biosíntesis a partir de FEA y pirúvico.



**Figura 14. Actividad 1-MeTIQsa en diferentes centros cerebrales de ratas jóvenes (3 meses) y ratas viejas (24 meses).** Los resultados son media de 5 experimentos independientes. \* $p < 0,005$  (ANOVA seguido del test de Tukey;  $F = 151.80$ ).

#### 4.1.7.- Medidas en suero de enfermos de Parkinson: medida de los niveles de 1-MeTIQ, capacidad antioxidante, grupos carbonilos y MDA.

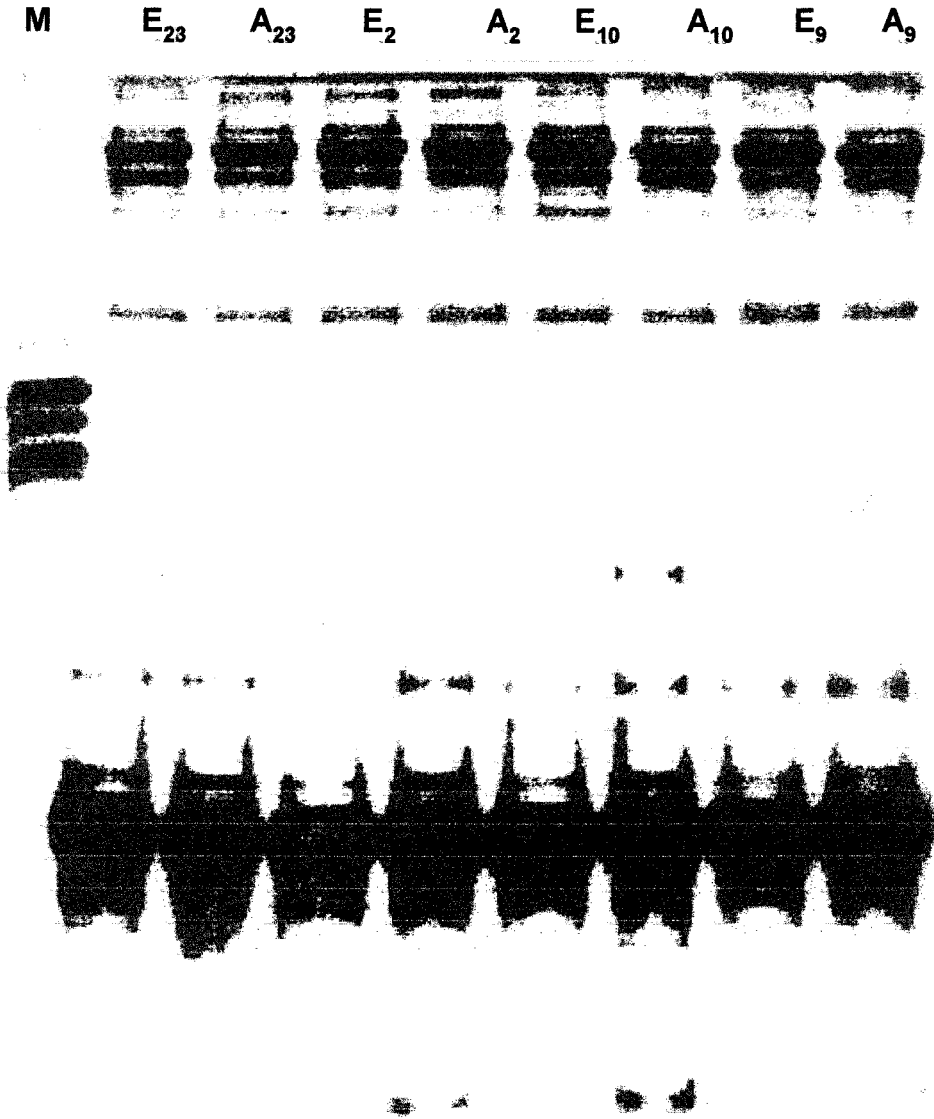
Puesto que los niveles de 1-MeTIQ disminuyen en cerebros de enfermos de Parkinson, en este trabajo se realizó un estudio de los niveles de esta importante isoquinolina en suero de enfermos de Parkinson. Se pretendía por un lado saber si era posible detectar 1-MeTIQ en suero y determinar si estos niveles podrían ser usados para detectar precozmente la enfermedad. Además, como el estrés oxidativo ha sido descrito como uno de los factores que inician o agravan esta enfermedad, en los mismos sueros de pacientes se determinó la capacidad antioxidante del suero, los grupos carbonilos y los niveles de MDA.

Los resultados de este estudio se presentan en la Tabla 5. Como puede verse, la capacidad antioxidante del suero fue igual en ambos grupos (controles y parkinsonianos). El contenido total de grupos carbonilos en las proteínas séricas tampoco fue diferente en los dos grupos. Tampoco se encontraron cambios en la oxidación de proteínas específicas separadas por electroforesis (Figura 15).

Por el contrario, los niveles de MDA si fueron diferentes en el grupo de parkinsonianos y los valores de la razón 1-MeTIQ /TIQ

	Control	Parkinson
MDA (a)	216 ± 105*	512 ± 129
Capacidad antioxidante	51,5 ± 3,3	48,7 ± 3,9
Carbonilos totales(b)	8,1 ± 1,5	6,8 ± 2,29
MeTIQ/TIQ	8,68 ± 2,2	6,84 ± 2,33

**Tabla 5. Valores de diferentes parámetros bioquímicos medidos en el plasma de enfermos de Parkinson. Datos procedentes de 20 enfermos a.- μmoles/ml; b.- μmoles/mg proteína.**



**Figura 15. Detección de grupos carbonilos en proteínas séricas de enfermos de Parkinson y en controles. Panel A:** membrana de nitrocelulosa inmunoteñida con anticuerpo de anti-DNPH. **Panel B:** membrana de nitrocelulos teñida con azul de Comasie.

#### **4.2.- Efecto de las oxidaciones sobre la síntesis de proteínas: efecto de la melatonina.**

Otra de las funciones objeto de estudio en esta tesis es la síntesis de proteínas. Ha sido descrito que este proceso tan importante para la célula se inhibe en células en cultivo por agentes oxidantes como el hidróxido de cumeno (Ayala y col., 1996; Poot y col., 1988) sin que fuese sugerido un posible mecanismo de por qué esto ocurría. Algo semejante ocurre con la inhibición de la síntesis de proteínas durante el envejecimiento. Estudios previos de este laboratorio han puesto de manifiesto que las alteraciones por oxidación del FE-2 podrían ser la causa de la inhibición de la traducción en ambas circunstancias. Es por ello por lo que se procedió a estudiar cómo el FE-2 se afectaba por diversos agentes oxidantes y si estas alteraciones podrían ser evitadas por la acción de la melatonina. Este estudio se realizó "in vitro" e "in vivo".

##### **4.2.1.- Estudio "in vitro" del efecto de diferentes agentes oxidantes sobre el FE-2: prevención por parte de la melatonina.**

Como agentes oxidantes se han empleado tres compuestos con características distintas: hidroperóxido de cumeno (HC), un agente lipidoperoxidante (Seis y Summer, 1975; Shimura y col., 1985; Halliwell y Gutteridge, 1986; Taffe y col., 1987; Poot y col., 1988; Hall y Gutteridge, 1990), 2,2'-Azobis (2-amidinopropano-hidrocloruro) (AAPH) y agua oxigenada ( $H_2O_2$ ). Como agente protector, de nuevo se seleccionó la melatonina por su carácter endógeno y ubicuo y a su probada capacidad como neutralizador de radicales libres (radical hidroxilo, peroxilo, peroxinitrilo, anión superóxido, peróxido de hidrogeno y oxígeno singlete (Tan y col., 1993; Pieri y col., 1994) y por ser un compuesto inhibidor de la peroxidación lipídica (Reiter y col., 1995).

El papel protector "in vitro" de la melatonina se ha estudiado en homogeneizados y células enteras procedentes de hígado y cerebro, en los cuales se determinó los

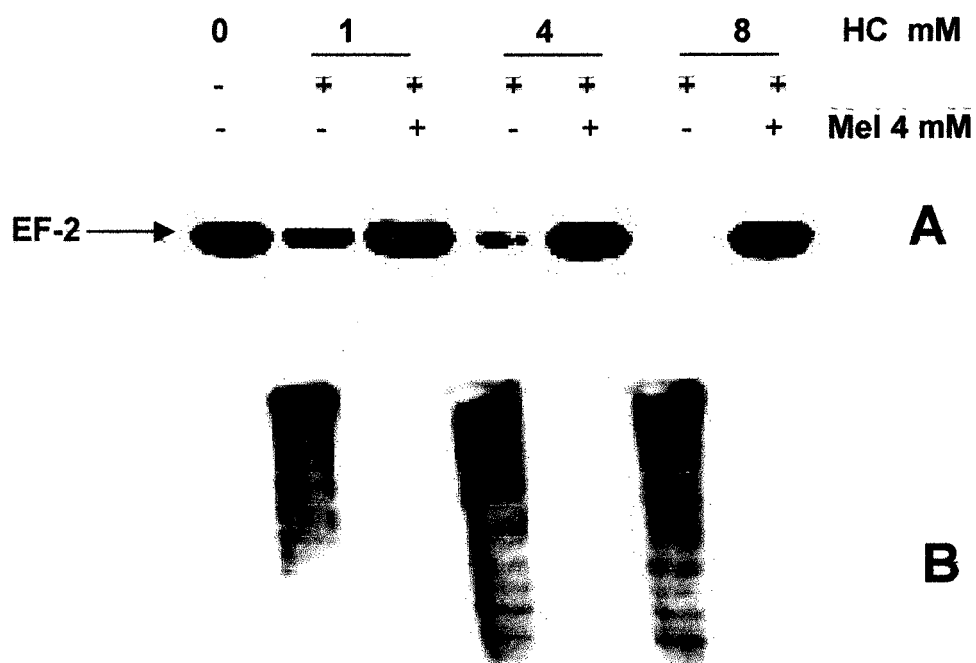


niveles de proteínas oxidadas, peroxidación de lípidos y los niveles e integridad molecular del FE-2.

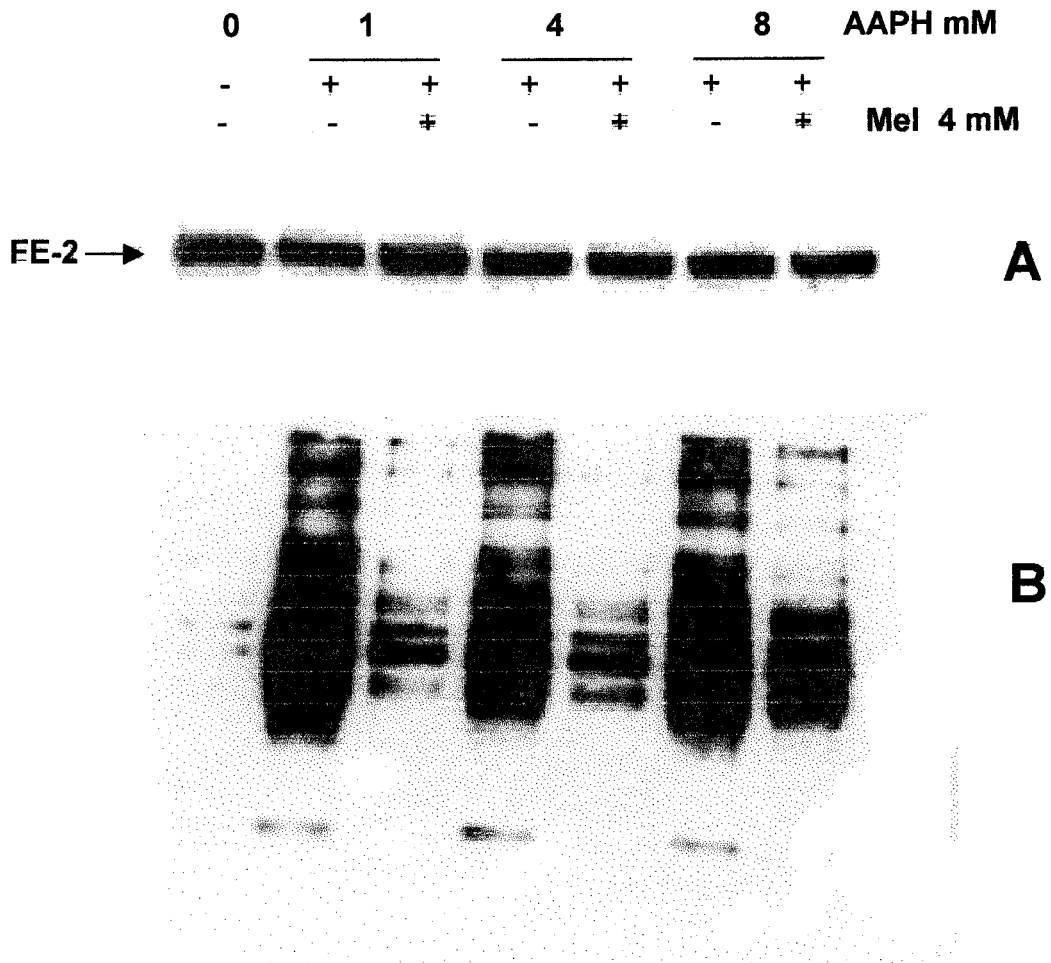
#### **4.2.1.1.- Efecto de diferentes agentes oxidantes sobre el FE-2, grupos carbonilos de proteínas específicas en homogeneizados hepáticos.**

Los homogeneizados hepáticos fueron tratados con distintas concentraciones de agentes oxidantes y con melatonina a concentración constante. En todos los casos, el FE-2 fue inmudetectado en membranas de nitrocelulosa usando anticuerpos policlonales anti-FE-2 obtenidos en nuestro laboratorio. En el caso del tratamiento del homogeneizado con HC, se observa una disminución de la proteína cuando se emplearon 1 y 4 mM de HC, hasta llegar a desaparecer totalmente a una concentración de 8 mM (Figura 16). Esto pone de manifiesto la presencia un proceso de fragmentación total, o por lo menos del dominio N-terminal que es la parte de la molécula donde se localiza el epítipo usado para la fabricación del anticuerpo. Como puede verse, la inclusión de 4 mM de melatonina evitó el fenómeno de fragmentación inducido por el HC. Por otro lado se observa que ni el AAPH (Figura 17) ni el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 18) modifican la cantidad y tamaño de la molécula de FE-2.

