



5
24
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**CAMBIOS EN EL CONTENIDO DE MANGANESO Y
COBRE EN DIFERENTES REGIONES DEL CEREBRO
DE RATON EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE LA
ENFERMEDAD DE PARKINSON**

**TESIS DE LICENCIATURA
QUE PRESENTA:
MA. DEL ROCIO ALVAREZ VEGA
PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O**

DIRECTOR: M. EN C. CAMILO RIOS CASTAÑEDA

JEFE DEL DEPTO. DE NEUROQUIMICA

INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGIA Y NEUROCIURGIA

MEXICO, D. F.

1992

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN





UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

I. INTRODUCCION.....	6
II. ANTECEDENTES.....	8
II.1. Anatomia de los ganglios basales.....	8
II.2. Sintomatologia de la enfermedad de Parkinson idiopatica.....	10
A) Temblor	
B) Rigidez	
C) Bradicinesia	
D) Postura anormal	
E) Otros sintomas	
II.3. Modelos de la enfermedad de Parkinson.....	13
II.3.1. Modelos colinergicos.....	14
II.3.2. Lesión neuronal no selectiva.....	15
II.3.3. Métodos quimicos.....	16
A) Reserpina	
B) Neurolepticos	
C) 6-hidroxi dopamina	
D) 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP)	
II.3.4. Modelo de la edad.....	23
II.4. Cambios patológicos en organismos intoxicados con MPTP.....	25
II.4.1. Estudios histológicos.....	25
II.4.2. Estudios bioquimicos.....	27
II.5. Metabolismo de la MPTP.....	28

II.6. Mecanismos de toxicidad celular de la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP).....	31
II.6.1. Teoría 1. Inhibición de las enzimas mitocondriales por la acción del ión 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP+).....	31
II.6.2. Teoría 2. Toxicidad de la MPTP mediada por radicales libres.....	33
II.7. Elementos traza en el metabolismo cerebral.....	37
II.7.1. Manganeso.....	40
A) Distribución	
B) Funciones enzimáticas	
i) Superóxido dismutasa	
ii) Glutamina sintetasa	
iii) Piruvato carboxilasa y glucosil transferasa	
C) Toxicidad	
II.7.2. Cobre.....	45
A) Distribución	
B) Funciones enzimáticas	
i) Cuproenzimas	
ii) Citocromo c oxidasa	
iii) Superóxido dismutasa	
iv) Dopamina B monooxigenasa	
v) Albocupreínas	
vi) Cobre tioneína	
vii) Lisil oxidasa	
viii) Complejos de cobre	
C) Toxicidad	

II.8. Radicales libres.....	53
II.8.1. Reacciones de radicales libres.....	54
II.8.2. Fuentes de reacciones de radicales libres.....	55
II.8.3. Dano inducido por radicales libres.....	55
II.8.4. Fuentes de radicales libres <u>in vivo</u>	57
II.8.5. Radicales libres del oxigeno.....	57
A) Superoxido	
B) Peróxido de hidrógeno	
C) Radical hidroxilo	
II.8.6. Participación de los metales de transición en la peroxidación de lípidos.....	60
III. OBJETIVOS.....	62
IV. HIPOTESIS.....	63
V. MATERIAL Y METODOS.....	64
V.1. Material.....	64
V.1.1. Reactivos.....	64
V.1.2. Equipo e instrumentos.....	65
V.2. Metodología.....	67
V.2.1. Experimentos de Parkinson inducido con MPTP.....	67
V.2.2. Determinación de metales por espectrofotometria de absorción atómica con horno de grafito.....	68
V.2.3. Experimentos para la determinación de dopamina después de la administración de MPTP.....	71
V.2.4. Determinación de dopamina por cromatografía de líquidos de alta resolución con detección electroquímica.....	72

VI. RESULTADOS.....	74
VII. DISCUSION.....	83
VIII. CONCLUSIONES.....	87
IX. REFERENCIAS.....	89

I INTRODUCCION

La enfermedad de Parkinson se presenta en individuos de edad avanzada, siendo su mayor incidencia entre los 60 y 70 años. Sus manifestaciones típicas son el temblor, la rigidez muscular, la acinesia, falta de expresión facial, hipotonía, micrografía y pérdida de los reflejos posturales. Recientemente se descubrió que un compuesto relativamente simple, la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) causa un estado de parkinsonismo avanzado en el hombre (1). El parkinsonismo inducido por la MPTP es clínicamente indistinguible del de los pacientes con la enfermedad de Parkinson idiopática (1,2).

La MPTP al igual que en la enfermedad de Parkinson idiopática, produce destrucción selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la zona compacta de la sustantia nigra en el hombre (2,3) en primates no humanos (4,5,6) y en roedores (7).

La MPTP es una neurotoxina capaz de atravesar cualquier tipo de membrana, incluyendo la barrera hematoencefálica (8). Una vez dentro, se dirige hacia los astrocitos y a las neuronas serotoninérgicas en donde se biotransforma al metabolito tóxico el 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP+), por acción de la enzima monoamina oxidasa B (MAO-B), la cual está contenida dentro de las mitocondrias de aquellas células. Posteriormente el MPP+ sale de las células y entra en las neuronas dopaminérgicas a través del sitio de recaptura de la dopamina (9).

La toxicidad del MPP+ después de la administración de la MPTP, se ha atribuido a la producción de radicales libres, proceso en el cual están involucrados los elementos traza esenciales como el manganeso, el cobre, el fierro etc., formándose compuestos altamente tóxicos que atacan a las membranas celulares.

Los elementos traza esenciales son requeridos para el desarrollo y mantenimiento del sistema nervioso central, su distribución es muy variable. Los metales de transición han sido involucrados en las enfermedades extrapiramidales.

El manganeso (Mn) cuando se encuentra en exceso produce la sintomatología característica de la enfermedad de Parkinson (10), neurotoxicidad inducida por radicales libres (11). Por otra parte se ha propuesto que el cobre (Cu) como responsable de la enfermedad de Wilson, la cual se presenta cuando hay un exceso de Cu libre en el cerebro (12) y de la enfermedad de Menkes, debida a una disminución en los niveles de Cu en el sistema nervioso central (13).

Las similitudes encontradas entre las acciones de los elementos traza esenciales y la MPTP nos condujeron a la evaluación de alguna posible alteración en los niveles de Mn y Cu regionales en organismos intoxicados con MPTP.

II ANTECEDENTES.

II.1. Anatomía de los ganglios basales

Parte del control motor extrapiramidal de los mamíferos es realizado en gran proporción por los ganglios basales. Estas estructuras neurales del telencéfalo están constituidas por los siguientes núcleos (14): El núcleo caudado, núcleo lenticular (putamen y globus pallidus), el claustrum, el complejo amigdalino, el núcleo lentiforme (llamado también fundus striati), la substantia nigra y el núcleo subtalámico.

Con base en los síndromes clínicos motores, el término de ganglios basales a menudo se refiere en forma restringida a los elementos del cuerpo estriado: caudado, putamen y globus pallidus, debido a que son las estructuras involucradas en las enfermedades motoras del sistema extrapiramidal (15).

El cuerpo estriado puede ser claramente dividido en una zona de aferencias (el caudado y el putamen) y una zona de eferencias, el palido. Entre las aferencias más importantes del cuerpo estriado se encuentran las fibras dopaminérgicas provenientes de la substantia nigra que conectan al caudado (caudoputamen en los roedores) (Fig. I). Esta conexión se conoce como vía nigroestriatal y resulta importante en la patogénesis de la enfermedad de Parkinson. Entre las eferencias más importantes se encuentra la vía palidotálamica, que proyecta desde el segmento interno del globus pallidus hacia los núcleos ventrolateral y centro mediano del tálamo. Otra importante eferencia del cuerpo estriado es la vía estriatonigral gabaérgica.