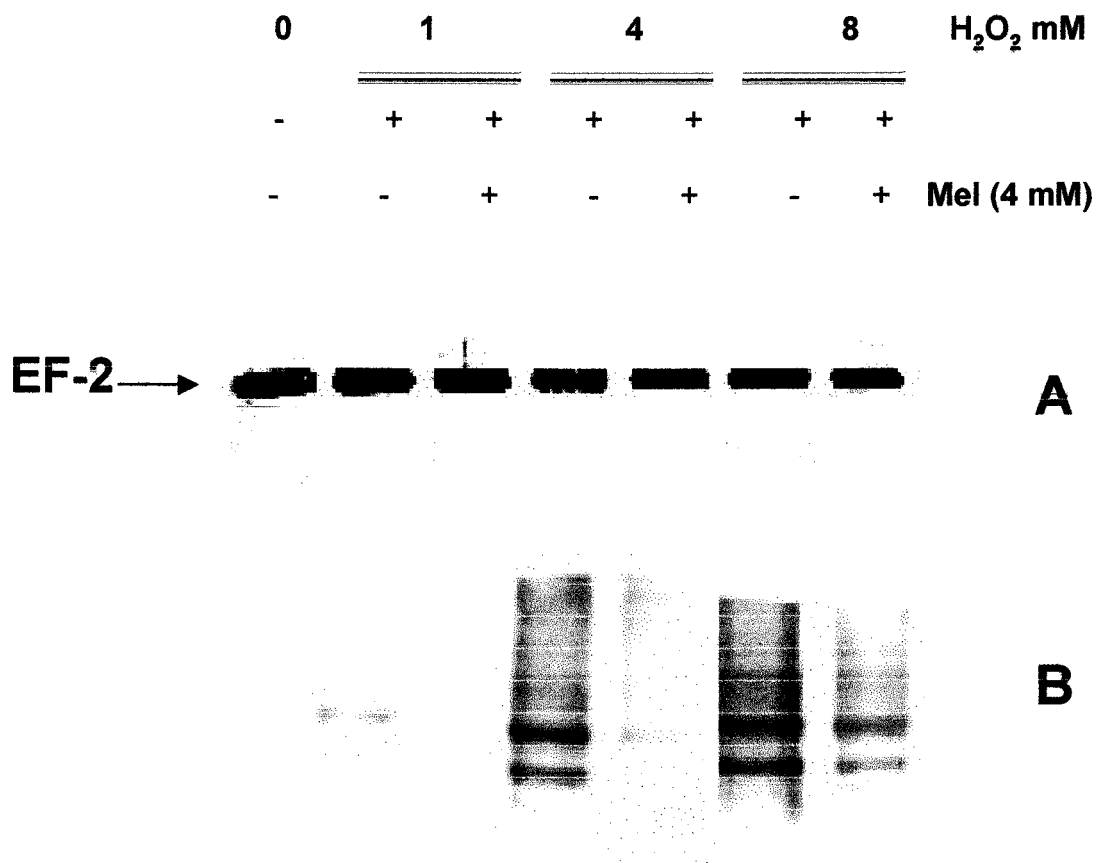
Con relación a los grupos carbonilos específicos, los tres agentes oxidantes produjeron un incremento generalizado de grupos carbonilos en las proteínas. En este caso, la inclusión de 4 mM de melatonina en el medio de incubación evitó los daños oxidativos en proteínas causados por todos los sistemas oxidantes (Figura 16-18). Estos resultados demostraron la no existencia de una relación directa entre la generación de proteínas oxidadas y fragmentación del FE-2.



**Figura 16. Análisis de la integridad molecular del EF2 y de la generación de grupos carbonilos en un homogenizado de hígado de rata de 3 meses tratados con diferentes cantidades de HC y melatonina. Panel A: ilustra el estado molecular de EF2. Panel B: ilustra los niveles de oxidación de las proteínas específicas. Las medidas se realizaron mediante inmunoblotting, la inmunoreactividad fue detectada por el método de quimioluminiscencia detallado en Materiales y Métodos.**



**Figura 17. Análisis de la integridad molecular del EF2 y de la generación de grupos carbonilos en un homogenizado de hígado de rata de 3 meses tratados con diferentes cantidades de AAPH y melatonina. Panel A: ilustra el estado molecular de EF2. Panel B: ilustra los niveles de oxidación de las proteínas específicas. Las medidas se realizaron mediante inmunoblotting, la inmunoreactividad fue detectada por el método de quimioluminiscencia detallado en Materiales y Métodos.**



**Figura 18. Análisis de la integridad molecular del EF-2 y de la generación molecular de los grupos carbonilos en un homogenizado de hígado de rata de 3 meses tratado con agua oxigenada sólo y en presencia de melatonina 4 mM. Panel A: ilustra el estado molecular de EF-2. Panel B: ilustra los niveles de oxidación de las proteínas específicas. Las medidas se realizaron mediante inmunoblotting, la inmunoreactividad fue detectada por el método de quimioluminiscencia detallado en Materiales y Métodos.**

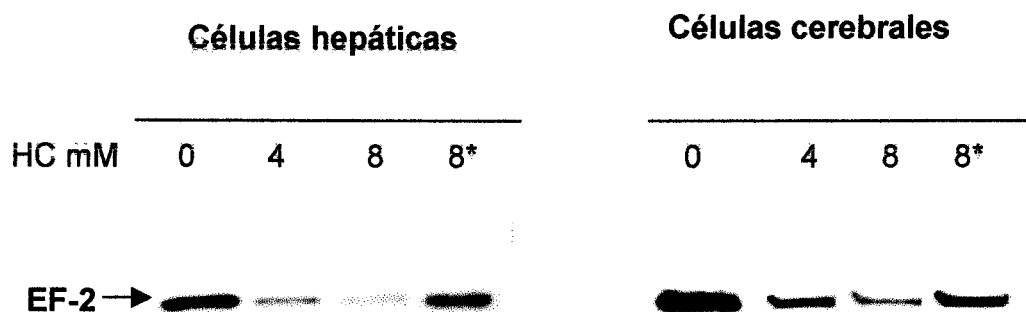
Para determinar si las proteasas endógenas presente en el extracto hepático están asociadas a la desaparición del FE-2, los experimentos con HC se realizaron en presencia de una mezcla de inhibidores de proteasas (leupeptina, pepstatina, apostatina y PMSF; 1µg/ml). Como puede verse en la Figura 19 la presencia de inhibidores no influyó en el proceso de fragmentación y la desaparición de FE-2 se produjo de forma similar a la descrita anteriormente. También los niveles de oxidación de proteínas específicas aumentaron en los dos casos (Figura 19). Estos resultados muestran que las proteasas no están implicadas en el mecanismo de desaparición de FE-2, siendo los agentes lipidoperoxidantes o los compuestos finales de peroxidación lipídica los posibles responsables.

#### **4.2.1.2.- Efecto del HC sobre el FE-2 en cortes hepáticos y cerebrales.**

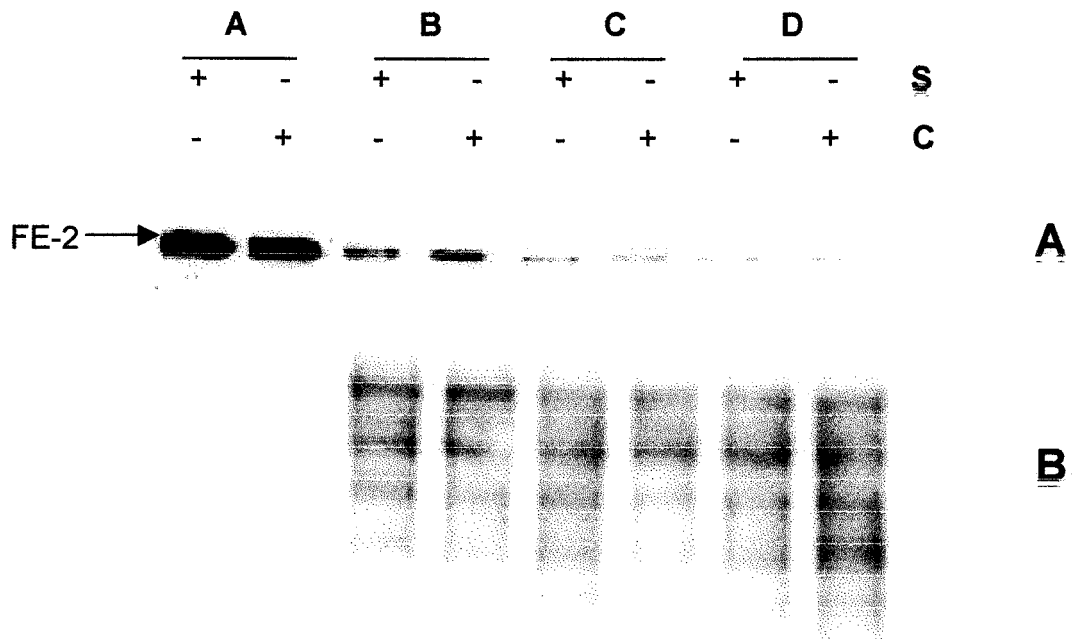
El efecto de fragmentación del FE-2 por parte del HC fue evaluado también en cortes de hígado y cerebro, muestras en las que el FE-2 está confinado en el citoplasma y en las que todas la maquinaria celular está íntegra (sistemas antioxidantes, etc). Como puede verse, el HC produce la fragmentación del FE-2, pero de menor extensión, lo cual puede ser debido a que en estas condiciones el FE-2 está menos accesible al HC. Asimismo, la melatonina se muestra menos eficiente en el mantenimiento de la integridad molecular del FE-2 que en el caso del homogeneizado de tejido (Figura 20).

#### **4.2.1.3.- Efecto de distintos compuestos oxidantes sobre los niveles de MDA en homogeneizado de hígado y en cortes de tejido.**

La incubación tanto de homogeneizado como de cortes de hígado de rata joven con HC produjo un aumento significativo de 9 veces en el nivel de MDA (Tabla 6). Sin embargo, la incubación de la misma muestra bien con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bien con AAPH no produjo ningún cambio significativo en los niveles de MDA.



**Figura 19.** Inmunodetección del EF-2 y en cortes hepáticos y cerebrales de 300  $\mu\text{m}$  de una rata joven de tres meses. La inmunodetección se llevó acabo usando anticuerpos policlonales anti-EF-2 y el método de quimioluminiscencia detallado en Materiales y Métodos. La concentración de melatonina fue 4 mM.



**Figura 20. Estado molecular de EF-2 y niveles de oxidación de proteínas correspondientes en muestras de homogeneizados de hígado tratados con HC a concentraciones crecientes con y sin inhibidores de proteasas. A: muestra control sin inhibidores de proteasas (S), con inhibidores de proteasas (C), B: HC (1 mM), C: HC (4 mM), D: HC (8 mM). Panel A: ilustra el estado molecular de EF-2. Panel B: ilustra los niveles de oxidación de las proteínas específicas.**

El efecto de la inhibición de la peroxidación lipídica por parte de la melatonina en el caso del HC no ha podido ser comprobado debido a que esta hormona interfiere en el método del TBA. No obstante, usando otros métodos de determinación de peroxidación lipídica, ha sido descrito que la melatonina protege frente a dicho proceso (Daniela y col., 1995; Byung y col., 1998; Dario Acuña-Castroviejo y col., 1996).



**MDA ( $\mu$ moles/ mg de proteínas)**

	Control	HC	AAPH	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<b>Homogeneizados</b>	$7,7 \pm 0,33$	$64,07 \pm 1,01^{**}$	$8,4 \pm 0,92$	$7,4 \pm 0,67$
<b>Células:</b>				
Hepáticas	$5,42 \pm 1,21$	$77,60 \pm 10,74^{**}$	$5,55 \pm 0,82$	$5,28 \pm 0,28$
Cerebrales	$5,73 \pm 0,18$	$31,75 \pm 1,76^{**}$	$5,15 \pm 0,91$	$6,33 \pm 0,24$

**Tabla 6. Efecto de diferentes agentes oxidantes en los niveles de MDA en homogeneizados hepáticos y cortes de tejido.** El MDA fue determinado usando ácido tiobarbitúrico. Los resultados son la media  $\pm$  E.S.M. de 5 experimentos independientes (ANOVA seguido del test t de Tukey;  $^{**}p < 0,01$ ).

#### **4.2.2.- Estudio “in vivo” del FE-2 y del estrés oxidativo en lípidos y proteínas: efecto protector de la melatonina.**

Teniendo en cuenta el efecto positivo de la melatonina sobre la preservación “in vitro” de la integridad molecular del FE-2, y conociendo que hay un proceso de fragmentación del FE-2 durante el envejecimiento, implicado en el descenso en la síntesis de proteínas (Parrado y col., 1999), se procedió a estudiar el efecto de la melatonina sobre la estructura del FE-2, los niveles de MDA y los grupos carbonilos en ratas viejas “in vivo”.

##### **4.2.2.1.- Alteración del FE-2 durante el envejecimiento: efecto de la melatonina.**

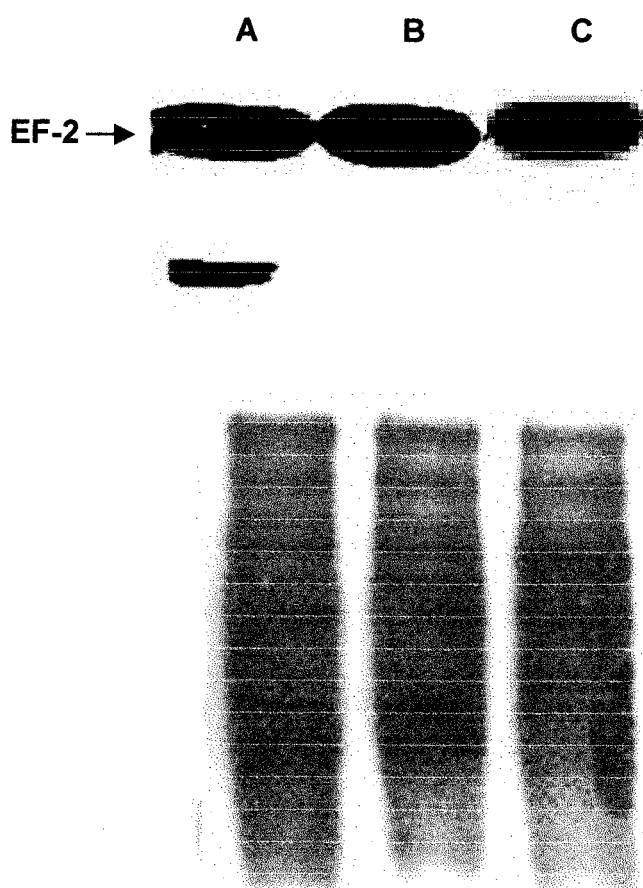
El FE-2 de ratas viejas presenta un aspecto fragmentado probablemente debido al aumento del estrés oxidativo (Figura 21). Sin embargo, el FE-2 de ratas viejas de 22 meses tratadas con melatonina durante 2 meses tiene un aspecto semejante a las ratas jóvenes en cuanto a la integridad molecular del FE-2.

##### **4.2.2.2.- Efecto del envejecimiento sobre los niveles de proteínas oxidadas.**

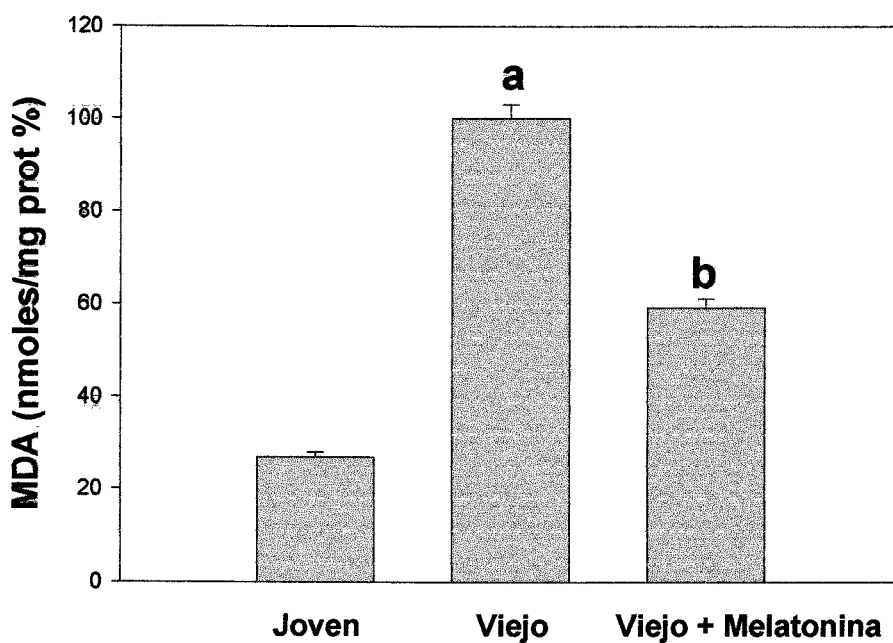
El análisis de los niveles de oxidación de las proteínas de homogeneizado de hígado de las ratas viejas no presentan cambios significativos con respecto a las ratas jóvenes (Figura 21)

##### **4.2.2.3.- Efecto del envejecimiento sobre los niveles de MDA: papel protector de la melatonina.**

Los resultados obtenidos del tratamiento de las ratas viejas con melatonina reflejan que el daño oxidativo en lípidos durante el envejecimiento se redujo significativamente en las ratas que reciban una dosis de 20 mg/l de melatonina durante dos meses (Figura 22).



**Figura 21.** Estado molecular del EF-2 y de los grupos carbonilos correspondientes de homogeneizado de hígado de ratas viejas de 22 meses tratadas "in vivo" con melatonina durante dos meses. el EF-2 fue inmunoteñido en membranas de nitrocelulosa usando anticuerpos policlonales anti-EF-2. Carril A: rata vieja, carril B: rata joven y carril C: rata vieja tratada con melatonina.



**Figura 22. Niveles de MDA en extractos de rata viejas tratadas durante dos meses con melatonina.** Los resultados están expresados en porcentaje respecto al control y son la media  $\pm$  E.S.M de 5 experimentos independientes. (a): significativamente diferente respecto a los niveles de MDA de ratas jóvenes. (b): significativamente diferente respecto a los niveles de MDA de ratas viejas.(ANOVA seguido del test de Tukey.  $F(1,10) = 8.367$ ).

**DISCUSIÓN**

## 5.- DISCUSIÓN

Las alteraciones de dos funciones vitales para las células, la respiración mitocondrial y la síntesis de proteínas, causadas respectivamente por la acción de compuestos neurotóxicos y por el estrés oxidativo exógeno y endógeno, así como su protección mediante el uso de compuestos antioxidantes y protectores (melatonina y 1-MeTIQ) se han examinado en este trabajo.

### 5.1.- Efecto protector de melatonina frente a la acción del MPP<sup>+</sup>: protección de la cadena respiratoria.

Una parte de nuestros experimentos ha consistido en estudiar el efecto de melatonina sobre la disfunción mitocondrial producida por MPP<sup>+</sup>, "in vitro". El tratamiento de las mitocondrias con MPP<sup>+</sup> inhibe la velocidad de respiración (Figura 1). Este efecto tóxico del MPP<sup>+</sup> es debido a la inhibición del flujo de electrones a nivel del complejo I (Bougria y col., 1995; Singer y col., 1987; Ramsay y col 1991).

Se ha descrito que inhibidores débiles de la velocidad de la respiración del complejo I impiden el efecto tóxico de otros más potentes. Así, el MPP<sup>+</sup> y sus análogos compiten con la rotenona y la piericidina, inhibidores mucho más potentes, por el sitio de unión en el complejo I, impidiendo el acceso de estos últimos. Esta clase de competición ha sido también comprobada en cultivos de neuronas dopaminérgicas en las que el Pentatol protegió contra la toxicidad de MPP<sup>+</sup> (Sanchez-Ramos y col., 1988). En general los barbituratos interrumpen el paso de electrones desde la NADH deshidrogenasa a la ubiquinona (Sanchez-Ramos y col., 1988; Weinbach y col., 1969). Estos inhibidores al competir con MPP<sup>+</sup> para unirse al mismo sitio del complejo I de la cadena respiratoria, proporcionan cierto grado de protección contra la toxicidad del MPP<sup>+</sup>.

Uno de los compuestos usados en este estudio debido a la gran cantidad de referencias bibliográficas en la que se describe sus efectos protectores es la

melatonina. Los resultados demuestran que 1  $\mu\text{M}$  de melatonina previene totalmente la inhibición de la velocidad de la respiración del complejo I producida por 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{MPP}^+$  en mitocondrias aisladas hepáticas (Figura 4). El mismo efecto se observó en mitocondrias sinaptosomales (Figura 5) en las que el efecto protector de melatonina fue menos importante que en mitocondrias hepáticas.

Los estudios polarográficos muestran también que la melatonina es capaz de interaccionar con el complejo I de mitocondrias hepáticas y sinaptosomales estriatales (Figura 3). La melatonina, por tanto, tiene un doble efecto dependiendo de su concentración, lo que sugiere que a concentraciones fisiológicas (nM) esta hormona puede jugar un papel neuroprotector, tal como ha sido descrito por varios autores (Vakkuri y col., 1984; Claustrat y col., 1986). Su efecto protector puede ser debido al fenómeno mencionado de competitividad entre un inhibidor débil y uno fuerte por el complejo I. Según esto, la función protectora de la melatonina "in vitro" contra la toxicidad de  $\text{MPP}^+$  descrita por Iacovitti y col. (1997) y Acuña-Castroviejo y col. (1997) puede estar relacionada fundamentalmente con su capacidad de evitar la alteración del metabolismo energético.

Dos efectos han sido descritos como causa de la muerte celular después del tratamiento con  $\text{MPP}^+$ : 1) el descenso de la síntesis de ATP que conduce a un fallo energético (Ramsay y col., 1986; Nicklas y col., 1987), y 2) el daño oxidativo consecuente al aumento de producción de los radicales libres (Hasegawa y col. 1990; Fahn y col., 1992). Puesto que los dos mecanismos pueden estar implicados en la muerte celular (Bowling y col., 1995), en este trabajo se ha evaluado también el nivel de estrés oxidativo mitocondrial en las condiciones experimentales utilizadas midiendo MDA y los grupos carbonilos totales y específicos de las proteínas mitocondriales (Schacter y col., 1994; Lowry y col., 1951).

Los resultados muestran que en las mitocondrias hepáticas tratadas con  $\text{MPP}^+$  no se produjo un aumento de estrés oxidativo ni en los lípidos ni en las proteínas

totales ni en proteínas específicas (Tabla 2, Figura 11). La inclusión de melatonina en el medio de incubación no alteró el nivel de oxidación de las proteínas (Tabla 2, Figura 11). Esto sugiere que en estas condiciones experimentales el efecto protector de la melatonina está relacionado fundamentalmente con su capacidad de interacción con el complejo I. Esto no excluye la posibilidad de que el MPP<sup>+</sup> pueda generar radicales libres posteriormente y que la capacidad antioxidante de la melatonina sí contribuya a su efecto protector de melatonina como ha sido descrito con otras moléculas secuestradoras de radicales libres (Xu y Yu, 1992; Wegner y col., 1985).

Estos resultados permiten especular con la posibilidad de que la melatonina pueda proteger contra el efecto tóxico de otros compuestos endógenos parkinsongénicos como la tetraisoquinolina (TIQ) (Yoshida y col., 1993),  $\beta$ -carbolinas (Matsubara y col., 1998), ácido 7-(2-aminoetil-3,4-dihidro-5-hidroxy-2H-1,4-benzotiazina-3-croxílico (Li y col., 1997), compuestos que tienen una estructura química muy parecida al MPTP/ MPP<sup>+</sup> y que también son inhibidores del complejo I.

Una disminución importante de la producción de melatonina se produce con la edad (Reiter y col., 1992). Una de las consecuencias fisiológicas de esta disminución sería, por tanto, una pérdida de la protección de la cadena respiratoria ejercida por la hormona y una mayor propensión a sufrir los efectos de neurotoxinas endógenas y exógenas. Esto apunta, también a que la administración exógena de melatonina podría tener un efecto beneficioso evitando o retrasando el inicio y el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas durante el envejecimiento, efecto que puede estar relacionado con su acción antioxidante y protectora de la función mitocondrial.

**5.2.- Efecto protector de 1-MeTIQ frente a la acción tóxica de MPP<sup>+</sup>: Medida de la preservación de la integridad celular y mitocondrial y de la actividad 1-MeTIQsa.**



Otro de los compuestos protectores usado en este estudio es el 1-MeTIQ, isoquinolina endógena que protege frente a la Enfermedad de Parkinson, cuyos niveles disminuyen con la edad en áreas cerebrales más implicadas en la etiología de esta enfermedad. Para elucidar el mecanismo por el que este compuesto ejerce su función, se estudió en primer lugar el efecto "in vivo" protector de 1-MeTIQ en estriado de rata inyectado directamente con  $MPP^+$  y, en segundo lugar, se determinó su efecto "in vitro" sobre la disfunción mitocondrial producida por el neurotóxico  $MPP^+$ .

En lo que se refiere al primer punto, los resultados de la inmunocitoquímica obtenidos indican que el 1-MeTIQ previene la degeneración progresiva de las neuronas terminales dopaminérgicas producida por la inyección de  $MPP^+$  en el estriado. Estos resultados podrían estar relacionados con el hecho de que el 1-MeTIQ proporcione una protección contra la aparición de las alteraciones en el comportamiento característico de la EP inducida por MPTP, TIQ y 1-benzyl-TIQ (Tasaki y col., 1991; Kotake y col., 1995).

En cuanto al segundo punto, aunque la causa de la EP es desconocida, se ha sugerido que la alteración de la respiración mitocondrial fruto de una deficiencia de la actividad del complejo I puede ser responsable de la degeneración de la sustancia negra (Shapira y col., 1990 a,b). Esta afirmación se ha basado en el hecho de que el  $MPP^+$  ejerce su acción tóxica al actuar sobre el complejo I de la cadena respiratoria.

En las mitocondrias hepáticas, una concentración de  $5\mu M$  de 1-MeTIQ evitó totalmente la inhibición de la respiración mitocondrial producida por el  $MPP^+$  ( $20\mu M$ ) (Figura 7). El mismo efecto se observó en los sinaptosomas del estriado (Figura 8), donde el papel protector es menos efectivo que en las mitocondrias hepáticas. Además, en los dos casos los resultados de estudios polarográficos demuestran que en mitocondrias aisladas y en sinaptosomas estriatales, el 1-MeTIQ interacciona con el complejo I (Tabla 1). Este resultado demuestra que el

1-MeTIQ a altas concentraciones actúa como un inhibidor débil de la cadena respiratoria.

Los resultados de interacción de 1-MeTIQ con el complejo I, sugieren que este compuesto tiene capacidad de proteger la actividad del complejo I impidiendo su interacción con  $MPP^+$ . Como se ha descrito en el caso de la melatonina, el efecto del 1-MeTIQ sobre la inhibición producida por el  $MPP^+$  puede ser debido a "un efecto de escudo" que impide la unión  $MPP^+$  con el complejo I, evitando la pérdida de energía.

Debido a que la inclusión de antioxidantes como el glutatión, ascorbato, o catalasa protegen la actividad de la NADPH-CoQ reductasa mitocondrial inhibida por el  $MPP^+$  (Sershen y col., 1985; Wagner y col., 1985; Cleeter y col., 1992) se ha estudiado si el efecto protector proporcionado por el 1-MeTIQ podría ser debido a su posible capacidad antioxidante. Sin embargo, los resultados obtenidos indican que el 1-MeTIQ no tiene capacidad antioxidante, pudiéndose concluir que un proceso secuestrador de radicales libres no está implicado en el efecto protector del 1-MeTIQ.

También hemos evaluado si el efecto del 1-MeTIQ podría ser debido a que interfiriese la entrada del  $MPP^+$ , es decir, si el 1-MeTIQ utiliza el transportador de la dopamina de los sinaptosomas estriatales. Los resultados muestran que 1-MeTIQ no utiliza el mismo sistema de transporte que el  $MPP^+$  o la dopamina para entrar dentro de las neuronas dopaminérgicas. Por lo tanto, 1-MeTIQ entra en la mitocondria probablemente debido a un transporte pasivo, debido a su gran liposolubilidad. Además, el 1-MeTIQ no afecta la recaptación de  $MPP^+$  por los sinaptosomas. Este resultado excluye la posibilidad de que el efecto protector de 1-MeTIQ fuese debido a la inhibición de la recaptación de  $MPP^+$  por los sinaptosomas estriatales. Este dato sostiene la idea de que la interacción entre los dos compuestos tiene lugar a nivel mitocondrial.

A diferencia de las neurotoxinas endógenas (TIQ y  $\beta$ -carbolinas) que se forman en cerebro a partir de aldehídos y aminas biogénicas mediante una ciclización espontánea Pictet-Spengler (Melchior y Collins, 1982), el 1-MeTIQ se forma enzimáticamente a partir de 2-feniletilamina y piruvato en el cerebro de rata (Yamakawa y Ohta, 1997). La enzima que cataliza esta reacción, se encuentra localizada en la fracción sinaptosomal de la mitocondria del cerebro de rata donde el efecto protector de 1-MeTIQ parece ser indispensable. En este estudio, hemos evaluado la localización de la actividad sintetizadora de 1-MeTIQ en diferentes áreas cerebrales de ratas jóvenes, constatándose que se encontraba en todos los centros evaluados. Resultados similares se han encontrado en cerebros de monos (Yamakawa, 1999), aunque existen diferencias cuantitativas entre ambas especies. Así, en ratas, los centros dopaminérgicos (estriado, *sustancia negra*) y corteza cerebral, contienen una mayor actividad. En cambio, en monos es el Tálamo el área con más actividad, aunque también los centros dopaminérgicos presentan una actividad elevada.

La valoración del cambio de la actividad 1-MeTIQasa durante el envejecimiento muestra una profunda disminución en áreas determinadas, principalmente en centros dopaminérgicos (estriado y *sustancia negra*) y corteza permaneciendo inalterada en el resto de los centros estudiados (Figura 14).