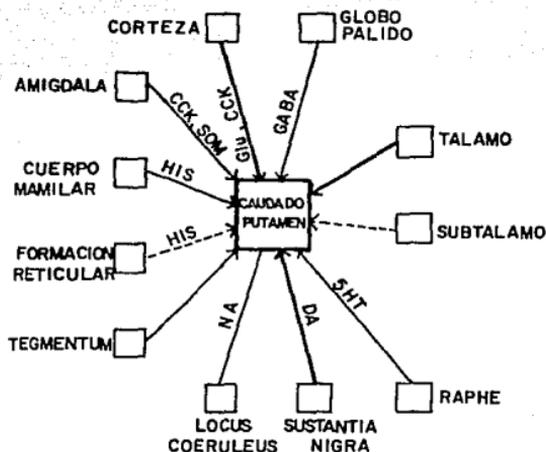


Figura. I. Aferencias del Caudado/Putamen La substancia nigra es otra estructura de importancia para la patogénesis de las enfermedades extrapiramidales y está constituida por dos zonas histológicamente diferentes: la pars compacta y la pars reticulata. Estudios de fluorescencia han demostrado que los cuerpos celulares de las neuronas dopaminérgicas de la vía nigroestriatal se localizan en la pars compacta.

La enfermedad de Parkinson cuyo modelo se estudio en este trabajo parece ser originada por la muerte neuronal selectiva de neuronas de la substantia nigra que se expresa como una disminucion de la cantidad de somas dopaminergicos de esta zona.

II. 2. Sintomatologia de la enfermedad de Parkinson Idiopatica

La enfermedad de Parkinson es un desorden neurodegenerativo, descrito por primera vez por James Parkinson en 1817 (16). Esta raramente se presenta en gente menor de 40 años de edad. La edad promedio a la cual se presenta es de 60 años.

La enfermedad de Parkinson se caracteriza principalmente por los siguientes signos y sintomas clinicos: temblor, rigidez, bradicinesia, marcha y postura anormal.

A) Temblor.

El temblor es usualmente el primer sintoma en aparecer. generalmente ocurre cuando el paciente está en reposo y desaparece durante el sueño o con un movimiento voluntario. El temblor como sintoma inicial se presenta en los pacientes con una frecuencia entre el 60% y 70%, y aproximadamente el 90% lo manifiesta en estadios más avanzados de la enfermedad. El temblor frecuentemente afecta los miembros superiores, y con menos frecuencia se ven involucrados los miembros inferiores, mandibula y lengua. Este sintoma como regla general es unilateral al comienzo de la enfermedad, pero con el paso del tiempo se torna bilateral. La mano afectada tipicamente asume una postura flexionada en la unión metacarpo-falanges con extensión de las uniones más distales.

B) Rigidez.

La rigidez puede ser apreciada cuando es examinada la persona pues es evidente su resistencia al movimiento.

La rigidez puede manifestarse en el paciente como dolor muscular, el cual ocurre frecuentemente en el cuello y la espalda, además de que puede ir acompañado por dolor de cabeza en la parte occipital.

C) Bradicinesia.

La bradicinesia es un síntoma que se caracteriza por la lentitud de los movimientos autónomos y dentro de ellos se incluye la disminución en el columpiar de los brazos al caminar; decrece la frecuencia de deglución, resultando una acumulación de saliva en la boca; disminuye la frecuencia de parpadeo y la expresión facial.

D) Postura anormal.

La postura del paciente con enfermedad de Parkinson involucra flexión de la cabeza, tronco y extremidades, adquiriendo de esta manera una postura encorvada hacia adelante; presentan una flexión tónica en las rodillas y en los brazos. La flexión del tronco es con frecuencia severa y el paciente generalmente se apoya en uno de los dos lados cuando se sienta.

La disminución de los reflejos posturales con frecuencia resulta en un pobre balance. Es común ver pacientes con múltiples contusiones, algunas severas y otros con fracturas.

La marcha por lo tanto también es anormal, los pacientes con frecuencia tienen incapacidad para levantar un pie del piso.

E) Otros síntomas.

Otros factores clínicos que ocurren con frecuencia variable son la micrografía, hipotonía y disartria. El volumen de la voz disminuye y en algunos casos sólo es un murmullo. La seborrea en el cuero cabelludo y en la frente se observan frecuentemente en estos pacientes. Menos comunes son la incontinencia urinaria e impotencia (17). Se han reportado con mayor prevalencia síntomas sensoriales como el entumecimiento, frialdad, ardor y dolor (17,18,19,20). Se ha observado también deficiencia olfatoria (21), así como diversas formas de distonias (22,23).

Aunque la enfermedad de Parkinson es un desorden neurodegenerativo progresivo, el pronóstico exacto es difícil de predecir. A este respecto, Schwab en 1960 presentó evidencias de pacientes con sintomatología progresiva lenta, casi imperceptible de un año al siguiente (24).

Existen otras formas etiológicamente diferentes de parkinsonismo, como el Parkinson senil, el Parkinson postencefalítico, el Parkinson post-traumático, el Parkinson sintomático y el Parkinson inducido por toxinas o drogas.

En el Parkinson senil se presentan algunas características semejantes a las de la enfermedad idiopática como el temblor, la rigidez y la presencia de cuerpos de Lewy. El Parkinson postencefalítico se caracteriza por una degeneración difusa

bilateral y gliosis de la substantia nigra y el locus coeruleus, debido a un posible agente viral. En el Parkinson post-traumático se observa atrofia cortical difusa y demencia pugilística, resultado de un impacto directo traumático.

El Parkinson sintomático se observa en una gran variedad de trastornos como los tumores en donde está involucrada directamente la substantia nigra, tales como los gliomas y linfomas en el tallo cerebral, o tumores sólidos causando daño a la substantia nigra y las proyecciones dopaminérgicas por compresión. El Parkinson inducido por sustancias tóxicas presenta características muy heterogéneas de acuerdo a la fuente de intoxicación, como pueden ser el monóxido de carbono, el disulfuro de carbono, el cloruro de manganeso, y los neurotóxicos.

II.3. Modelos de la enfermedad de Parkinson.

Se han desarrollado diversos modelos de la enfermedad de Parkinson, con la finalidad de reproducir la sintomatología que se presenta en el hombre.

La enfermedad de Parkinson es una de las pocas enfermedades neurológicas para la cual han sido desarrolladas una gran variedad de modelos animales. Esos modelos han sido y son de gran importancia para el conocimiento de la patofisiología de la enfermedad y para el desarrollo de nuevas drogas antiparkinsonianas.

EL descubrimiento de la fuerte disminución de dopamina en los ganglios basales de pacientes con la enfermedad de Parkinson han motivado el desarrollo de modelos experimentales en animales. El cambio conductual causado por drogas colinérgicas, reserpina y agentes relacionados, y las lesiones neuronales no selectivas fueron los primeros modelos animales usados para la enfermedad de Parkinson.

Carlsson y col. (1957) fueron los primeros en describir la disminución de catecolaminas y 5-hidroxitriptamina causados por reserpina, acompañada de hipocinesia en el ratón (25). Los cambios observados fueron antagonizados por levodopa, de este modo surgió el primer modelo animal de la enfermedad de Parkinson. Todas esas observaciones contribuyeron a un rápido avance en el conocimiento de los cambios bioquímicos en la enfermedad de Parkinson, en la cual el hallazgo más importante fue la destrucción de las células nerviosas dopaminérgicas.

Con un modelo animal apropiado podría ser posible 1) proponer un nuevo agente potencial; 2) elucidar el mecanismo de acción de ese agente; 3) clarificar la patofisiología de la enfermedad humana correspondiente. Aunque por regla general un modelo animal nunca será equivalente a una enfermedad humana.

A continuación son revisados los más importantes modelos de la enfermedad de Parkinson:

II.3.1. Modelos colinérgicos

El temblor, una de las características sobresalientes de la enfermedad de Parkinson, puede ser inducido en roedores por

varios agentes colinérgicos, tales como la arecolina, la tremorina, la oxotremorina, la fisostigmina y la nicotina (26).

La tremorina y su metabolito, la oxotremorina, son los dos agentes más usados (27). Su acción promotora del temblor parece ser mediada principalmente por receptores centrales muscarínicos. El antagonismo del temblor inducido por la oxotremorina puede ser usado para investigar el efecto antimuscarínico central de la droga (26). Ha sido observada una relación entre la potencia antimuscarínica y la actividad anti-temblor de un gran número de drogas antiperkinsonicas en el ratón (28). Sin embargo, el temblor inducido por agonistas colinérgicos semeja más a una condición de intoxicación que al temblor de la enfermedad de Parkinson (29).