En conclusión un descubrimiento potencialmente importante es la disminución de la actividad sintetizadora de 1-MeTIQ con la edad en las áreas más afectadas por el envejecimiento y la enfermedad de Parkinson. La bajada en la actividad sintetizadora del 1-MeTIQ encontrada en las ratas viejas podría ser la responsable de la reducción en el contenido de esta amina endógena encontrada en ratas viejas (Ayala y col., 1993), en los cerebros tratados con MPTP (Tasaki y col., 1991) y en cerebros humanos de pacientes con EP idiopática (Ohta y col., 1987). Por otra parte, es importante destacar que la actividad sintetizadora de 1-MeTIQ resulta inhibida por toxinas productoras del Parkinson como MPP<sup>+</sup>,  $\beta$ -carbolinas, TIQ y 1-Benzil-TIQ. Nuestros resultados parecen indicar, por tanto, que la

reducción de la actividad sintetizadora 1-MeTIQ, en las áreas implicadas en la etiología de la EP podría ser una de las posibles causas de la mayor incidencia de esta enfermedad durante el envejecimiento

### **5.3.- Medida de 1-MeTIQ y algunos parámetros de estrés oxidativo en sueros de enfermos de Parkinson.**

Teniendo en cuenta que los niveles de 1-MeTIQ en centros dopaminérgicos disminuye en enfermos de Parkinson, sería de utilidad disponer de un método no invasivo de cuantificación de esta isoquinolina y estudiar el uso potencial de estas determinaciones con fines diagnósticos. Para ello, los niveles de 1-MeTIQ se determinaron en suero y el primer resultado fue constatar su presencia en suero humano. A continuación, se cuantificaron los niveles de 1-MeTIQ y TIQ, calculando la razón de ambos compuestos en suero controles y de parkinson. Los resultados encontrados demostraron una amplia dispersión individual sin presentar cambios significativos entre los controles y los parkinsonianos

Al mismo tiempo y puesto que muchos estudios sugieren que el estrés oxidativo juega un papel fundamental en la patogénesis de la EP, en nuestro estudio hemos medido en suero varios parámetros de estrés oxidativo (MDA y proteínas oxidadas) y la capacidad antioxidante del suero. En ambos grupos no hubo cambios significativos en los niveles séricos de las proteínas oxidadas específicas (Figura 15) y la capacidad antioxidante (Tabla 5) . Tan solo fue diferente el dato de MDA, con niveles más bajos en los pacientes controles. En este sentido hay que resaltar la poca concordancia existente entre los resultados de los diferentes estudios que intentan correlacionar el estrés oxidativo con la incidencia de la EP, ya que varios autores han encontrado una gran variabilidad de estrés oxidativo dentro de los enfermos de Parkinson (Gonzalez-Fraquela y col., 1998). Por tanto, un estudio mucho más extenso se requiere para establecer si los pacientes con Parkinson están sometido a un mayor estrés oxidativo.

#### **5.4.- Efecto protector de la melatonina sobre la síntesis de proteínas alterada por compuestos oxidantes y en el envejecimiento.**

La exposición de proteínas a los RL producen grandes modificaciones estructurales en dichas moléculas como son oxidaciones, agregaciones, cambios conformacionales, en la hidrofobicidad y procesos de fragmentación directa de la cadena polipeptídica. Estos procesos están relacionados con la aparición de enfermedades degenerativas y con el envejecimiento (Ames, y col. 1993, Berlett y Stadtman, 1997). Este tipo de alteraciones ha sido descritas en proteínas particulares tanto "in vivo" como "in vitro" (Parrado y col.,1999; Hunt y col. 1988).

En esta tesis se ha mostrado como el HC tiene la capacidad de inducir la fragmentación del FE-2 "in vitro". Esta fragmentación podría ser debida a un ataque químico directo por parte de los RL generados por el HC y/o enzimático.

En relación al ataque directo por parte de los RL, ha sido descrito que las ERO's tienen capacidad para romper el enlace peptídico provocando la fragmentación directa de la cadena polipeptídica, (Berlett y Stadtman, 1997; Garrison., 1987; Uchida y col., 1990; Shuessler y Shilling, 1984).

El ataque enzimático se basa en que la oxidación de proteínas supone una especie de "marcaje" para su degradación proteolítica, lo cual se ha puesto de manifiesto al observarse que las proteasas degradan las proteínas oxidadas con mayor rapidez que las no oxidadas y que el ataque de las proteasas es inducido por la presencia de las proteínas oxidadas y desnaturalizadas. (Rivett y col., 1985; Stadtman y col., 1992; Giulivi y Davies, 1994).

En el caso del FE-2 de los homogeneizados oxidados "in vitro" y considerando el alto estado de oxidación de las proteínas encontrados en los mismos, la pérdida de FE-2 parece ser debida a un procesos de fragmentación bien por acción de las proteasas bien por acción directa de las ERO's. El hecho de que los

inhibidores de las proteasas no evitasen el proceso de degradación de FE-2 nos hace pensar en un fenómeno de fragmentación directa por parte de los compuestos oxidantes.

Es de destacar que no todos los agentes oxidantes producen la pérdida de la molécula de FE-2. Tan solo el HC, un agente lipoperoxidante, fue capaz de provocar esta pérdida (Figura 16). Por el contrario, los otros compuestos generadores de RL usados (AAPH y  $H_2O_2$ ) inducen la oxidación de proteínas pero son incapaces de fragmentar al FE-2 (Figura 17,18). Estos resultados demuestran que la fragmentación del FE-2 depende del tipo de agente oxidante usado y de la reactividad de la proteína para con el compuesto oxidante. Un comportamiento similar ha sido encontrado para apolipoproteína B-100 de plasma humano tratado con peróxido de hidrógeno y AAPH, proteína que sufre una fragmentación extensiva mientras la albumina y transferrina no sufren ningún cambio (Hashimoto et al., 2000). Por otra parte, cuando BSA, catalasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y glutathion reductasa son expuestas a oxidación directa con Fe-nitriloacetato/ $H_2O_2$  todas las proteínas son fragmentadas excepto catalasa (Ogino and Okada, 1995). También ha sido descrito que el AAPH promueve la modificación oxidativo y la fragmentación de la glutamina sintetasa (Yan-Shan y col., 1999) y el  $H_2O_2$  induce la fragmentación de la ceruloplasmina humana (Choi y col., 2000), fibronectina (Vartio y col., 1989), la bomba del retículo sarcoplasmica  $Ca^{2+}$  (Castilho y col., 1996) y la Cu,Zn-superoxido dismutasa (Choi y col, 1999).

Un resultado que hay que destacar y que pone de manifiesto la implicación de los RL en el proceso de fragmentación es que la inclusión de melatonina, un agente secuestrador de RL, previene la fragmentación del FE-2 tanto "in vitro" como "in vivo". El efecto de esta hormona, que posee una reconocida capacidad protectora del DNA y las membranas celulares en estados de estrés oxidativo. (Tan et al., 1993b; Melchiorri y col., 1995), puede ser una consecuencia de su capacidad para secuestrar los radicales hidroxilo (Tan y col., 1993b) y peroxilo (Pieri y col., 1994). Fenómenos similares de prevención de la fragmentación de proteínas

1994). Fenómenos similares de prevención de la fragmentación de proteínas producidos por secuestradores de RL se ha descrito para lisozima, cuya fragmentación por parte de radical hidroxilo se evita por la incorporación de la metilxantina y el ácido urico, pero no con la timina (Franzini y col., 1993). También, la fragmentación de la superóxido dismutasa (Cu,Zn) por reacciones peroxidativas fue evitada por la adición de iones azida, manitol, fórmico, carnosina, homocarnosina y anserina debido a su fácil acceso para interceptar a los radicales hidroxilos (Kang y Kim; 1997; Choi y col., 1999).

Estos resultados también parecen indicar que la fragmentación directa del FE-2 bajo condiciones de estrés oxidativo (peroxidación lipídica) producida por el HC, puede representar un mecanismo celular de la regulación de la síntesis de proteínas a nivel del ciclo de elongación. Un mecanismo de fragmentación similar del FE-2 ha sido encontrado en hepatocitos, placenta y en células de levadura (Giovane y col, 1987). Los resultados en levaduras respaldan esta consideración ya que el patrón de la fragmentación depende de la fase de crecimiento. En la fase exponencial, el FE-2 nativo supone el 95% de los fragmentos y va desapareciendo y fragmentándose en la fase exponencial media, llegando a ser inapreciable en la fase final.

Por otra parte, hay que resaltar que estos fenómenos de fragmentación provocados por agentes oxidantes "in vitro" podrían tener también relevancia fisiológica "in vivo" y podría ser que la inhibición de la síntesis de proteínas que se observa en el envejecimiento fuese debida a que proteínas importantes de este proceso como el FE-2 resultan oxidadas y fragmentadas como consecuencias de procesos de peroxidación lipídica (Esterbauer y col., 1985; Poot y col., 1988; Ayala y col., 1996).

**CONCLUSIONES**



## 6.- CONCLUSIONES.

1.- "in vitro", el MPP+ inhibe el complejo I de la cadena respiratoria de mitocondrias hepáticas y sinaptosomales de centros dopaminérgicos. Su efecto específico sobre estos sinaptosomas es debido a que el MPP+ utiliza el transportador de la dopamina para entrar en el interior celular.

2.- La melatonina y el 1-MeTIQ a bajas dosis evitan la inhibición del complejo I ejercida por el MPP+ en mitocondrias hepáticas y sinaptosomales. Sin embargo, a altas dosis estos compuestos se comportan como inhibidores débiles de la cadena respiratoria.

3.- El efecto tóxico del MPP+ no parece estar mediado por un aumento del estrés oxidativo, ya que ningunos de los parámetros usados para medir el daño por oxidación en lípidos y proteínas aumentaron significativamente con el tratamiento de MPP+.

4.- Los niveles de 1-MeTIQ, y por tanto su capacidad de protección frente a las neurotoxinas endógenas y exógenas, disminuyen con el envejecimiento en aquellas áreas de cerebro más implicadas en la etiología de la Enfermedad de Parkinson. Esta disminución parece ser debida a una disminución de la actividad de la enzima responsable de su síntesis, la 1-MeTIQ sintetasa.

5.- "in vitro", los niveles de FE-2, proteína que interviene en la fase de elongación del proceso de traducción, disminuyen tras el tratamiento con hidróperóxido de cumeno, un agente oxidante que produce la peroxidación lipídica.

6.- Esta disminución en los niveles de FE-2 no se observa tras el tratamiento con AAPH o agua oxigenada.

7.- "in vivo" se observa que el FE-2 se encuentra fragmentado, probablemente debido a la acción directa de los radicales libres.

8.- La melatonina evitó la disminución del FE-2 tanto "in vivo" como "in vitro", probablemente debido a su acción antioxidante.

## **BIBLIOGRAFÍA**

**Ayala, A., Parrado, J., Bougria M., and Machado, A.** Effect of oxidative stress, produced by cumene hydroperoxide, on the various steps of protein synthesis. Modifications of elongation factor-2. *J Biol Chem.* **271(38)**: 23105-23110, 1996.

**Azelis AE, McMullen KM, Webster GC.** Progressive reduction in protein synthesis during involution and aging of the mouse thymus. *Mech Ageing Dev.* **20(4)**: 361-368, 1982.

**Bany-Mohammed, F.M., Slivka S., Hallman M.** Recombinant human erythropoietin: possible role as an antioxidant in premature rabbits. *Pediatr Res* **40**:381-387, 1996.

**Berlet Barbara. S and Stadtman Earl. R.** Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J. of Biological Chemistry.* **272**: 20313-20316, 1997.

**Barrowcliffe T.W., Gray E., Kerry P.J. and Gutteridge J.M.** Triglyceride-rich lipoproteins are responsible for thrombin generation induced by lipid peroxides. *Thromb. Haemost.* **52(1)**: 7-10, 1984.

**Bates, T.E, S.J.R. Heales, S.E.C. Davies, P. Boakye, Clark, J.B.** Effects of 1-Methyl-4-phenylpyridinium on isolated rat brain mitochondria: Evidence for a primary involvement of energy depletion. *J. Neurochem.* **63**: 640-648, 1994.

**Beck K.D., J. Valverde, T. Alexi, K. Poulsen, B. Moffat, R.A. Vandlen, A. Rosenthal, F. Hefti.** Mesencephalic dopaminergic neurons protected by GDNF from axotomy-induced degeneration in the adult brain. *Nature.* **373**:339-334,1995.

**Beck K.D., Irwin I., Valverde J., Brennan T.J., Langston J.W., Hefti F.** GDNF induces a dystonia-like state in neonatal rats and stimulates dopamine and serotonin synthesis. *Neuron.* **16**: 665-373, 1996.

**Benedetti A, Ferretti G., Curatola G., Jezequel AM., Orlandi F.** Age and sex related changes of plasma membrane fluidity in isolated rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* **156(2)**: 840-845, 1988.

**Berdanier CD, Everts HB.** Mitochondrial DNA in aging and degenerative disease. *Mutat Res.* **475(1-2)**: 169-183, 2001.

**Berlett, B.S. and Stadtman, E. R.** Protein oxidation in aging disease, and oxidative stress. *J. Biol.Chem.* **272(33)**: 20313-20316, 1997.

**Berliner JA, Heinecke JW.** The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radic Biol Med.* **20(5)**: 707-727, 1996.

**Bernstein C, Bernstein H.** Oxidative DNA damage as a potential major cause of

aging. *Aging, Sex and DNA Repair* (Academic Press, Inc. San Diego, California. 91-107, 1991.

**Blazejowski CA, Webster GC.** Decreased rates of protein synthesis by cell-free preparations from different organs of aging mice. *Mech Ageing Dev.* **21(3-4)**: 345-56, 1983.

**Blazejowski CA, Webster GC.** Effect of age on peptide chain initiation and elongation in preparations from brain, liver, kidney and skeletal muscle of the C57B1/6J mouse. *Mech Ageing Dev.* **25(3)**: 323-333, 1984.

**Bloodsworth A, O'Donnell VB, Freeman BA.** Nitric oxide regulation of free radical- and enzyme-mediated lipid and lipoprotein oxidation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **20(7)**: 1707-15, 2000.

**Boatright, J.H., N.M. Rubim, P.M. Iuvone.** Regulation of endogenous dopamine release in amphibian retina by melatonin: the role of GABA. *Vis. Neurosci.* **11**: 1013-1018, 1994.

**Bougria, M., J. Vitorica, J. Cano, A. Machado** Implication of dopamine transporter system on 1-methyl-4-phenylpyridinium and rotenone effect in striatal synaptosomes. *Eur. J. Pharmacol.* **291**:407-415, 1995.

**Boveris A, Chance B.**The mitochondrial generation of hydrogen peroxide.General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J.* **134(3)**: 707-716, 1973.

**Bowling, A. C., M.F. Beal.** Bioenergetic and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Life Sci.* **56**: 1151-1171, 1995.

**Britton GW, Sherman FG.**Altered regulation of protein synthesis during aging as determined by in vitro ribosomal assays. *Exp Gerontol.* **10(1)**: 67-77, 1975.

**Brown GK, Squier MV.** Neuropathology and pathogenesis of mitochondrial diseases. *J Inherit Metab Dis.* **19(4)**: 553-572, 1996.

**Burns, R.S., Chiueh C.C., Markey S.P., Ebert M.H., Jacobowitz D.M., Kopin I.J.** A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **80**: 4546-4550, 1983.

**Cabrera-Valdivia F., Jimenez- Jimenez FJ., Molina JA., Fernandez-Calle P., Vazquez A., Cañizares-Liebana F., et al.** Peripheral iron metabolism in patients with Parkinson's disease. *J NeurolSci.* **125**: 82-86, 1994.

**Cahill, G.M., J.C. Besharse.** Resetting the circadian clock in cultured *Xenopus* eyecups: regulation of retinal melatonin rhythms by light and D2 dopamine receptors. *J Neurosci.* **11**: 2959-2971, 1991.

**Calés C., Fando J.L., Azura C. and Salinas M.** Developmental studies of the first step of the initiation of brain protein synthesis, role of initiation factor 2. *Mech. Ageing Dev.* **33**: 147-156, 1986.

**Cardinali, D.P., C.A. Nagle, F. Freire, J.M. Rosner.** Effects of melatonin on neurotransmitter uptake and release by synaptosome-rich homogenates of the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology.* **18**: 72-85, 1975.

**Castillo-Romero, J.L., Acuna-Castroviejo D., Escamaes G., Vives F.** Age-related changes of neuronal responsiveness to melatonin in the striatum of sham-operated and pinealectomized rats. *J. Pineal Res.* **19**: 79-86, 1995.

**Cavallius J., Rattan S.I.S. and Clark B.F.C.** Changes in activity and amounts of active elongation factor-1a in aging and immortal human fibroblast cultures. *Exp. Gerontol.* **21**: 149-157, 1986.

**Cervera J. and Levine R.L.** Modification of the hydrophobicity of glutamine synthetase by mixed-function oxidation. *FASEB J.* **2**: 2591-2595, 1988.

**Chace KV, Carubelli R, Nordquist RE.** The role of nonenzymatic glycosylation, transition metals, and free radicals in the formation of collagen aggregates. *Arch Biochem Biophys.* **288(2)**: 473-480, 1991.

**Chance B. Sites H. Boveris A.** Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* **59**: 527-605, 1979.

**Chang TC., Chou WY., Chang GG.** Protein oxidation and turnover. *J Biomed Sci.* **7(5)**: 357-63, 2000.

**Chen Q. and Ames B.N.** Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. *Proc. Natl. Sci. USA.* **91(10)**: 4130-4134, 1994.

**Choi, S.Y., Kwon, H.Y., Kwon, O.B. and Kang, J.H.** Hydrogen peroxide-mediated Cu,Zn-superoxide dismutase fragmentation protection by carnosine, homocarnosine and anserine. *Biochim Biophys Acta.* **1472(3)**: 651-657, 1999.

**Choi, SY., Kwon, H.Y., Kwon, O.W., Eum, W.S. and Kang, J.H.** Fragmentation of human ceruloplasmin induced by hydrogen peroxide. *Biochimie.* **82 (2)**: 175-180, 2000.

**Cho, S, Neff N.H., Hadjiconstantinou M.** Regulation of tyrosine hydroxylase and aromatic L-amino acid decarboxylase by dopaminergic drugs. *Eur. J. Pharmacol.* **323**: 149-157, 1997.

**Cho, S., A.M. Duchemin, N.H. Neff, M. Hadjiconstantinou.** Tyrosine hydroxylase, aromatic L-amino acid decarboxylase and dopamine metabolism after chronic treatment with dopaminergic drugs. *Brain Res.* **830**: 237-245, 1999.

**Christen S, Peterhans E, Stocker R.** Antioxidant activities of sometryptophan metabolites: possible implication for inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **87(7)**: 2506-2510, 1990.

**Claustrat, B., J. Brun, P. Garrey, B. Roussel, G. Sassolas.** A once-repeated study of nocturnal plasma melatonin patterns and sleep recordings in six normal young men. *J. Pineal Res.* **3**: 301-310, 1986.

**Cleeter, M.W.J., Cooper J.M., A.H.V. Shapira** Irreversible inhibition of mitochondrial Complex I by 1-Methyl-4-Phenylpyridinium: Evidence for free radical involvement. *J. Neurochem.* **58**: 786-789, 1992.

**Climent I. and Levine R.L.** Oxidation of the active site of glutamine synthetase: conversion of the arginine-344 to  $\gamma$ -glutamyl semialdehyde. *Arch. Biochem. Biophys.* **289**: 371-375, 1991.

**Clopton D.A. and Saltman P.** Low-level oxidative stress causes cell-cycle specific arrest in cultured cells. *Biochem. Biophys. Res. commun.* **210(1)**: 189-196, 1995.

**Cohen G.** Oxy-radical toxicity in catecholamine neurons. *Neurotoxicology* Spring. **5(1)**: 77-82, 1984.

**Collins, M.A., Neafsey E.J.** Beta-carboline analogues of N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): endogenous factors underlying idiopathic parkinsonism. *Neurosci. Lett.* **55**: 179-184, 1985.

**Colton, C.A., Pagan F., Snell J., Colton J.S., Cummins A., Gilbert D.L..** Protection from oxidation enhances the survival of cultured mesencephalic neurons. *Exp. Neurol.* **132**: 54-61, 1995.

**Cortopassi G.A. and Arnheim N.** Detection of a specific mitochondrial DNA deletion in tissues of older humans. *Nucleic. Acids. Res.* **18(23)**: 6927-6933, 1990.

**Cortopassi G. and Wang E.** Modelling the effects of age-related mtDNA mutation accumulation: complex I deficiency, superoxide and cell death. *Biochim. Biophys. Acta.* **1271(1)**: 171-176, 1995.

**Cotzias, G.C., L.C. Tang, S.T. Miller, J.Z. Ginos JZ.** Melatonin and abnormal movements induced by L-dopa in mice. *Science.* **173**: 450-452, 1971.

**Cutler R.G.** The dysdifferentiation hypothesis of mammalian aging and longevity, En: The aging brain: Cellular and molecular mechanisms of aging in the system. Eds: Giacobini E. & al. Raven Press. New York, pp: 1-26, 1982.

**Cutler R.G.** Urate and ascorbat: their possible roles as antioxidantes in determinig longevity of mamalian species. *Arch. Gerontol. Geriatr.* **3(4)**: 321-348, 1984.

**Coyle, J.T., Puttfarcken P.** Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science.* **262**: 689-694, 1993.

**Crawford RM., Leiby DA., Green SJ., Nacy CA., Fortier AH., Meltzer MS.** Macrophage activation: a riddle of immunological resistance. *Immunol Ser.* **60**: 29-46, 1994.

**Czyzyk-Krzeska, M.F., Furnari B.A., Lawson E.E., Millhorn D.E.** Hypoxia increases rate of transcription and stability of tyrosine hydroxylase mRNA in pheochromocytoma (PC12) cells. *J. Biol. Chem.* **269**: 760-764, 1994.

**Davey, G.P., K.F. Tipton, M.P. Murphy.** Uptake and accumulation of 1-methyl-4-phenylpyridinium by rat liver mitochondria measured using an ion -selective electrode. *Biochem. J.* **288**: 439-433, 1992.

**Davies K.J.A.** Protein damage and degradation by oxygen radicals.I. General aspects. *J. Biol. Chem.* **262**: 9895-901, 1987.

**Davies K.J.A. and Delsignore M.E.** protein damage and degradation by oxygen radicals. III. Modification of secondary and tertiary structure. *J. Biol. Chem.* **262**: 9902-9907, 1987.

**Davies K.J.A., Delsignore M.E and Lin S.W.** Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of aminoacids. *J. Biol. Chem.* **262**: 8220-6, 1987a.

**Davies K.J.A., Lin S.W. and Pacifici R.E.** Protein damage and degradation by oxygen radicals. IV. Degradation of denatured protein. *J. Biol. Chem.* **262**: 9914,1987b.

**Davis, G.C., Williams, A.C., Markey, S.P., Ebert, M.H., Caine, E.D., Reichert, C.M., and Kopin, I.J.** Chronic parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry Res.* **1**: 249-254, 1979.

**Dean, R.T. and Cheeseman K.H.** Vitamin E protects proteins against free radical damage in lipid environments. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **148(3)**: 1277-1282.

**Dean, R.T., Thomas, S.M., Vince, G. and Wolff S.P.** Oxidation induced proteolysis and its possible restriction by some secondary protein modifications. *Biomed Biochem Acta.* **45 (11-12)** 1563-1573, 1986.



**Delange R.J. and Glazer A.N.**, *Anal. Biochem.* 177, 300, 1989.

**Dever TE, Costello CE, Owens CL, Rosenberry TL, Merrick WC.** Location of seven post-translational modifications in rabbit elongation factor 1 alpha including dimethyllysine, trimethyllysine, and glycerylphosphorylethanolamine. *J Biol Chem.* **264(34)**: 20518-20525, 1989.

**Dexter DT., Wells FR., Agid Y., Lees AJ., et al.** Increased nigral iron content in postmortem parkinsonian brain. *Lancet.* ii: 1219-1220, 1987.

**Diaz, J., D. Levesque, Lammers, C.H., N. Griffon, M.P.Martres, J.C. Schwartz, P. Sokoloff.** Phenotypical characterization of neurons expressing the dopamine D3 receptor in the rat brain. *Neuroscience.* **65**:731-745, 1995.

**Di Monte D, Jewell SA, Ekstrom G, Sandy MS, Smith MT.** 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP+) cause rapid ATP depletion in isolated hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* **137(1)**: 310-315, 1986.

**Dori, D., Casale G., Solerte S.B., Fioravanti M., Migliorati G., Cuzzoni G., Ferrari E.** Chrono-neuroendocrinological aspects of physiological aging and senile dementia. *Chronobiologia.* **21**: 121-126, 1994.

**Draper H.H and Hadley M.** A review of recent studies on the metabolism of exogenous and endogenous malondialdehyde. *Xenobiotica.* **20(9)**: 901-907, 1990.

**Dubocovich, M.L.** Melatonin is a potent modulator of dopamine release in the retina. *Nature.* **306**:782-784, 1983.

**Dubocovich, M.L..** Pharmacology and function of melatonin receptors. *FASEB J.* **2**: 2765-73, 1988.

**Dunn J.A, McChance D.R., Thropew S.R., Lyons T.J and Baynes J.W.** Age dependent accumulation of Ne-(carboxymethyl) lysine and Ne-(carboxymethyl)hydroxy-lysine in skin collagen. *Biochemistry.* **30**: 1205-1210, 1991.

**Escames G., Guerrero JM., Reiter RJ., Garcia JJ., Munoz-Hoyos A., Ortiz GG., Oh CS.**Melatonin and vitamin E limit nitric oxide-induced lipid peroxidation in rat brain homogenates. *Neurosci Lett.* **230(3)**: 147-150, 1997.

**El-Deiry W.S., Harper J.W., O'Connor P.M., Velcules V.E., Canman C.E., Jakman J., Pietenpol J.A., Burrell M., Hill D.E., Wang Y., et al.** WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res.* **1,54(5)**: 1169-1174, 1994.

**Esterbauer H. and Cheeseman K.H.** Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol.* **186**: 407-421,1990.

**Esterbauer, H., Cheeseman, KH., Dianzani, MU., Poli, G., Slater, TF.** Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by ADP-Fe<sup>2+</sup> in rat liver microsomes. *Biochem J.* **208(1)**: 129-140, 1982.

**Esterbauer H, Jurgens G, Quehenberger O.** Modification of human low density lipoprotein by lipid peroxidation. *Basic Life Sci.* **49**: 369-373,1988.

**Fahn, S., Cohen G.** The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it. *Ann. Neurol.* **32**: 804-812, 1992.

**Farber J. M. and Levine R.L.** Sequences of a peptide susceptible to mixed-function oxidation: probable cation binding site in glutamine synthetase. *J.Biol. Chem.* **261**: 4574-4578, 1986.

**Ferrari R.** The role of mitochondria in ischemic heart disease. *Cardiovasc Pharmacol.* 28 Suppl 1:S1-10, 1996.

**Feuers RJ.** The effects of dietary restriction on mitochondrial dysfunction in aging. *Ann N Y Acad Sci.* **854**: 192-201, 1998.

**Forman H.J. and Azzi A.** On the virtual existence of superoxide anions in mitochondria: thoughts regarding its role in pathophysiology. *FASEB J.* **11(5)**: 374-375, 1997.

**Franzini, E., Sellak, H., Hakim, J. and Pasquier C.** Oxidative damage to lysozyme by the hydroxyl radical: comparative effects of scavengers. *Biochim. Biophys Acta.* **1203 (1)**: 11-17, 1993.

**Frati E, Khatib AM, Front P, Panasyuk A, Aprile F, Mitrovic DR.** Degradation of hyaluronic acid by photosensitized riboflavin in vitro. Modulation of the effect by transition metals, radical quenchers, and metal chelators. *Free Radic Biol.* **22(7)**: 1139-1144.

**Fujita T, Fujimoto Y.** Formation and removal of active oxygen species and lipid peroxides in biological systems. *Nippon Yakurigaku Zasshi.* **99(6)**: 381-389, 1992.

**Funabiki R., Takeshita K., Miura Y., Shibasato M., Nagasawa T.** Dietary supplement of G-rutin reduces oxidative damage in the rodent model. *J Agric Food Chem.* **47(3)**: 1078-1082, 1999.

**Gabius H.J., Engelhardt R., Deerberg F. and Cramer F.** Age-related changes in different steps of protein synthesis of liver and kidney of rats. *FEBS Lett.* 160: 115-118, 1983.

**Gabbita SP., Subramaniam R., Allouch F., Carney JM., Butterfield DA.** Effects of mitochondrial respiratory stimulation on membrane lipids and proteins: an electron paramagnetic resonance investigation. *Biochim Biophys Acta.* 1372(2): 163-173, 1998.

**Garcia JJ, Reiter RJ., Guerrero JM., Escames G., Yu BP., Oh CS., Munoz-Hoyos A.** Melatonin prevents changes in microsomal membrane fluidity during induced lipid peroxidation. *FEBS Lett.* 408(3): 297-300, 1997.

**Garland D., Russel P. and Zigler JS.** En oxygen radicals in biology and medicine. Eds: Smic M.G., Taylor KS., Ward JF. and von Sontag C. Plenum, new York. pp: 347-353, 1988.

**Garrison, W.M.** *Chem. Rev.* 87: 381-398, 1987.

**Giulivi, C., and Davies, K.J.A.** Dityrosine: a marker for oxidatively modified proteins and selective proteolysis. *Methods Enzymol.* 233: 363-371, 1994.

**Giusti P, Gusella M, Lipartiti M, Milani D, Zhu W, Vicini S, Manev H.** Melatonin protects primary cultures of cerebellar granule neurons from kainate but not from N-methyl-D-aspartate excitotoxicity. *Exp Neurol.* 131(1): 39-46, 1995.

**Glazer A.N.** *FASEB J.* 2, 2487, 1988.

**Godson C, Reppert SM.** The Mel1a melatonin receptor is coupled to parallel signal transduction pathways. *Endocrinology.* 138(1): 397-404, 1997.

**Goldstein IM, Kaplan HB, Edelson HS, Weissmann G.** Ceruloplasmin: an acute phase reactant that scavenges oxygen-derived free radicals. *Ann N Y Acad Sci.* 389: 368-379, 1982.

**Gonzalez-Fraguela ME, Cespedes EM, Arencibia R, Broche F, Gomez AA, Castellano O, Garcia JC.** Indicators of oxidative stress and the effect of antioxidant treatment in patients with primary Parkinson disease. *Rev Neurol.* 26(149): 28-33, 1998.

**Gordillo E., Ayala A., Bautista J. and Machado A.** Implication of lysine residues in the loss of activity in rat liver 6-phosphogluconate dehydrogenase found in aging. *J. Biol. Chem.* 264(29): 17024-17028, 1989.

**Gordillo E., Ayala A., Bautista J. and Machado A.** Possible involvement of histidine residues in the loss of activity in rat liver malic enzyme during aging. *J. Biol. Chem.* **263**: 8053-8057, 1988.

**Götz ME, Knig G, Riedere P, Youdim MBH.** Oxidative stress: free radical production in neural degeneration. *Pharmac Ther.* **63**: 37-122, 1994.

**Graham, D.G.** On the origin and significance of neuromelanin. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **103**: 359-362, 1979.

**Greenamyre JT., MacKenzie G., Peng TL., Stephans SE.** Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Biochem Soc Symp.* **66**: 85-97, 1999.