Grandes dosis de las drogas colinérgicas ya mencionadas en roedores también inducen catalepsia, incluyendo acinesia, postura anormal, y muchas veces rigidez. La intensidad de la catalepsia puede ser cuantificada, y la inhibición por antagonistas colinérgicos, por ejemplo, la atropina, puede ser usada como una indicación de su actividad central (30).

II.3.2. Lesión neuronal no selectiva

Una lesión del tegmento ventromedial en monos producida por electrocoagulación causa temblor permanente e hipocinesia (31,32). El método no fue selectivo; destruye células dopaminérgicas pero también otras células nerviosas y zonas localizadas en el area lesionada. Este método ha sido formalmente

usado para probar drogas dopaminérgicas potenciales (33). Se ha notado que una lesión limitada a la substancia nigra no causa temblor en el mono, pero sí causa hipocinesia. Tanto el núcleo caudado como la substancia nigra pueden ser lesionados para inducir rigidez en el mono (32).

La destrucción unilateral del cuerpo estriado de la rata por electrocoagulación o por succión indujo un leve cambio conductual: la rata mostró una tendencia a moverse con dirección al sitio de lesión (ipsilateral). Después de la administración de drogas que facilitan la transmisión dopaminérgica (por ejemplo levodopa), la asimetría postural se incrementa y se induce una marcada conducta de giro (34,35). Este modelo permite la evaluación del efecto de la droga en la zona contralateral del sistema dopaminérgico nigroestriatal dañado. Sin embargo, no es selectivo y no reproduce los cambios neuronales específicos de la enfermedad de Parkinson.

II.3.3. Métodos químicos

A) Reserpina.

Esta droga inhibe el almacenaje de dopamina (y también de noradrenalina y 5-hidroxitriptamina) en las vesículas intracelulares, produciendo la disminución de dopamina en las terminales nerviosas. Como resultado se presenta sedación, hipocinesia, rigidez (catalepsia) y temblor (36). Esta misma condición puede ser inducida por tetrabenazina y también por *α*-metil-p-tirosina, un inhibidor de la enzima tirosina hidroxilasa.

Los efectos tanto de la reserpina como de la α -metil-p-tirosina son reversibles, puesto que esos agentes no causan ninguna lesión neuronal. Estas sustancias también tienen efectos periféricos además de los producidos en el sistema nervioso central, por lo tanto, la condición inducida por éstos no es semejante a la enfermedad de Parkinson.

B) Neurolépticos

La mayoría de los neurolépticos son antagonistas de los receptores de dopamina. La capacidad de los neurolépticos para producir catalepsia en roedores parece estar correlacionada con su efecto inductor de parkinsonismo en el hombre (37). La catalepsia inducida por los neurolépticos es aguda, transitoria y no está relacionada con la lesión de neuronas dopaminérgicas. De esta manera no es un modelo apropiado para el estudio de la enfermedad de Parkinson idiopática.

B) 6-Hidroxi-dopamina

Este fué el primer agente descubierto que se conoce destruye selectivamente a los sistemas catecolaminérgicos. Esta selectividad se debe a que utiliza el mismo sistema de recaptura de las aminas biogénicas, la dopamina, la noradrenalina y la serotonina (38). Como la 6-hidroxi-dopamina no penetra la barrera hematoencefálica, debe ser administrada intraventricularmente o intracerebralmente para producir la degeneración de las neuronas dopaminérgicas o noradrenergicas. Se produce una destrucción selectiva y permanente de las células nerviosas dopaminérgicas

por inyección de 6-hidroxidopamina local en la substantia nigra o ligeramente anterior a ésta. Cuando se administra bilateralmente en roedores, el animal llega a tener no solo hipocinesia, sino también afagia y adipsia, requiriéndose un conducto de alimentación artificial para mantener vivos a los animales. Ungerstedt inyectó 6-hidroxidopamina en cantidades pequeñas (6-8 ug) unilateralmente en la substantia nigra de la rata para evitar la afagia y la adipsia (39,40).

Cuando la apomorfina, un potente agonista de la dopamina, fué dada pocos días después a los animales, éstos comenzaron a girar en dirección opuesta a la lesión (40). Este comportamiento de giro contralateral inducido por la apomorfina está relacionado con el desarrollo de supersensibilidad de los receptores dopaminérgicos en la substantia nigra deafferentada.

La bromocriptina y otros agonistas de dopamina actúan directamente sobre los receptores de dopamina y la levodopa también producen comportamiento de giro contralateral, similar al causado por la apomorfina. Sin embargo, hay variaciones cuantitativas entre esos compuestos en la duración de su acción, potencia y eficiencia (41). El modelo de Ungerstedt es apropiado para la evaluación del potencial dopaminérgico característico de un nuevo agente. El método puede ser usado para diferenciar la acción de un agente pre o post-sináptico. Las consecuencias conductuales de la estimulación dopaminérgica (post-sináptica) e indirecta (pre-sináptica) son en realidad opuestas: un compuesto que activa directamente a los receptores dopaminérgicos, causa

conducta de giro contralateral; mientras que un compuesto que actúa indirectamente causa solo ipsilateral. Además, pueden ser evaluados con este modelo, la potenciación o la inhibición del efecto de levodopa por otras drogas. El modelo "de giro" ha sido usado por años para la búsqueda de nuevas drogas dopaminérgicas. Por lo que éste parece ser un modelo válido para predecir una actividad antiparkinsonica de nuevos compuestos (35).

La lesión dopaminérgica por la inyección intranigral de 6-hidroxi-dopamina es estable, aunque se ha observado sensibilidad incrementada, por ejemplo, para la apomorfina, cuando se administra repetidamente (40). La destrucción neuronal específica inducida por la administración intracerebral de la 6-hidroxi-dopamina ha sido cuestionada (42,43). Butcher y col. no encontraron diferencias claras en el daño neuronal por la 6-hidroxi-dopamina (43). Sin embargo, otros autores demostraron degeneración dopaminérgica específica después de la inyección de 6-hidroxi-dopamina (44,45). La especificidad es dependiente de la dosis, o el volumen inyectado de 6-hidroxi-dopamina, y de la técnica de inyección (44,45).

En el modelo original de Ungerstedt, además de la zona dopaminérgica nigroestriatal, también la zona dopaminérgica ascendente, es parcialmente destruida. Recientemente, fue introducida una modificación perfeccionada del modelo original de Ungerstedt, en donde solamente las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales son destruidas por la 6-hidroxi-dopamina usando una técnica estereotáxica exacta (46).

D) 1-Metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP).

Es un agente sintético estructuralmente semejante al narcótico meperidina. Su efecto tóxico fué observado en individuos jóvenes quienes lo usaron por accidente como un subproducto del agente analgésico parecido a la meperidina (1). La MPTP causó síntomas virtualmente idénticos a aquellos de la enfermedad de Parkinson idiopática (1,47). Esos pacientes respondieron a la levodopa y a los agonistas de la dopamina. Los sujetos libres de síntomas, quienes fueron expuestas a la MPTP, mostraron neuronas dopaminérgicas al parecer parcialmente destruidas. Esta observación fué realizada por medio de estudios de tomografía de emisión de positrones (PET) utilizando ¹⁸F-6-fluorolevodopa (48). De este modo los individuos que usaron MPTP sirvieron en un sentido como "modelos humanos" de la enfermedad de Parkinson.

Son considerables las diferencias entre especies en cuanto a la sensibilidad al efecto tóxico de la MPTP: el mono es claramente el más sensible; el ratón, el gato, el conejillo de indias y el perro son sensibles; mientras que la rata es relativamente resistente a la MPTP (49). La MPTP es una protoxina la cual es convertida al metabolito tóxico 1-metil-4-fenilpiridinio, el ión MPP⁺, por acción de una enzima mitocondrial, la monoamina oxidasa tipo B (MAO-B) (8,50,51). El MPP⁺ así formado es incorporado por las neuronas dopaminérgicas a las cuales destruye, probablemente por interferir con la respiración mitocondrial (52,53,54,55).