**Greenwald RA, Moy WW.** Effect of oxygen-derived free radicals on hyaluronic acid. *Arthritis Rheum.* **23(4)**: 455-463, 1980.

**Grootveld M, Henderson EB, Farrell A, Blake DR, Parkes HG, Haycock P.** Oxidative damage to hyaluronate and glucose in synovial fluid during exercise of the inflamed rheumatoid joint. Detection of abnormal low-molecular-mass metabolites by proton-n.m.r. spectroscopy. *Biochem J.* **273(2)**: 459-466, 1991.

**Gross J, Ungethum U., Andreeva N., Heldt J., Gao J., Marschhausen G., Altmann T., Muller I., Husemann B., Andersson K.** Hypoxia during early developmental period induces long-term changes in the dopamine content and release in a mesencephalic cell culture. *Neuroscience.* **92**: 699-704, 1999.

**Gschwendt M., Kittstein W. and Marks F.** Sequence similarity between cyclophilin and elongation factor 2. *Biochem. J.* **256(3)**: 1061, 1988.

**Gutteridge JM, Halliwell B.** Iron toxicity and oxygen radicals. *Baillieres Clin Haematol.* **2(2)**: 195-256, 1989.

**Gutteridge JM and Halliwell B.** The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem.* **15(4)**: 129-135, 1990b.

**Halliwell B.** Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB.J.* **1**: 358-363, 1987.

**Halliwell B and Gutteridge JM.** Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* **186**: 1-85, 1990a.

**Halliwell B. and Gutteridge J.M.C.** Oxygen toxicity, oxygen radicals transition metals and disease. *Biochem. J.* **219**: 1-14, 1984.

**Hansford RG., Hogue BA., Mildaziene V.** Dependence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age. *J Bioenerg Biomembr.* **29(1)**: 89-95, 1997.

**Hardeland R., Balzer I., Poeggeler B., Fuhrberg B., Uria H., Behrmann G., Wolf R., Meyer TJ., Reiter RJ.** On the primary functions of melatonin in evolution: mediation of photoperiodic signals in a unicell, photooxidation, and scavenging of free radicals. *J Pineal Res.* **18(2)**: 104-111, 1995.

**Hardeland R, Reiter RJ, Poeggeler B, Tan DX.** The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: antioxidative protection and formation of bioactive substances. *Neurosci Biobehav Rev.* **17(3)**: 347-357, 1993.

**Harman D.** Aging a theory of aging: effect of free radical radiation chemistry. *J. Gerontol.* **11**: 298-300, 1956.

**Harman D.** Free radicals theory of aging: effect of free radical reaction inhibitors on the mortality rate of male LAF mice. *J. Gerontol.* **23(4)**: 476-482, 1968.

**Hasegawa, E., K. Takeshige, T. Oishi, Y. Murai, S. Minikami.** 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>) induces NADH-dependent superoxide formation and enhances NADH-dependent lipid peroxidation in bovine heart submitochondrial particles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **170**: 1049-1055, 1990.

**Hasegawa J, Noguchi N, Sawaguchi M, Doi T, Hisatome I, Kotake H, Machiba H.** Bunazosin induces use-dependent slowing of conduction in guinea-pig ventricular myocardium. *Eur. J. Pharmacol.* **191(3)**: 369-373, 1990.

**Hashimoto, R., Narita, S., Yamada, Y., Tnaka, K. and Kojo, S.** Unusually high reactivity of apolipoprotein B-100 among proteins to radical reactions induced in human plasma. *Biochim Biophys Acta*, 1483, 236-240, 2000.

**Hawkins, C.L. and Davies, M.J.** Hypochlorite-induced damage to proteins: formation of nitrogen-centred radicals from lysine residues and their role in protein fragmentation. *Biochem. J.* **332**: 617-625, 1998.

**Hazlewood C, Davies MJ.** Benzoyl peroxide-induced damage to DNA and its components: direct evidence for the generation of base adducts, sugar radicals, and strand breaks. *Arch Biochem Biophys.* **332(1)**: 79-91, 1996.

**Heikkila RE, Nicklas WJ, Vyas I, Duvoisin RC.** Dopaminergic toxicity of rotenone and the 1-methyl-4-phenylpyridinium ion after their stereotaxic administration to rats: implication for the mechanism of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity. *Neurosci Lett.* **62(3)**: 389-394, 1985.

**Hill H.A.O.** Oxygen, oxidases, and the essential trace metals. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci.* **249**: 119-128, 1981.

**Hirsch, E.C.** Why are nigral catecholaminergic neurons more vulnerable than other cells in Parkinson's disease? *Ann Neurol.* **32**: 88-93, 1992.

**Hirsch, E.C.** Does oxidative stress participate in nerve cell death in Parkinson's disease?. *Eur. Neurol.* **33 Suppl 1**: 52-59, 1993.

**Huerto-Delgadillo L, Anton-Tay F, Benitez-King G.** Effects of melatonin on microtubule assembly depend on hormone concentration: role of melatonin as a calmodulin antagonist. *J Pineal Res.* **17(2)**: 55-62, 1994.

**Hunt, J.V., Simpson, J.A, and Dean R.T.** Hydroperoxide-mediated fragmentation of proteins. *Biochem. J.* **250(1)**: 87-93, 1988.

**Iacovitti, L., N.D. Stull, K. Johnston.** Melatonin rescues dopamine neurons from cell death in tissue culture models of oxidative stress. *Brain Res.* **768**: 317-326, 1997.

**Imlay JA, Chin SM, Linn S.** Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. *Science.* **240(4852)**: 640-642, 1988.

**Iuvone, P.M., J. Gan.** Functional interaction of melatonin receptors and D1 dopamine receptors in cultured chick retinal neurons. *J. Neurosci.* **15**: 2179-2185, 1995.

**Javitch, J.A., R.J. D'Amato, S.M. Strittmatter, S.H. Snyder.** Parkinsonism inducing neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: uptake of the metabolite 1-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**: 2173-2177, 1985.

**Jenner P.** Oxidative stress as a cause of Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand Suppl.* **136**: 6-15, 1991.

**Jin, B.K., Shin D.Y., Jeong M.R., Gwag M.R., Baik H.W., Yoon K.S., Cho Y.H., Joo W.S., Kim Y.S., Baik H.H.** Melatonin protects nigral dopaminergic neurons from 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>) neurotoxicity in rats. *Neurosci. Lett.* **245**: 61-64, 1998.

**Joo, W.S., B.K. Jin, C.W. Park, S.H. Maeng, Y.S. Kim.** Melatonin increases striatal dopaminergic function in 6-OHDA-lesioned rats. *Neuroreport.* **9**:4123-4126, 1998.

**Kang, J.H., and Kim S.M.** Fragmentation of human Cu,Zn-superoxide dismutase by peroxidative reaction. *Mol. Cells.* **7(4)**: 553-558, 1997.

**Karbownik M, Reiter RJ, Qi W, Garcia JJ, Tan DX, Manchester LC, Vijayalaxmi.** Protective effects of melatonin against oxidation of guanine bases in

DNA and decreased microsomal membrane fluidity in rat liver induced by whole body ionizing radiation. *Mol Cell Biochem.* **211(1-2)**: 137-144, 2000.

**Kass GE, Wright JM, Nicotera P, Orrenius S.** The mechanism of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity: role of intracellular calcium. *Arch Biochem Biophys.* **260(2)**: 789-797, 1988.

**Kawai, H., Y. Makino, M. Hirobe, S Ohta.** Novel endogenous 1,2,3,4,-Tetrahydroisoquinoline derivates: Uptake by Dopamine transporter and activity to induce Parkinsonism. *J. Neurochem.* **70**: 745-751, 1998.

**Keherer J.** Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Critical Rev. Toxico.* **23**: 21-48, 1993.

**Kim, Y.S., W.S. Joo, B.K. Jin, Y.H. Cho, H.H. Baik, C.W. Park.** Melatonin protects 6-OHDA-induced neuronal death of nigrostriatal dopaminergic system. *NeuroReport.* **13**: 2387-2390, 1998.

**Klivenyi P, Vecsei L.** Neurodegeneration: aging and dementia. Etiopathogenic role of electron transport disorders. Therapeutic possibilities. *Orv Hetil.* **138(6)**: 331-335, 1997.

**Kohno, M., Ohta, S., and Hirobe, M.** Tetrahydroisoquinoline and 1-Methyl-tetrahydroisoquinoline as novel endogenous amines in rat brain. *Biochem Biophys.. Res. Commun.* **140**: 448-454, 1986.

**Kotake, Y., Tasaki, Y., Makino, Y., Ohta, S. and Hirobe, M.** 1-Benzyl-tetrahydroisoquinoline as a Parkinsonism inducing agent: A novel endogenous amine in mouse and parkinsonian CSF. *J. Neurochem.* **65**: 2633-2638, 1995.

**Kowalds A., Kirkwood T.B.** Towards a network theory of ageing: a model combining the free radicals theory and the protein error theory. *J. Theor. Biol.* **135**: 27-23, 1994.

**Krause KH.** Professional phagocytes: predators and prey of microorganisms. *Schweiz Med Wochenschr.* **130(4)**: 97-100, 2000.

**Kumer, S.C., Vrana, K.E.** Intricate regulation of tyrosine hydroxylase activity and gene expression. *J Neurochem.* **67**: 443-462, 1996.

**Kuwabara M, Zhi-Yi Z, Yoshii G.** E.S.R. of spin-trapped radicals in aqueous solutions of pyrimidine nucleosides and nucleotides. Reactions of the hydroxyl radical. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.* **41(3)**: 241-259, 1982.

**Langston, J.W., I. Irwin, E.B. Langston, L.S. Forno.** Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine analog synthesis. *Science.* **219**: 979-980, 1983.

**Langston JW, Irwin I, Langston EB, Forno LS.** Pargyline prevents MPTP-induced parkinsonism in primates. *Science*. **225(4669)**: 1480-1482, 1984

**Lapchack, P.A., F. Hefti.** (BDNF and NGF in lesioned rats: effects on cholinergic function and weight gain. *NeuroReport*. **3**: 405-408, 1992.

**Lass A., Agarwal S. and Sohal R.S.** Mitochondrial ubiquinone homologues, superoxide radical generation, and longevity in different mammalian species. *J. Biol. Chem.* **272(31)**: 19199-19204, 1997.

**Leach CM, Thorburn GD.** A comparison of the inhibitory effects of melatonin and indomethacin on platelet aggregation and thromboxane release. *Prostaglandins* **20(1)**: 51-6, 1980.

**Lenz A.G., Costable U., Shaltiel S. and Levine R.L.** Determination of carbonyl groups in oxidatively modified proteins by reduction with tritiated sodium borohydride. *Anal.Biochem.* **177**: 419-425, 1989.

**Levine R.L.** Ischemia: from acidosis to oxidation. *FASEB J.* **7(13)**: 1242-1246, 1993.

**Levine R.L.** Oxidative modification of glutamine synthetase. I. Inactivation is due to loss of one histidine residue. *J. Biol.Chem.* **258**: 11823-11827, 1983.

**Levine, R.L., D. Garland, C.N. Oliver, A. Amici, I. Climent, A. Lenz, B. Ahn, S. Dhaltiel, E.R. Stadtman.** Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* **186**: 464-478, 1990.

**Lin A.M, L. Ho.** Melatonin suppresses iron-induced neurodegeneration in rat brain. *Free Radic. Biol. Med.* **28**: 904-911, 2000.

**Li, H., Dryhurst G.** Irreversible inhibition of mitochondrial Complex I by 7-(2-aminoethyl)-3,4-Dihydro-5-Hydroxy-2H-1,4-benzothiazine-3-croxylic acid DHBT-1): A putative nigral endotoxin of relevance to parkinson's disease. *J. Neurochem.* **69**: 1530-1541, 1997.

**Lin, L.F., D.H. Doherty, J.D. Lile, S. Bektesh, F. Collins.** GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science*. **260**: 1130-1132, 1993.

**Linnane AW, Marzuki S, Ozawa T, Tanaka M.** Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases. *Lancet*. **1(8639)**: 642-645, 1989.



**Lissi E.A., Salim-Hanna M., Faure M. and Videla L.A.** 2,2'- AZO-bis-amidinopropane as a radical source for lipid peroxidation and enzy inactivation studies. *Xenobiotica*. **21**: 995-1001, 1991.

**Liu Z. and Perlin A.S.** Evidence of a selective free radical degradation of heparin, mediated by cupric ion. *Carbohydr. Res.* **255**: 183-191, 1994.

**Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 65-275, 1951.

**Mainwaring WI.** The effect of age on protein synthesis in mouse liver. *Biochem J.* **113(5)**: 869-878, 1969.

**Macleod, R.M., J.E. Lehmeyer.** Studies on the mechanism of the dopamine-mediated inhibition of prolactin secretion. *Endocrinology.* **94**: 1077-1085, 1974.

**Makrides S.C.** Protein synthesis and degradation during aging and senescence. *Biol. Rev.* **58**: 343-422, 1983.

**Matsubara, K., Gonda, T., Sawada, H., Uezono, T., Kobayashi, S., Kawamura, T., Ohtaki, K., Kimura, K., Akaide, A.** Endogenously occurring beta-carboline induces parkinsonism in nonprimate animal: a possible causative protoxin in idiopathic Parkinson's disease. *J. Neurochem.* **70**: 727-735, 1998.

**Markesbery WR, Carney JM.** Oxidative alterations in Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* **9(1)**: 133-146, 1999.

**Matuszak Z., Reszka K., Chignell CF.** Reaction of melatonin and related indoles with hydroxyl radicals: EPR and spin trapping investigations. *Free Radic Biol Med.* **23(3)**: 367-372, 1997.

**Mayo, J.C., Sainz RM., Uria H., Antolin I., Esteban M.M., Rodriguez C.** Melatonin prevents apoptosis induced by 6-hydroxydopamine in neuronal cells: implications for Parkinson's disease. *J. Pineal Res.* **24**: 179-192, 1998.

**Meister, B., R. Elde.** Dopamine transporter mRNA neurons of the rat hypothalamus. *Mol. Neuroendocrinol.* **58**: 388-395, 1993.

**Melchior C. and Collins, M.A.** The route and significance of endogenous synthesis of alkaloids in animals. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* **9**: 313-356, 1982.

**Melchiorri D, Reiter RJ, Chen LD, Sewerynek E, Nistico G.** Melatonin affords protection against kainate-induced in vitro lipid peroxidation in brain. *Eur J Pharmacol.* **305(1-3)**: 239-242, 1996.

**Melchiorri, D., Reiter R.J., Sewerynek E., Chen L.D., Nistico G.** Melatonin reduces kainate-induced lipid peroxidation in homogenates of different brain regions. *FASEB J.* **9**: 1205-1210, 1995.

**Menendez-Pelaez, A., Reiter R.J.** Distribution of melatonin in mammalian tissues: the relative importance of nuclear versus cytosolic localization. *J. Pineal Res.* **15**: 59-69, 1993.

**Menendez-Pelaez, A., Poeggeler B., Reiter R.J., Barlow-Walden L.R., Pablos M.I., Tan D.X.** Nuclear localization of melatonin in different mammalian tissues: immunocytochemical and radioimmunoassay evidence. *J. Cell. Biochem.* **53**: 373-382, 1993.