El efecto tóxico de la MPTP en animales puede prevenirse por la administración de un inhibidor de la monoamina oxidasa tipo B, tal como el deprenyl (56,57). Los inhibidores de la recaptura de la dopamina son también efectivos en prevenir el efecto tóxico de la MPTP en ratones (49,58).

De las cepas de ratones, la C 57 black es la más sensible a la MPTP, y la sensibilidad aumenta con la edad (59). Una gran deficiencia en la dopamina estriatal inducida por la MPTP causó cambios conductuales (hipocinesia) en ratones, los cuales respondieron a la levodopa (59). Sin embargo esos cambios conductuales no fueron permanentes.

Las deficiencias bioquímicas, y conductuales en monos después de la administración de MPTP son parecidos en un grado considerable a aquellos que se presentan en enfermedad de Parkinson (tabla 1) (4,49,60,61). La MPTP indujo un claro temblor permanente en el mono verde africano (49), mientras que el temblor postural fué observado en otras cepas (61,62). La levodopa y los agonistas de la dopamina revirtieron el déficit conductual inducido por MPTP (61). El uso regular de levodopa pueden causar discinesia en monos y también en los pacientes con parkinsonismo inducido con MPTP (1,61).

TABLA 1 COMPARACION DE CAMBIOS INDUCIDOS POR LA MPTP EN EL RATON. EL MONO Y EL HOMBRE (basada en datos de Chiueh et al. 1984; Markey et al. 1986; Heikkila & Sonsalla, 1987; Langston & Irwin, 1989).

Variable	ratón	mono	hombre
Hipocinesia	+ -	+	+
Rígidez	+ -	+	+
Temblor	-	+ -	+
Postura flexionada	-	+	+
Disfagia	-	+	+
Permanencia de facciones	-	+ -	+
Decremento de dopamina estriatal	+	+	+
Dismin. de células en sustantia nigra	+ -	+	+
Protección por inhib. de la MAO B	+	+	+
Respuesta a la levodopa	+	+	+
Dosis acumulativa (mg/kg)	80	2	?

+ característica constante

+ - característica transitoria o variable

- característica ausente

? característica dudosa o desconocida.

Recientemente fué producido un modelo de hemiparkinsonismo por la inyección de MPTP directamente en una de las arterias carótidas del mono (63,64). Este modelo se parece al modelo de Ungerstedt en la rata. El parkinsonismo y el hemiparkinsonismo inducidos por MPTP en monos son modelos apropiados también para estudios de PET examinados con ¹⁸F-6-fluorolevodopa (65).

El parkinsonismo inducido por MPTP en monos es el mejor modelo de la enfermedad de Parkinson disponible hasta ahora. Como consecuencia, las investigaciones en los monos son amplias y laboriosas, ya que ésta especie es la más apropiada para investigaciones patofisiológicas, neuroquímicas y de drogas específicas a largo plazo, y sin embargo menos apropiados para la búsqueda de estudios de nuevas drogas potencialmente útiles en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, debido al alto costo de los estudios.

II.3.4. Modelo de la edad.

Se ha sugerido que el proceso natural del envejecimiento de las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales es debido a la acción de neurotóxicas específicas originadas a partir del metabolismo de la dopamina (66), y que la enfermedad de Parkinson puede ser una forma de envejecimiento prematuro debido a tóxicas de origen desconocido (67). Ambas tóxicas, tanto las endógenas como los radicales libres y las quinonas como las exógenas, análogas a la MPTP, pueden contribuir a la patogénesis de la enfermedad de Parkinson (68). Cuando fué administrado el deprenyl, un inhibidor de la monoamina oxidasa tipo B, se previno

la disminución de dopamina, facilitó la actividad de las neuronas nigroestriatales y protegió del efecto neurotóxico de la 6-hidroxidopamina en animales (67). También protegió del efecto tóxico de la MPTP. Sin embargo, en esos estudios fue administrado antes o conjuntamente con MPTP. Los primeros estudios clínicos con deprenyl fueron prometedores con el propósito de prevenir la progresión de la enfermedad de Parkinson (69).

Se ha usado la inhibición de cambios relacionados con la edad, en ratas, como un modelo animal para evaluar a las drogas que puedan ser implementadas también para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. El tiempo de vida y la actividad sexual, se han empleado como criterio conductual (70). La administración de deprenyl incrementó significativamente la vida y la actividad sexual de las ratas macho (70,71). El obstáculo para este modelo es que es necesario un periodo largo de administración de la droga, que puede ser de 3.5 años (70). Por otro lado, el proceso de la edad no explica la degeneración de neuronas dopaminérgicas nigroestriatales en la enfermedad de Parkinson (72).

Marshall y Berrios (1979) describieron un deterioro en la habilidad de nado de las ratas viejas, la cual fue revertida por levodopa y apomorfina. Esta prueba podría ser un indicador de las alteraciones dopaminérgicas relacionadas con la edad (73).

II.4. Cambios patológicos en organismos intoxicados con MPTP.

II.4.1. Estudios histológicos

El síndrome de parkinsonismo inducido por la MPTP en el hombre, es clínicamente indistinguible al de la enfermedad de Parkinson idiopática.

Los cerebros de pacientes que han muerto por la enfermedad de Parkinson idiopática exhiben una profunda disminución de las neuronas pigmentadas de la substantia nigra que normalmente proyectan al estriado. Esta pérdida de células neuronales ha sido asociada con inclusiones eosinófilicas intracitoplasmáticas, o cuerpos de Lewy, en la substantia nigra. Otras áreas que muestran cambios degenerativos son el locus coeruleus, el núcleo dorsal motor del vago, y el núcleo basal de Meynert, y esos cambios son también acompañados por la presencia de cuerpos de Lewy (74).

Por otra parte, todas las evidencias sugieren que la neurotóxina MPTP, destruye selectivamente las neuronas de la zona compacta de la substantia nigra (3,4,75); dentro de estas evidencias se incluyen casos de intoxicación por MPTP en humanos. Las restantes áreas cerebrales parecen estar intactas, incluyendo el locus coeruleus y el área tegmental ventral dopaminérgica. La MPTP es la primera neurotoxina que afecta selectivamente a las neuronas dopaminérgicas (75).

En el caso particular de la intoxicación con MPTP en humanos, por medio de autopsia se encontró una destrucción celular en la substantia nigra y afluencia de estructuras eosinofílicas citoplasmáticas parecidas a cuerpos de Lewy (76). Esos cambios fueron confirmados por Langston y col. (1).

Los organismos tratados con MPTP y estudiados histológicamente con técnicas de fluorescencia, muestran hinchazón y distorsión de los axones en la vía nigroestriatal, con una disminución de terminales fluorescentes en el cuerpo estriado y en los cuerpos celulares de la substantia nigra, especialmente en los monos (75).

Los primates tratados con MPTP durante 7 días, muestran cambios histológicos en la substantia nigra, especialmente en la pars compacta; dichos cambios fueron: células nerviosas necróticas con núcleo picnótico y pigmentos granulares extracelulares (77).

Los estudios con el microscopio electrónico han mostrado que en la substantia nigra se presentan cambios vacuolares en las neuronas pigmentadas, asociados con rompimiento de cromatina en el núcleo y desintegración del nucléolo. El aparato de Golgi y lisosomas se encontraron también dilatados (77).

Un mes después del tratamiento, en áreas donde se han encontrado los cuerpos de Lewy en humanos, se han reportado inclusiones eosinofílicas en la substantia nigra, en el núcleo dorsal motor del vago, en el núcleo basal de Meynert, y en el núcleo dorsal del raphe en el mono ardilla (78).

La histología es menos clara en la rata, no parece haber disminución de células en la substantia nigra (60), sin embargo, en el ratón, Heikkilä y colab. han reportado una disminución celular (79).

II.4.2. Estudios bioquímicos

Bioquímicamente, la disminución de neuronas en la substantia nigra en la enfermedad de Parkinson, es acompañada por una disminución en el contenido de dopamina así como una disminución en los niveles de las enzimas responsables de la síntesis de catecolaminas, como son la tirosina hidroxilasa y la dopa-descarboxilasa en las áreas cerebrales afectadas (80). En pacientes no tratados, se encuentran disminuidos los niveles de ácido homovanílico (HVA), el principal metabolito de la dopamina (74) en líquido cefalorraquídeo (LCR), indicando la relativa importancia de las neuronas nigrales para una buena producción de dopamina cerebral.

El decremento en los niveles de HVA en el líquido cefalorraquídeo, ha sido reportado tanto en enfermos de Parkinson, como en pacientes expuestos a la MPTP (81), con niveles medios de 15 y 16 ng/ml, respectivamente, comparado con el promedio de los controles de 47 ng/ml. Los niveles del ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA), el principal metabolito de la serotonina en el líquido cefalorraquídeo, no están alterados en ninguno de los dos grupos; pero están muy elevados los niveles del metabolito de la norepinefrina el 4-hidroxi-3-metoxifeniletilenglicol (MHPG) en pacientes expuestos a la MPTP (77 ± 0.5 ng/ml) comparado con aquellos con la enfermedad de Parkinson (43 ± 0.4 ng/ml) o con el grupo control (5.4 ± 0.4 ng/ml). En los pacientes expuestos a la MPTP el daño limitado a las neuronas dopaminérgicas puede ser compensado por la actividad

central noradrenérgica y esto no ocurre en pacientes con la enfermedad de Parkinson quienes tienen también daños en el locus coeruleus.

II.5. Metabolismo de la MPTP

La mayoría de los esfuerzos para dejar en claro el mecanismo de acción de la neurotóxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina la MPTP, han proporcionado poco adelanto en el conocimiento. Sin embargo, se sabe que la MPTP es un compuesto liposoluble que penetra fácilmente las membranas, incluyendo la barrera hematoencefálica (8). Markey y cols. demostraron que la MPTP es rápidamente metabolizada a su derivado cuaternario el ión 1-metil-4-fenilpiridinio el MPP+ (8).

La conversión de la MPTP a su metabolito MPP+ se demostró primero in vitro en homogenados de cerebro de rata (30,82) y mono (8), y posteriormente en otros tejidos. La oxidación de MPTP a MPP+ es mediada por una enzima mitocondrial, la monoamina oxidasa tipo B (MAO-B) (Fig. II). La biotransformación de MPTP es bloqueada por drogas que inhiben la MAO-B tales como el deprenyl y la pargilina, pero no por aquellas que bloquean solamente la monoamina oxidasa tipo A (MAO-A) como la clorgilina, lo cual llevó a la conclusión que la MAO-B participa en la bioactivación de la MPTP.

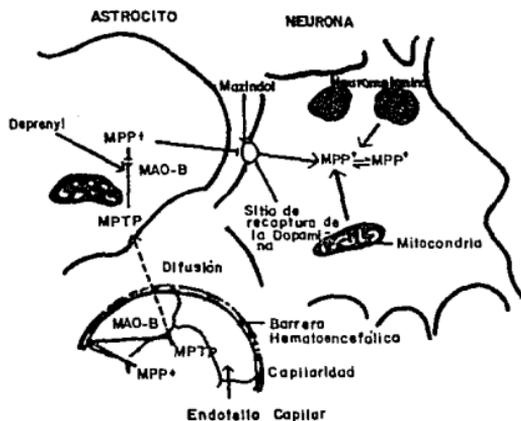


Figura. II. Metabolismo de la MPTP (Kopin, 1988)

De la oxidación inicial de la MPTP resulta un compuesto intermediario la 1-metil-4-fenil-2,3- dihidropiridina (MPDP+), la cual puede ser auto-oxidada por desproporción a la MPTP y el MPP+, o ser convertida enzimáticamente a MPP+ (Fig. III).

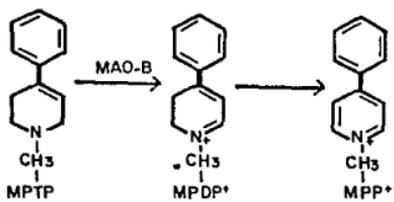


Figura. III. El MPP+ es formado por la oxidación de la MPTP a MPDP+, mediada por la MAO-B. La MPDP+ puede auto-oxidarse a MPP+.

La importancia que tiene la biotransformación de la MPTP para que se presente la toxicidad de la misma, fué establecida cuando se demostró que la inhibición de la MAO-B por pretratamiento con pargilina (un inhibidor no selectivo de la MAO) y el deprenil (un inhibidor selectivo de la MAO-B) u otros inhibidores de la MAO-B (pero no clorgilina) no solamente bloquean la formación de MPP+, sino previenen la disminución de dopamina en el cerebro del ratón (83,84) y protegen contra el desarrollo del parkinsonismo inducido por MPTP en monos (5,57).

Por otro lado, fué posible demostrar que el MPP+ es tóxico in vivo e in vitro, después de una inyección intravenosa, o después de una inyección local directamente dentro del cerebro del mono y del ratón. El MPP+ es un compuesto polar que no penetra fácilmente la barrera hematoencefálica, así que su formación a partir de la MPTP en los capilares del cerebro pueden impedirse si el precursor no entra en el cerebro. De este modo la MAO-B de los vasos pequeños y de los capilares puede actuar como una barrera enzimática para la penetración de la MPTP al cerebro. La MAO-B se localiza dentro de las neuronas serotoninérgicas (85) y en los astrocitos (86), así como en las paredes de los vasos sanguíneos de algunas especies.

El MPP+ es un compuesto polar que se difunde con dificultad a través de las membranas lipídicas, pero que sin embargo sale de las neuronas serotoninérgicas y de los astrocitos hacia los sistemas de recaptura de la norepinefrina y de la dopamina por los que tiene una gran afinidad, concentrándose selectivamente en

las neuronas dopaminérgicas (53,86), en donde es secuestrado junto con la dopamina en sus vesículas (8,87).

Las drogas que inhiben la captura de dopamina (mazindol), previenen el daño inducido por la MPTP a las neuronas dopaminérgicas de ratones (86,88,89).

A pesar de no tener aún ningún resultado en concreto acerca del posible mecanismo de acción de la MPTP, se realiza un gran esfuerzo para descubrirlo, ya que probablemente éste sea el mecanismo de acción que induce la muerte celular en la enfermedad de Parkinson idiopática (90).

II.6. Mecanismos de toxicidad celular de la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP).

En la actualidad han sido propuestas principalmente 2 teorías para tratar de explicar el mecanismo de toxicidad celular inducida por la MPTP:

II.6.1. TEORIA I. Inhibición de las enzimas mitocondriales por la acción del ión 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP+).

Como ya se mencionó antes, el metabolito realmente tóxico es el ión 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP+) después de su biotransformación a partir de la MPTP por medio de la MAO-B.

Ramsay y col. demostraron que el MPP+ es acumulado por un proceso de captura dependiente de energía dentro de la mitocondria intacta (91,92,93,94). El proceso de captura parece ser dependiente de un gradiente electroquímico de la membrana mitocondrial, ya que la valinomicina y el K+, anulan el gradiente, inhibiendo la captura de MPP+. In vitro, el MPP+

interfiere con la oxidación dependiente de NADH del piruvato o glutamato en mitocondrias purificadas de rata o de ratón. sin que afecte la oxidación del succinato. Esto sugiere que el sitio de interacción con el proceso respiratorio es en el complejo I (95). En rebanadas de neostriado de ratón, el MPP+ o la MPTP incrementa la formación de lactato y aumenta la acumulación de glutamato y de aspartato, lo que es congruente con la inhibición de la oxidación mitocondrial.

Los iones de calcio interfieren con la captura de MPP+ en mitocondrias aisladas de rata (94), ya que pueden competir por el mismo gradiente electroquímico. Aunque ni la 6-OH-DA ni el MPP+ separadamente tienen mucho efecto en la tasa de liberación de calcio secuestrado en la mitocondria, juntos incrementan grandemente la tasa de eflujo de calcio. Por otro lado, el exceso de calcio liberado al citoplasma ha sido implicado como una causa de muerte celular, ello sugirió que los efectos tóxicos de la MPTP podrían ser mediados a través de la liberación de calcio de la mitocondria.