**Merker K, Grune T .** Proteolysis of oxidised proteins and cellular senescence. *Exp Gerontol.* **35**: 779-786, 2000.

**Miguez, J.M., Martin F.J., Aldegunde M.** Effects of pinealectomy and melatonin treatments on serotonin uptake and release from synaptosomes of rat hypothalamic regions. *Neurochem. Res.* **20**: 1127-1132, 1995.

**Miquel J, Economos AC, Fleming J, Johnson JE Jr.** Mitochondrial role in cell aging. *Exp. Gerontol.* **15(6)**: 575-591, 1980.

**Moldave , K.** Eukaryotic protein synthesis. *Annu Rev Biochem.* **54**: 1109-1149, 1985.

**Molina JA., de Bustos F., Jimenez-Jimenez FJ., Benito-Leon., Orti-Pareja M., Gasalla T., et al.** Cerebrospinal fluid levels of alpha-tocoferol (vitamin E) in Parkinson's disease. *J Neural Transm.* **104**: 1287-1293, 1997.

**Molina JA, Jimenez-Jimenez FJ, Fernandez-Calle P, Lalinde L, Tenias JM, Pondal M, Vazquez A, Codoceo R.** lipid peroxides in patients with Parkinson's disease. *Neurosci Lett.* **136(2)**: 137-140, 1992.

**Moseley R, Waddington RJ, Embery G.** Degradation of glycosaminoglycans by reactive oxygen species derived from stimulated polymorphonuclear leukocytes. *Biochim Biophys Acta.* **1362(2-3)**: 221-231, 1997.

**Myatt L, Kossenjans W, Sahay R, Eis A, Brockman D.** Oxidative stress causes vascular dysfunction in the placenta. *J Matern Fetal Med.* **9(1)**: 79-82, 2000.

**Mylonas E, kouretas D.** Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo.* **13(3)**: 295-309, 1999.

**Nagatsu, T. and Yoshida, M.** An endogenous substance of the brain, tetrahydroisoquinoline, produces parkinsonism in primates with decreased

dopamine, tyrosine hydroxylase and bipterin in the nigrostriatal regions. *Neurosci. Lett.* **87**, 178-182, 1988.

**Naoi M, Maruyama W.** Type B monoamine oxidase and neurotoxins. *Eur Neurol* 33 Suppl 1: 31-37, 1993.

**Nicholls, D.G.** Bioenergetics. An Introduction to the Chemiosmotic Theory. *New York Academic Press; London.* 1982.

**Nicklas, W.J., I. Vyas, R.E. Heikkila.** Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Life Sci.* **36**: 2503-2508, 1985.

**Nicklas, W.J., S.K. Youngster, M.V. Kindt, R.E. Heikkila.** MPTP, MPP<sup>+</sup> and mitochondrial function. *Life Sci.* **40**: 721-729, 1987.

**Niwa, T., Takeda, N., Kaneda, N., Hashizume, Y., and Nagatsu, T.** Presence of tetrahydroisoquinoline and 2-methyl-tetrahydroisoquinoline in parkinsonian and normal human brains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **144**: 1084-1089, 1987.

**Nohl H, Gille L, Schonheit K, Liu Y.** Conditions allowing redox-cycling ubisemiquinone in mitochondria to establish a direct redox couple with molecular oxygen. *Free Radic Biol Med.* **20(2)**: 207-2131, 1996.

**Nohl H, Hegner D.** Do mitochondria produce oxygen radicals in vivo? *Eur J Biochem.* **82(2)**: 563-567, 1978.

**Nygard O, Nilsson L.** Reduced ribosomal binding of eukaryotic elongation factor 2 following ADP-ribosylation. Difference in binding selectivity between polyribosomes and reconstituted monoribosomes. *Biochim Biophys Acta.* **824(2)**: 152-162, 1985.

**Obeso J.A., M.C. Rodríguez-Oroz, M. Rodríguez, J.L. Lanciego, J. Artieda, N. Gonzalo, W. Olanow.** *Trends. Neurosci.* **23(10)**: 8-19, 2000.

**Octave J.N., Schneider Y.J., trouet A. and Crichton R.R.** Iron puptaake and utilization by mammalian cells. 1: Celular uptake of transferrin and iron. *Trends Biochem. Sci.* **8**: 217-220, 1983.

**Olanow CW.** Oxidation reactions in Parkinson's disease. *Neurology* Oct;40(10 Suppl 3):suppl 32-7; discussion 37-39, 1990.

**Ollinger K, Brunk UT.** Cellular injury induced by oxidative stress is mediated through lysosomal damage. *Free Radic Biol Med.* **19(5)**: 565-574, 1995.

**Ogino, T. and Okada, S.** Oxidative damage of bovine serum albumin and other enzyme proteins by iron-chelate complexes. *Biochim Biophys Acta.* **1245(3)**, 359-365, 1995.

**Ohta, S., Kohno, M., Makino, Y., Tachikawa, O., and Hirobe, M.** Tetrahydroisoquinoline and 1-Methyl-tetrahydroisoquinoline are present in the human brain: relation to parkinson's disease. *Biomed. Res.* **8**: 453-456, 1987.

**Olanow, C.W.** A radical hypothesis for neurodegeneration. *Trends Neurosci.* **16**: 439-444, 1993.

**Olanow, C.W., W.G. Tatton.** Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Annu. Rev. Neurosci.* **22**: 123-144, 1999.

**Olivier C.N ., Levine R.L. and Stadtman E.R.** A role of mixed function oxidation reactions in the accumulation of altered enzyme forms during aging. *J. Am. Geriatr. Sci.* **35**: 947-956, 1987.

**Osiewacz HD, Borghouts C.** Mitochondrial oxidative stress and aging in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Ann. Acad Sci.* **908**: 31-9, 2000.

**Pacifici R.E., Salo D.C. and Davies K.J.A. (M.O.P):** a 670 Kda proteinase complex that degrades oxidatively denatured proteins in red blood cells. *Free Rad. Biol. Med.* **7**: 521,1989.

**Paulding, W.R., M.F. Czyzyk-Krzeska.** Regulation of tyrosine hydroxylase mRNA stability by protein-binding, pyrimidine-rich sequence in the 3'-untranslated region. *J. Biol. Chem.* **274**: 2532-2538, 1992.

**Paxinos, G. and Watson, C.** The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Academic Press, London. 1986.

**Pieri, C., M. Marra, F. Moroni, R. Rechioni, F. Marcheselli.** Melatonin: a peroxy radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sci.* **5**: 271-276, 1994.

**Pierpaoli, W., C. Yi.** The involvement of pineal gland and melatonin in immunity and aging. I. Thymus-mediated, immunoreconstituting and antiviral activity of thyrotropin-releasing hormone. *J. Neuroimmunol.* **27**: 99-109, 1990.

**Pierpaoli, W., W. Regelson.** Pineal control of aging: Effect of melatonin and pineal grafting on aging mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 787-791, 1994.

**Pierrefiche G, Topall G, Courboin G, Henriet I, Laborit H.** Antioxidant activity of melatonin in mice. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* **80(2)**: 211-223, 1993.

**Piette J.** Biological consequences associated with DNA oxidation mediated by singlet oxygen. *J Photochem Photobiol B.* **11(3-4)**: 241-260, 1991.

**Poeggeler, B S., Saarela S., Reiter R.J., Tan D.X., Chen L.D., Manchester L.C., Barlow-Walden L. R.** Melatonin a highly potent endogenous radical scavenger and electron donor: new aspects of the oxidation chemistry of this indole accessed in vitro. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **738**: 419-420, 1994.

**Poot M, Verkerk A, Koster JF, Esterbauer H, Jongkind JF.** Reversible inhibition of DNA and protein synthesis by cumene hydroperoxide and 4-hydroxy-nonenal. *Mech Ageing Dev.* **43(1)**: 1-9, 1988.

**Pozo D., Reiter RJ., Calvo JR., Guerrero JM.** Physiological concentrations of melatonin inhibit nitric oxide synthase in rat cerebellum. *Life Sci.* **55(24)**: 455-460. 1994.

**Pozo D., Reiter RJ., Calvo JR., Guerrero JM.** Inhibition of cerebellar nitric oxide synthase and cyclic GMP production by melatonin via complex formation with calmodulin. *J Cell Biochem.* **65(3)**: 430-442, 1997.

**Pryor W.** Biological effects of CS, wood smoke and the smoke from plastics: the use of electron spin resonance. *Free Radic Biol Med.* **13**: 659-676, 1992.

**Ramsay, R.R., Krueger M.J., Youngster S.K., Gluck M.R., Casida J.E., Singer T.P.** Interaction of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP<sup>+</sup>) and its analogs with the rotenone/piericidin binding site of NADH dehydrogenase. *J. Neurochem.* **56**: 1184-1190, 1991.

**Ramsay, R.R., J.I. Salach, J. Dadgar, T.P. Singer.** Inhibition of mitochondrial NADH dehydrogenase by pyridine derivatives and its possible relation to experimental and idiopathic parkinsonism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **135**: 269-275, 1986.

**Ramsey J, Harper M. E and Weindruch.R.** Restriction of energy intake, energy expenditure, and aging. *Free Radical Biology and Medicine.* **29**: 946-968, 2000.

**Rapp G, Klaudiny J, Hagendorff G, Luck MR, Scheit KH.** Complete sequence of the coding region of human elongation factor 2 (FE-2) by enzymatic amplification of cDNA from human ovarian granulosa cells. *Biol Chem Hoppe Seyler.* **370(10)**: 1071-1075, 1989.

**Rattan, S.I.S.** Synthesis, modifications and turnover of proteins during aging. *Exp. Gerontol.* **31(1-2)**: 33-37; 1996.

- Rattan S.I.S., Cavallius j., Bhatia P., and Clark B.F.C.** Protein elongation factor-1a in ageing rodent brain. En: *Aging: A Multifactorial Discussion*. Eds: Subba-Rao K. and Prabhakar V. Association of Gerontology (India). pp: 125-130, 1987.
- Rattan S.I.S., Ward W.F., Glenting M., Svendsen L., Riis B., and Clark B.F.C.** Dietary calorie restriction dose not effect the levels of protein elongation factors in rat livers during ageing. *Mech. Ageing Dev.* **58**: 85-91,1991.
- Reiter, R.J.** Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Prog. Neurobiol.* **56**: 359-384, 1998a.
- Reiter, R.J.** Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocrine Res.* **12**: 151-180, 1991.
- Reiter RJ.** The ageing pineal gland and its physiological consequences. *Bioessays.* **14**: 169-175, 1992.
- Reiter RJ, Carneiro RC, Oh CS.** Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. *Horm Metab Res.* **29(8)**: 363-372, 1997a.
- Reiter RJ, Guerrero JM, Garcia JJ, Acuna-Castroviejo D.** Reactive oxygen intermediates, molecular damage, and aging. Relation to melatonin. *Ann N Y Acad Sci.* **854**: 410-424, 1998b.
- Reiter, R.J., Melchiorri D., Sewerynek E., Poeggeler B., Barlow-Walden L., Chuang J., Ortiz G.G., Acuna-Castroviejo D.** A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J. Pineal Res.* **18**: 1-11, 1995.
- Reiter R.J., Richardson B.A., Johnson L.Y., Ferguson B.N., Dinh D.T.** Pineal melatonin rhythm: reduction in aging Syrian hamsters. *Science.* **210**: 1372-1373, 1980.
- Reiter RJ., Tan D.X., Poeggeler B., Chen L.D., Menedez-Pelaez A.** Melatonin free radicals and cancer initiation. In: *Advances in Pineal Research Vol 7*. Maestroni GJM., Conti A., Reiter RJ. Eds. John Libbey. London pp 211-228,1994b.
- Reiter, R.J., Tan D.X., Poeggeler B., Menendez-Pelaez A., Chen L.D., Saarela S.** Melatonin as a free radical scavenger: implications for aging and age-related diseases. *Ann. NY Acad. Sci.* **719**: 1-12, 1994a.
- Reiter., RJ., Guerrero J.M., Escames G., Pappolla M.A., Acuna-Castroviejo D.** Prophylactic actions of melatonin in oxidative neurotoxicity. *Ann. NY Acad. Sci.* **825**: 70-78, 1997b.

**Reiter, R.J., Tan D.X., Kim S.J., Qi W.** Melatonin as a pharmacological agent against oxidative damage to lipids and DNA. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* **41**: 229-236, 1998c.

**Reszka KJ, Bilski P, Chignell CF, Dillon J.** Free radical reactions photosensitized by the human lens component, kynurenine: an EPR and spin trapping investigation. *Free Radic Biol Med.* **20(1)**: 23-34, 1996.

**Richardson A.** The relationship between aging and protein synthesis, En: Handbook of Biochemistry of aging. Ed: Florini J.R. CRC Press Boca Raton, Florida. pp: 79-101, 1981.

**Richardson, A.; Birchenall-Sparks, M.C.** Age-related changes in protein synthesis. In: *Review of Biological researching in aging*. Vol 1. Alan R. Liss, Inc., New York. pp 255-273, 1983.

**Richardson A and Semsei Y.** Effect of aging on translation and transcription. *Rev. Biol. Res. Aging.* **3**: 467-483, 1987.

**Richter C, Park JW, Ames BN.** Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* **85**: 6465-6467, 1988.

**Richter C.** Do mitochondrial DNA fragments promote cancer and aging? *FEBS Lett.* **241**: 1-15, 1988.

**Richter C. Gogvadze V. Laffranchi R. Schlapbach R. Schnizer M. Suter M. Walter P. Yaffee M.** Oxidants in mitochondria: From physiology to disease. *Biochem Biophys Acta.* **127**: 67-74; 1995.

**Richter C., Park .W. and Ames B.N.** Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc. Acad. Sci. USA.* **85(17)**: 6465-6467, 1988.

**Riis B., Rattan S.I.S. Cavallius J. and Clark B.F.C.** ADP-ribosylable content of elongation factor-2 changes during cell cycle of normal and cancerous human cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **159**: 141-1146, 1989a.

**Riis B., Rattan S.I.S. Clark B.F.C and Merrick W.C.** Eucariotic elongation factors. *Trends Biochem. Sci.* **15**: 420-424, 1990.

**Rivett, A.J.** Preferential degradation of the oxidatively modified form of glutamine synthetase by intracellular mammalian proteases. *J. Biol. Chem.* **260(1)**: 300-305, 1985.

**Rodriguez-Gomez J.A., M. Romero-Ramos, M.L.Vizuete, J.L. Venero, J. Cano, A. Machado.** Increased activity and expression of tyrosine hydroxylase in the rat

substantia nigra after chronic treatment with nomifensine. *Mol. Pharmacol.* **52**: 641-647, 1997.

**Roseman J.E., and Levine R.L.** Purification of a protease from *Escherichia coli* with specificity for oxidized glutamine synthetase. *J. Biol. Chem.* **363**: 3203, 1987.

**Russo T., Zambrano N., Esposito F., Ammendola R., Cimino F., Fiscella M., Jakman J., O'Connor P.M., Anderson C.W. and Appella E.** A p53-independent pathway for activation of WAF1/CIP1 expression following oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **270**: 29386-29391, 1995.

**Salari H, Braquet P, Borgeat P.** Comparative effects of indomethacin, acetylenic acids, 15-HETE, nordihydroguaiaretic acid and BW755C on the metabolism of arachidonic acid in human leukocytes and platelets. *Prostaglandins Leukot Med.* **13(1)**: 53-60, 1984.

**Sanchez-Ramos, J., F. Hefti, D. Holliden, T. Jasik, M. Rosenthal.** Mechanisms of neurotoxicity oxygen radicals and mitochondrial inhibition hypothesis. In: Progress in Parkinson Research. Hefti, F., ed. *New York. Plenum Press*, pp 145-152, 1988.

**Sakac V, Sakac M.** Free oxygen radicals and kidney diseases--part I. *Med Pregl.* **53(9-10)**: 463-474, 2000.

**Sastre J and Pallardo FV.** Mitochondrial oxidative stress plays a key role in aging and apoptosis. *IUBMB Life.* **49(5)**: 427-435, 2000.

**Sayre K.M.** Biochemical mechanism of action of the dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Toxicol. Lett.* **48**: 121-149, 1989.

**Sayre, LM., Wang, F., Arora, P.K., Riachi, N.J., Harik, S.I. and Hoppel, C.L.** Dopaminergic neurotoxicity in vivo and inhibition of mitochondrial respiration in vitro by possible endogenous pyridinium-like substances. *J. Neurochem.* **57**: 2106-2115, 1991.

**Sauer H, Rosenblad C, Bjorklund A.** Glial cell line-derived neurotrophic factor but not transforming growth factor beta 3 prevents delayed degeneration of nigral dopaminergic neurons following striatal 6-hydroxydopamine lesion. *Proc Natl Acad Sci USA.* **92**: 8935-8939, 1995.

**Schacter. E., Williams J.A., Lim M., Levine R.L.** Differential susceptibility of plasma proteins to oxidative modification: examination by Western blot immunoassay. *Free Rad. Biol. Med.* **17**: 429-437, 1994.

**Shershen, H., Reith M.E.A., Hashim A., Lajtha A.** Protection against 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>) toxicity by the antioxidant ascorbic acid. *Neuropharmacol.* **24**: 1257-1259, 1985.



**Shida, C.S., Castrucci A.M.L., Lamy-Freund M.T.** High melatonin solubility in aqueous medium. *J. Pineal Res.* **16**: 198-201, 1994.

**Shigenaga M.K., Hagen T.M. and Ames B.N.** Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* **91(23)**: 10771-10778, 1994.

**Shigenaga MK., Park JW., Cundy KC., Gimeno CJ., Ames BN.** In vivo Oxidative DNA Damage: Measurement of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA and Urine by High-Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection. *Methods in Enzymology.* **186**: 521-530, 1990.

**Schoenberg MH, Beger HG.** Oxygen radicals and postischemic organ damage: pathophysiology, clinical relevance and therapy. *Zentralbl Chir.* **120(3)**: 174-185, 1995.

**Schoffner JM, Wallace DC.** *Adv Hum Genet.* **19**: 267-330, 1990.

**Shuessler, H., and Shilling, K.** *Int. J. Radiat. Biol.* **45**: 267-281, 1984.

**Sewerynek E, Melchiorri D, Reiter RJ, Ortiz GG, Lewinski A.** Lipopolysaccharide-induced hepatotoxicity is inhibited by the antioxidant melatonin. *Eur J Pharmacol.* **293(4)**: 327-334, 1995

**Singer, T.P., A.J. Trevor, N.Jr. Castagnoli.** Biochemistry of the neurotoxic action of MPTP: or how a faulty batch of designer drug led to Parkinsonism in drug abusers. *Trends Biochem. Sci.* **12**: 266-270, 1987.

**Siuciak, J.A., D.N. Krause, M.L. Dubocovich.** Quantitative pharmacological analysis of 2-125I-iodomelatonin binding sites in discrete areas of the chicken brain. *J. Neurosci.* **11**: 2855-2864, 1991.

**Sohal RS.** Mitochondria generate superoxide anion radicals and hydrogen peroxide. *FASEB J.* **11(14)**: 1269-1270, 1997.

**Sohal RS, Dubey A.** Mitochondrial oxidative damage, hydrogen peroxide release, and aging. *Free Radic Biol Med.* **16(5)**: 621-626, 1994.

**Sontag B, Reboud AM, Divita G, Di Pietro A, Guillot D, Reboud JP.** Intrinsic tryptophan fluorescence of rat liver elongation factor eFE-2 to monitor the interaction with guanylic and adenylic nucleotides and related conformational changes. *Biochemistry.* **32(8)**: 1976-1980, 1993.

**Soto-Otero R, Mendez-Alvarez E, Sanchez-Sellero I, Cruz-Landeira A, Lopez-Rivadulla Lamas M.** Reduction of rat brain levels of the endogenous dopaminergic

proneurotoxins 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline and 1,2,3,4-tetrahydro-beta-carboline by cigarette smoke. *Neurosci Lett.* **298(3)**: 187-190, 2001.

**Stadman E.R.** Oxidation of protein by mixed-function system: implication in protein turnover, aging and neutrophil function. *Trends Biochem. Sci.* **11**: 11-12, 1986.

**Stadman E.R.** Protein oxidation and aging. *Science.* **257**: 1220-1224, 1992.

**Stadman E.R.** Oxidation of free amino acid and amino acid residues in proteins by radiolysis and metal-catalyzed reactions. *Annu. Rev. Biochem.* **62**: 797-821, 1993.

**Stadman, E.R.** In *Free Radicals, Oxidative Stress, and Antioxidants: Pathological and Physiological Significance* (Özben, T., Ed.), Vol 296, NATO ASI Series, Series A: *Life Sciences*. Plenum, New York. pp 131-143, 1997.

**Stadtman ER, Levine RL.** Protein oxidation. *Ann N Y Acad Sci.* **899**: 191-208, 2000.

**Starke-Reed PE, Oliver CN.** Protein oxidation and proteolysis during aging and oxidative stress. *Arch Biochem Biophys.* **275(2)**: 559-567, 1989.

**Steinhilber D, Brungs M., Werz O., Wiesenberg I., Danielsson C., Kahlen JP., Nayeri S., Schrader M., Carlberg C.** The nuclear receptor for melatonin represses 5-lipoxygenase gene expression in human B lymphocytes. *J Biol Chem.* **270(13)**: 7037-7040, 1995.

**Studer L, Csete M., Lee S-H, Kabbani N., Walikonis J., Wold B and MaKay R.** (Enhanced proliferation, survival, and dopaminergic differentiation of CNS precursors in lowered oxygen. *J. Neurosci.* **20**: 7377-7383, 2000.

**Suzuki, K., Mizuno, Y., Yamauchi, Y., Nagatsu, T. and Mitsuo Y.** Selective inhibition of complex I by N-methylisoquinolinium ion and N-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline in isolated mitochondria prepared from mouse brain. *J Neurol Sci.* **109**: 219-223, 1992.

**Suzuki H., Suematsu M., Schmid-Schonbein GW.** Microvascular oxidative stress, immune reaction and apoptosis in hypertensives. *Clin Hemorheol Microcirc.* **21(3-4)**: 161-168, 1999.

**Tan, D.X., Chen L.D., Poeggeler B., Manchester L.C., Reiter R.J.** Melatonin: A potent endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr. J.* **1**: 57-60, 1993a.

**Tan, D.X., Poeggeler B., Reiter R.J., Chen L.D., Chen S., Manchester L.C., Barlow-Walden L.R.** The pineal hormone melatonin inhibits DNA-adducts formation by the chemical carcinogen safrole in vivo. *Cancer Lett.* **70**: 65-71, 1993b.

**Tang, Y.P., Ma Y.L., Chao C.C., Chen K.Y., Lee E.H.** Enhanced glial cell line-derived neurotrophic factor mRNA expression upon (-)-deprenyl and melatonin treatments. *J. Neurosci. Res.* **53**: 593-604, 1998.

**Takahashi R., Mori N. and Goto S.** Accumulation of heat-labile elongation factor 2 in the liver of mice and rats. *Exp. Gerontol.* **20**: 325-331, 1985b.

**Takehige K.** Superoxide formation and lipid peroxidation by the mitochondrial electron-transfer chain. *Rinsho Shinkeigaku.* **34(12)**: 1269-1271, 1994.

**Tasaki, Y., Makino, Y., Ohta, S. and Hirobe, M.** 1-methyl-1,2,3,4-Tetrahydroisoquinoline, decreasing in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mouse, prevents parkinsonism-like behaviour abnormalities. *J. Neurochem.* **57**: 1940-1943, 1991.

**Tessari P.** Changes in protein, carbohydrate, and fat metabolism with aging: possible role of insulin. *Nutr Rev.* **58(1)**: 11-9, 2000.

**Tipton, K. F., T.P. Singer.** Advances in our understanding of the mechanisms of the neurotoxicity of MPTP and related compounds. *J. Neurochem.* **61**: 1191-1206, 1993.

**Tomac A, E. Lindqvist, L.F. Lin, S.O. Ogren, D. Young, B.J. Hoffer, L. Olson.** Protection and repair of the nigrostriatal dopaminergic system by GDNF in vivo. *Nature.* **373**: 335-339, 1995.

**Tritschter H.J and Medori R.** Mitochondrial DNA alterations as a source of human disorders. *Neurology.* **43(3)**: 280-288, 1993.

**Turrens J.F and Boveris A.** Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem.J.* **191(2)**: 421-427, 1980.

**Uchida K.** Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. *Free Radic Biol Med.* **28(12)**: 1685-1696, 2000.

**Uchida, K., Kato, Y., and Kawakishi, S.** A novel mechanism for oxidative cleavage of prolyl peptides induced by the hydroxyl radical. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **169(1)**: 265-271, 1990.

**Vakkuri, O., J. Leppäluoto, O Vuolteenaho.** Development and validation of a melatonin radioimmunoassay using radioiodinated melatonin as a tracer. *Acta Endocrinol.* **106**: 132-157, 1984.

**Vargas R and Castañada M.** Age-dependent decrease in the activity of protein-synthesis initiation factors in rat brain. *Mech. Ageing. Dev.* **21**: 183-191, 1983.

**Venero, J.L., Revuelta, M., Cani, J., and Machado, A.** 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, 1997.

**Viguie, C., J. Thibault, J.C. Thiery, Y. Tillet, B. Malpoux.** Characterization of the short day-induced decrease in median eminence tyrosine hydroxylase activity in the ewe: temporal relationship to the changes in luteinizing hormone and prolactin secretion and short day-like effect of melatonin. *Endocrinology.* **138**: 499-506, 1997.

**Vijayalaxmi, Reiter RJ, Sewerynek E, Poeggeler B, Leal BZ, Meltz ML.** Marked reduction of radiation-induced micronuclei in human blood lymphocytes pretreated with melatonin. *Radiat Res.* **143(1)**: 102-106, 1995.

**Volpi N., Sandri I. and Venturelli T.** Activity of chondroitin ABC lyase and hyaluronidase on free-radical degraded chondroitin sulfate. *Carbohydr. Res.* **279**: 193-200, 1995.

**Vrana, SA.L., K.E. Vrana, T.R. Koves, J.E. Smith and S.I. Dworkin.** Chronic cocaine administration increases CNS tyrosine hydroxylase enzyme activity and mRNA levels and tryptophan hydroxylase enzyme activity levels. *J. Neurochem.* **61**: 2262-2268, 1993.

**Wallace DC.** A mitochondrial paradigm for degenerative disease and ageing. *Novartis Found Symp.* **235**: 247-63, 2001.

**Wallace DC.** Diseases of the mitochondrial DNA. *Annu Rev Biochem.* **61**: 1175-1212, 1992b.

**Wallace DC.** Mitochondrial genetics: A paradigm for aging and degenerative diseases? *Science* . **256**: 628-632, 1992a.

**Wallace DC.** Mitochondrial DNA mutations and bioenergetic defects in aging and degenerative diseases. En: Eds: Rosenberg R N, Prusiner S B, DiMauro S and Barchi R L.pp.237- 269 Boston Butterworth-Heinemann 1998.

**Waters R.** Radiation-induced apoptosis in a murine T-cell hybridoma. *Cancer Res* **52**: 883-890,1992.

**Wang E. and Cortopassi G.** Mice with duplications and deletions at the time locus have altered MnSOD activity. *Biol. Chem.* **269(36)**: 22463-22465, 1994.

**Webster G.C.** Effect of aging on the components of the protein synthesis system. En: Insect aging. Eds: Collatz K.G. and Sohal R.S. Springer, Berlin. pp: 207-216, 1986.

- Webster G.C.** Protein synthesis in aging organisms. En: *Molecular Biology of Aging*. Eds: Shoal R.S., Birnbaum L.S. and Culter R.G. Raven, New York. pp: 263-289, 1985.
- Weinbach, EC., J. Garbus.** Mechanism of action of reagents that uncouple oxidative phosphorylation. *Nature*. **15**: 1016-1018, 1969.
- Wegner, G.C., M.F. Jarvis, R.M. Carelli.** Ascorbic acid reduces dopamine depletion induced by MPTP. *Neuropharmacology*. **24**: 1261-1262, 1985.
- Weiss-Wunder, L.T., M.F. Chesselet.** Acute and repeated administration of fluphenazine-N-mustard alters levels of tyrosine hydroxylase mRNA in subsets of mesencephalic dopaminergic neurons. *Neuroscience*. **49**: 297-305, 1992.
- Wheeler, D.D., A.M. Edwards, J.G. Ondeo.** Dopamine uptake in five structures of the brain: comparison of rate, sodium dependence and sensitivity to cocaine. *Neuropharmacology*. **32**: 501-508, 1993.
- Wu, R.M., D.L. Murphy, C.C. Chiueh.** Neuronal protective and rescue effects of deprenyl against MPP<sup>+</sup> dopaminergic toxicity. *J. Neural Transm.* **100**: 53-61, 1995.
- Xu WX, Yu JR.** Protective effect of indomethacin on alloxan-induced diabetes in rat. *Sheng Li Xue Bao*. **44(2)**: 202-208, 1992.
- Yamakawa T., Ohta S.** Biosynthesis of a parkinsonism-preventing substance, 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, is inhibited by parkinsonism-inducing compounds in rat brain mitochondrial fraction. *Neurosci Lett*. **259(3)**: 157-60, 1999.
- Yamakawa, T., Ohta, S.** Isolation of 1-methyl-1,2,3,4,-tetrahydroisoquinoline-synthesizing enzyme from rat brain: A possible parkinson's disease-preventing enzyme. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **236**: 676-681, 1997.
- Yoshida, M., M. Ogawa, K. Suzuki, T. Nagatsu.** Parkinsonism produced by tetrahydroisoquinoline (TIQ) or the analogues. *Adv. Neurol.* **60**: 207-211, 1993.
- Yoshikawa T, Furukawa Y, Murakami M, Takemura S, Kondo M.** Effects of vitamin E on D-galactosamine-induced or carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *Digestion*. **25(4)**: 222-229, 1982.
- Yu B.P and Yang R.** Critical evaluation of the free radical theory of aging. A proposal for the oxidative stress hypothesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **15**: 786:1-11, 1996.
- Zawilska, J, P.M. Iuvone.** Catecholamine receptors regulating serotonin N-acetyltransferase activity and melatonin content of chicken retina and pineal gland:

D2-dopamine receptors in retina and alpha-2 adrenergic receptors in pineal gland. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **250**: 86-92, 1989.

**Zisapel, N., Y. Egozi, M. Laudon.** Inhibition of dopamine release by melatonin: regional distribution in the rat brain. *Brain Res.* **246**: 161-163, 1982.