Algunas evidencias a favor de esta teoría son:

1.- Los inhibidores de la respiración mitocondrial que actúan sobre el sitio I, como la rotenona, producen daño dopaminérgico cuando se administran intrecerebralmente (96).

2.- La administración de MPTP o MPP+ disminuye el contenido de ATP en hepatocitos de rata (97).

3.- La administración de MPTP a hepatocitos produce un incremento en el Ca^{2+} citosólico y una disminución del

mitocondrial, considerándose ésto como un índice de daño estructural a la mitocondria (98)

Evidencias en contra de esta hipótesis son:

1.- Estudios de microscopia electrónica indican que los efectos tempranos de MPTP no producen alteraciones en la estructura mitocondrial, tal como ocurre con otras sustancias tóxicas que afectan la respiración mitocondrial (99).

2.- La disminución del ATP inducida por MPTP en las neuronas, se produce después de 12 horas de incubación con concentraciones de 1 a 3 mM de la neurotóxina (100).

II.6.2. TEORIA II. Toxicidad de la MPTP mediada por radicales libres.

La formación de radicales libres es bien conocida y es un importante mecanismo mediador de los efectos tóxicos de una gran variedad de compuestos químicos (101). La semejanza estructural del MPP+ y el pesticida paraquat sugiere que el mecanismo de su toxicidad puede ser similar (102). Bus y colab. (1976) propusieron que los efectos tóxicos del paraquat son mediados por el ciclo redox en presencia del oxígeno, para generar radicales libres superóxido (O_2^-) (103). Cuando hay una

disminución de antioxidantes protectores (por ejemplo glutatión), son formados O_2^- , H_2O_2 y OH causando peroxidación lipídica en las membranas celulares y en la de los organelos como la mitocondria y los lisosomas, daño oxidativo al DNA y RNA, e inactivación de enzimas.

En los tipos celulares altamente especializados como son las neuronas, la peroxidación de lípidos puede participar como un factor primordial para que ocurra el daño funcional irreversible. La vulnerabilidad del tejido nervioso a este proceso y en particular en los ganglios basales, es debido a 3 factores:

- 1) Una tasa alta de consumo de oxígeno
- 2) Un alto contenido de fosfolípidos con ácidos grasos poliinsaturados, susceptibles a la peroxidación de lípidos (104,105,106,107).
- 3) La ausencia de la actividad de la catalasa (enzima que descompone el H_2O_2 altamente tóxico) en el cerebro.
- 4) Concentraciones altas de metales de transición generadores de radicales libres (Fe^{2+}).

Normalmente, las enzimas superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa, junto con sustancias solubles reducidas previenen la acumulación excesiva de radicales libres. Sin embargo, cuando la formación de radicales libres se acelera, el mecanismo protector puede ser inadecuado.

Se ha sugerido que la peroxidación de lípidos puede estar implicada en varios desórdenes neurológicos (104,105), incluyendo la enfermedad de Parkinson, en la que se demostró que la peroxidación lipídica basal postmortem está incrementada en la substantia nigra (106). Han sido obtenidas evidencias indirectas en apoyo al papel del ciclo redox y la participación de los radicales libres en la toxicidad del MPP+ (109).

El pretratamiento de los ratones con dietilditiocarbamato (DDC), el cual quelata al cobre e inhibe la superóxido dismutasa, potencia la toxicidad tanto del paraquat (110) como de la MPTP (111).

El parecido entre el paraquat y el MPP+, cuando se administran sistemáticamente es evidente, ambos causan diferente daño tóxico en los pulmones e incrementan los niveles de glutatión oxidado en plasma, lo cual indica la existencia de stress oxidativo (112).

Evidencias a favor de esta hipótesis son las siguientes:

1.- El MPP+ genera radicales libres $O_2^{\cdot -}$ y OH^{\cdot} in vitro (113) ,
2
y la producción de estos radicales está determinada por la presencia de metales de transición (114)

2.- La MPTP disminuye los niveles de glutatión-SH en substantia nigra de roedores, lo que implica una reducción en los mecanismos de defensa contra los radicales libres que son dependientes de este aminoácido (115)

3.- El tratamiento con antioxidantes previene el efecto neurotóxico de la MPTP (116) y del MPP+ (117)

4.- La administración del dietilditiocarbamato, un inhibidor de la enzima superóxido dismutasa (otro mecanismo protector contra los radicales libres), y quelante de los metales Mn, Cu y Zn, potencia los efectos neurotóxicos de la MPTP in vivo (111)

5.- El MPP+ incrementa la peroxidación de lípidos in vitro (118).

Evidencias en contra de esta teoría

Algunas evidencias recientes, sin embargo, sugieren que la participación de los radicales libres en la neurotoxicidad de la

MPTP no es tan clara:

1.- La administración de drogas que incrementan el contenido de glutatión intracelular no protegen de la neurotoxicidad de la MPTP (119)

2.- Algunos autores no encuentran el efecto protector de los antioxidantes (120)

3.- El dietilditiocarbamato aumenta la vida media del MPP+ en el tejido neural y esto podría explicar la potenciación del efecto de la MPTP (121)

4.- La administración de la MPTP por vía sistémica no incrementa la peroxidación de lípidos cerebral, medida a través del índice de conjugación de dienos (122)

Finalmente, es muy importante correlacionar los hallazgos mecanísticos que apoyan la hipótesis de los radicales libres en el modelo de Parkinson por la MPTP, con el Parkinsonismo idiopático, ya que existen reportes de estudios post-mortem de pacientes que indican lo siguiente:

1) En el cerebro la peroxidación de lípidos basal está aumentada (108)

2) El contenido de ácidos grasos poli-insaturados (substrato de la peroxidación de lípidos) en la sustancia nigra está disminuido (123)

3) Se ha reportado una disminución de glutatión-SH en la sustancia nigra (124)

4) El ión Hierro (II+), promotor de radicales libres, está aumentado en la sustancia nigra (125).

No obstante las evidencias, el papel potencial de los radicales libres en el proceso degenerativo de diversos desórdenes neurológicos, ha estado sujeto a especulación durante muchos años (126).

II.7. Elementos traza en el metabolismo cerebral

El término "elemento traza" hace referencia al grupo de elementos químicos presentes en bajas concentraciones (mg) en moléculas biológicas. La lista de elementos traza esenciales para los animales incluye 12 elementos de acuerdo a lo reportado por Nielsen (1984): arsénico, cromo, cobalto, cobre, yodo, fierro, manganeso, molibdeno, níquel, selenio, silicio y zinc. Existen algunas evidencias de esencialidad para adicionar 5 elementos ultratrazas como: boro, fluor, plomo, litio, y vanadio y evidencias débiles para incluir otros: bromo, cadmio y estaño (127).

Sin embargo, se conoce poco acerca de las funciones neuroquímicas de los elementos traza esenciales. Los elementos traza que se sabe son requeridos para el desarrollo y mantenimiento del sistema nervioso central (S.N.C.), son manganeso, cobre, fierro, cobalto, yodo, molibdeno selenio y zinc (128).

La distribución de los elementos traza en el cerebro es variable (tabla 2) [humano: Fe (129), Mn y Se (130), Cu y Zn (131); rata: Mn (132), Cu y Fe (133), Se (134), Zn (135)]; de este modo cada uno de ellos tiene una forma y función única dentro del S.N.C. (tabla 3) (129,130,131,132, 133).

TABLA 2. CONCENTRACIONES DE Mn, Cu, Fe, Se Y Zn
EN LAS DIFERENTES REGIONES CEREBRALES.

REGION	NIVELES DEL ELEMENTO ug/g PESO SECO				
	Cu	Fe	Mn	Se	Zn
Cerebro de Humano					
Centrum semiovale	13.7	136	-	0.31	35.0
Corteza cerebral (frontal)	24.7	316	0.81	0.71	73.5
Corteza cerebelar	33.1	-	1.18	0.72	74.4
Materia blanca cerebelar	13.5	-	1.22	0.78	-
Cuerpo calloso	9.8	123	0.97	0.39	28.8
Hipocampo	21.0	244	1.09	0.73	107
Locus ceruleus	201	-	-	-	-
Pallidum	30.3	963	1.98	0.78	76.2
Putamen	32.9	874	2.24	1.07	76.8
Substantia nigra	59.9	675	1.36	0.87	66.8
Cerebro de rata					
Cerebelo	14.3	116	2.35	1.10	53.5
Corteza	15.0	102	1.80	0.93	68.9
Hipocampo	14.5	132	2.13	-	88.2
Hipotálamo	18.3	89.4	5.88	-	52.0
Médula oblongada	11.1	80.5	1.71	0.83	36.2
Mesencefalo	14.6	97.0	2.42	-	49.4
Estriado	14.6	61.4	1.91	-	67.4

 En el caso del humano los niveles más elevados de estos metales se ubican en tres regiones, el palido, el putamen y la sustancia nigra, que en conjunto forman la vía nigroestriatal, la cual es afectada por la enfermedad de Parkinson. En el cerebro de la rata la distribución es más heterogénea.

TABLA 3. ELEMENTOS TRAZA ESENCIALES. MOLECULAS EN DONDE SON INCORPORADOS Y LA FUNCION BIOLOGICA DE TALES MOLECULAS.

ELEMENTO	MOLECULA	FUNCION
Cromo	Proteina (?)	Tolerancia a la glucosa, secundaria a nutrición parental.
Cobalto	Vitamina 12 ₁₂	Síntesis de metionina e isomerización de la metil-malonil-coenzima A.
Cobre	Enzimas: oxidasa, superóxido dismutasa, etc.	Destrucción del radical superóxido.
Fluor	Hidroxiapatita fluorada.	Aumento en la dureza de los dientes.
Fierro	Proteínas con grupo hemo: hemo globina, citocromos, catalasa etc.	Transporte de oxígeno, de electrones. destrucción de H ₂ O ₂ . etc.
Yodo	Triyodotironina, tiroxina, etc.	Regulación del metabolismo.
Manganeso	Enzimas: superóxido dismutasa, etc.	Destrucción del radical superóxido.
Molibdeno	Enzimas: xantina oxidasa, aldehído oxidasa, etc.	Síntesis del radical superóxido
Selenio	Enzimas: glutatión peroxidasa	Disminuir la concentración de H ₂ O ₂ y de hidroperóxido de lípidos
Zinc	Enzimas: superóxido dismutasa, etc.	Destrucción del radical superóxido.

Los elementos traza en el metabolismo cerebral, participan como cofactor de enzimas metalodependientes, implicadas en diferentes funciones biológicas, en diversos organelos subcelulares.

II.7.1. Manganeso.

La información acerca de las funciones neuroquímicas del manganeso es limitada. Sin embargo, estudios nutricionales han confirmado que el manganeso es requerido para el desarrollo y metabolismo normal del cerebro (136).

A) Distribución

La concentración de manganeso (Mn) en el tejido nervioso es baja; se encuentra distribuido heterogeneamente lo mismo en el humano, que en la rata (tabla 2), observándose valores altos en el globo pálido y en el putamen del humano y en el hipotálamo en el caso de la rata.

La distribución cerebral del manganeso es afectada por diferentes factores dentro de los cuales tenemos: la especie biológica de que se trate, la edad y la dieta.

Según algunos informes, el contenido de Mn cerebral es mayor en humanos adultos que en los infantes (137).

B) Funciones enzimáticas

El manganeso, in vitro, es capaz de activar cierto número de proteínas, conocidas como manganoproteínas.

Una función enzimática del Mn en el cerebro, como en otros órganos, es realizada por la proteína mitocondrial superóxido dismutasa dependiente de Mn. SOD-Mn.

i) Superóxido dismutasa

La superóxido dismutasa dependiente de Mn es una importante enzima en el metabolismo mitocondrial de los radicales derivados

ii) Glutamina sintetasa

Otra manganoproteína cerebral es la glutamina sintetasa (138). Esta enzima contiene 4 iones Mn por octámero y se ha reportado que tiene el 80% del total de Mn + en el cerebro (139).

2

La glutamina sintetasa es especialmente alta en células gliales donde se realiza la síntesis de glutamina con el fin de ser transportada a las neuronas para la síntesis de los neurotransmisores glutamato y GABA.

iii) Piruvato carboxilasa y glucosil transferasa.

El cerebro puede contener otras enzimas dependientes de Mn tal como la piruvato carboxilasa o la glucosil transferasa, pero de ellas se conoce poco. Ciertas funciones cerebrales dependen de manganoenzimas, sin embargo, el conocimiento sobre ellas es limitado. El Mn puede también influir directamente el metabolismo de los neurotransmisores en adición a su papel catalítico en la glutamina sintetasa.

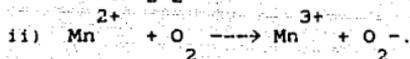
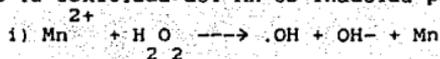
C) Toxicidad.

Ferraz, en 1988 reportó que cuando el Mn se encuentra en exceso, produce una intoxicación en humanos (10). El envenenamiento por Mn se caracteriza por síntomas parecidos a los de la enfermedad de Parkinson idiopática, tales como la micrografía, la bradicinesia, el temblor, la postura flexionada y la inestabilidad emocional; además se presenta una disminución en el contenido de dopamina (DA) nigral y estriatal (10).

Chandra y Shukla en 1981 encontraron que el tratamiento con manganeso produce inicialmente un aumento en el contenido de dopamina, norepinefrina y ácido homovanílico en el cuerpo estriado de ratas, el cual es seguido por un periodo en el que las concentraciones alcanzan su valor normal. La tercer fase se presenta como una disminución en los niveles de las catecolaminas mencionadas (140).

En base a estos y otros hallazgos se ha propuesto:

a) que la toxicidad del Mn es inducida por radicales libres:



b) que el estado de oxidación del Mn es de suma importancia, ya que existe como Mn^{3+} y Mn^{2+} ; siendo el manganeso con valencia 3+ la especie tóxica ya que promueve la peroxidación lipídica, en contraparte el Mn^{2+} es citado como antioxidante (11). (Tabla 4).

**TABLA 4. EFECTO NEUTOXICO DEL MANGANESO. RESULTADO DE UN EXCESO
 EN ALTO O BAJO ESTADO DE OXIDACION.**

MANGANESO	SUBSTRATO	EFECTO	NEUROTOXICIDAD	REFERENCIA
³⁺ Mn	Acidos gra- sos insatu- rados.	Oxidante	Peroxidación de lipidos	Wills. 1965
³⁺ Mn	Glutacion	Oxidante	Peroxidación de lipidos y forma- ción de radica- les libres (OH.)	Misra. 1974 De Rycker Halliwell. 1978.
³⁺ Mn	Dopamina	Oxidante	Incrementa radi- cales libres y ortoquinones.	Donaldson. et al. 1981
²⁺ Mn	Radicales libres ac- tivados por enzi- mas. DBM. guanilato ciclaza y citocromos.	Antioxi- dante	Disfunción dopa- minérgica-coli- nérgica.	Donaldson. 1982.

El estado de valencia del Mn es un factor importante para la toxicidad del metal sobre los lípidos de las membranas celulares. La especie tóxica es el Mn con estado de valencia más alto.

II.7.2. Cobre.

El cobre está presente en relativamente altos niveles en el cerebro y está distribuido heterogeneamente en 2 estados de oxidación, cuproso (Cu^+) y cuprico (Cu^{2+}). La distribución depende de la región cerebral, localización subcelular, y otras variables como la edad, la especie biológica, y factores genéticos. La distribución neural de cobre puede correlacionarse con las funciones neurales conocidas del cobre.

A) Distribución

En general, los niveles de cobre en la sustancia gris exceden los de la sustancia blanca de 2 a 3 veces. Esto puede reflejar la distribución y la concentración de proteínas. El cobre está también en mayor proporción en ciertas regiones como el locus coeruleus y la sustancia nigra.

Además el cobre se encuentra en altas cantidades en la fracción citosólica, a nivel subcelular (145) y en la fracción mitocondrial (145,146) dentro del cerebro; mientras que el cobre y las proteínas constitutivas se encuentran en el mismo porcentaje en las fracciones nuclear, mielínica, microsomal y sinaptosomal (145). Sin embargo, un estudio indicó que el enriquecimiento de cobre en organelos subcelulares puede depender de la región cerebral (146). A pesar de las altas cantidades de cobre en ciertas fracciones subcelulares, existe el cobre necesario en los organelos restantes para su funcionamiento.

B) Funciones enzimáticas

i) Cuproenzimas: desde hace tiempo se conoce que el cerebro contiene un gran número de ligandos de cobre, y estos parecen ser proteínas. A algunas de esas proteínas se les conocen propiedades catalíticas, mientras que de otras se desconocen sus funciones (Tabla 5).

TABLA 5. CUPROPROTEINAS CEREBRALES.

NOMBRE	PESO MOL.	SUBUNIDADES	Cu/MOL.	FUNCION
Albocupreína I	72.000	1	3	Desconocida
Albocupreína II	14.000	1	3	Desconocida
Cobre tioneína	6.000	1	12	Detoxificación de Cu
Citocromo oxidasa	122.000	7	2	Transporte de electrones.
Dopamina B mono-oxigenasa.	290.000	4	8	Síntesis de Norepinefrina.
Neurocupreína	9.000	1	1	Oxidación de aminas
Superóxido dismutasa	32.000	2	2	Dismutación de O ₂ ⁻ .

En esta tabla se muestran las enzimas dependientes de Cu en el sistema nervioso central, desconociéndose la función de algunas.

ii) Citocromo C oxidasa

Una de las actividades enzimáticas dependientes de Cu mejor conocidas es la catalisis de la oxidación de citocromo c. Cohen y Elvehjem, (1934) demostraron que la deficiencia de cobre en el cerebro de la rata, provoca la disminución de la actividad de la oxidasa y del componente a del hemo (147). Asimismo, se demostró que la citocromo c oxidasa contiene Cu (148).

La citocromo c oxidasa contiene 2 moléculas de hemo a, en a y a³, localizado en las subunidades I y II, y dos moles de Cu localizados en la subunidad II (149). Tanto el hemo fierro como el cobre son necesarios para la actividad catalítica y están estrechamente relacionados (150).

En el cerebro, la citocromo oxidasa es una importante enzima del metabolismo oxidativo (fosforilación), ya que facilita la transferencia de 1 electrón. Esta distribución dentro de las neuronas (soma y dendritas) refleja la actividad neural única de esa vía (151). La actividad de la citocromo c oxidasa aumenta aproximadamente 4 veces entre el nacimiento y la lactancia en ratas (83,152).

iii) Superóxido dismutasa

Las células eucariotas, incluyendo neuronas y glia, contienen 2 diferentes proteínas que catalizan la desproporción del radical superóxido (O_2^-), la reducción univalente producto del dioxígeno

(153). Ambas son conocidas como superóxido dismutasa (SOD).

Una es un homodímero de 32.000 daltones de peso molecular. Cada subunidad contiene 1 mol de Cu y Zn (CuZn-SOD). La otra SOD

eucariótica contiene un Mn por subunidad y es un tetramero de 80.000 daltones de peso molecular. La distribución subcelular de CuZn-SOD y de la Mn-SOD es única, la Mn-SOD se localiza en la matriz de la mitocondria, mientras que la CuZn-SOD es localizada principalmente dentro del citoplasma. Recientemente, ha sido descrita una forma extracelular de la superóxido dismutasa (EC-SOD) (154). Esta proteína es una glicoproteína tetramérica que contiene Cu y tiene un peso aproximado de 135.000 daltones. Esta puede también contener Zn y ha sido detectada en muestras de cerebro humano a muy bajos niveles.

A lo largo de 17 años, la CuZn-SOD ha estado sujeta a una intensa investigación neuroquímica, descubriéndose que la proteína cerebral llamada cerebrocupreína, la cual fué aislada en 1957, tiene actividad enzimática (dismutación del O_2^-) (155).

2

La superóxido dismutasa dependiente de Cu y Zn es la mayor cuproproteína cerebral y se ha estimado que el 25% del cobre total está en el cerebro en forma de ésta enzima, en el caso de la rata (156). El S.N.C., es un órgano altamente aeróbico, en estado de reposo, consumiendo aproximadamente una quinta parte del oxígeno total. El S.N.C. es también sensible a la toxicidad del oxígeno. De este modo, la actividad de la SOD se supone que puede ser importante en la protección cerebral por la elevación del radical superóxido (O_2^-) durante las condiciones normales

2

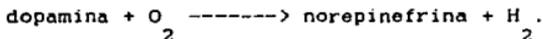
y/o bajo varios estados neuropatológicos. Cuando la actividad de la CuZn-SOD fué reducida aproximadamente en un 25% en el cerebro por una deficiencia de Cu en la dieta de ratas jóvenes, ninguna

evidencia de peroxidación de lípidos aumentada se observó (157). Sin embargo, cuando la actividad enzimática fué inhibida alrededor de la misma extensión (31%) en ratas inyectadas con dietiltiocarbamato (un quelante de Cu), se redujo la latencia a convulsiones inducida con oxígeno hiperbárico (158). Ello sugiere que la SOD dependiente de CuZn juega un papel de antioxidante en defensa del cerebro. Sin embargo, el dietiltiocarbamato, también puede tener otros efectos en el cerebro, tales como la depleción de la vía de la norepinefrina, esta acciona sobre la dopamina- β -monooxigenasa, inhibiendo la glutatión peroxidasa (otro antioxidante) y la elevación del H_2O_2 (159).

Han sido estudiadas un gran número de enfermedades neuropatológicas en las cuales ha sido implicada la peroxidación de lípidos y en las que ha sido medida la actividad de la SOD dependiente de Cu y Zn. Estas incluyen alcoholismo crónico, esclerosis múltiple, y síndrome de Down. No encontrándose cambios en la actividad de la SOD.

iv) Dopamina- β -monooxigenasa

Una tercera enzima dependiente de cobre es la dopamina- β -monooxigenasa (DBM). Es una glicoproteína grande (peso molecular 290,000 daltones) tetrámera, responsable de la síntesis de el neurotransmisor norepinefrina:



La reacción I es catalizada por la DBM y la reacción II por

la semidehidroascorbato reductasa (83). El ascorbato es marcadamente reducido endógenamente por conversión del Cu^{2+} a Cu^+ .

La distribución regional de la DBM. puede ser correlacionada con la existencia de las neuronas noradrenérgicas. Los cuerpos celulares de las neuronas noradrenérgicas se encuentran en abundancia en el locus coeruleus, en el tallo cerebral el hipotálamo posterior y en esas regiones la DBM es también abundante según lo reportado por determinación enzimática (160,161) o inmunoquímicamente (162). El método histoquímico mostró también que la DBM está presente en los axones distales, en donde, presumiblemente están localizados cerca del almacén de los gránulos de norepinefrina. En contraste a la citocromo c oxidasa y a la CuZn-SOD , la DBM ha sido la única con una distribución altamente especializada.

v) Albocupreínas

En 1971 se describió la separación de 2 nuevas cupro-proteínas en el cerebro humano. Ellas fueron llamadas albocupreínas I y II (163).

El estudio inicial mostró que los anticuerpos contra la albocupreína I inhibían la actividad de la ceruloplasmina (163). La ceruloplasmina es una glicoproteína del suero de peso molecular 132.000 daltones que contiene Cu .

Fueron necesarios esfuerzos posteriores para determinar si la albocupreína I es la única cuproproteína neural o es

ceruloplasmina parcialmente degradada y atrapada en el cerebro; cerca del 95% del total de Cu en plasma se encuentra en esta proteína (164)]. La albocupreína II es poco conocida.

vi) Cobre tioneína

La metallotioneína (MT) es una pequeña proteína (6.000 daltones de peso molecular), la cual puede incluir varios metales, tales como Cu y Zn. Sin embargo, la MT con cobre (cobre-tioneína) es inducida cuando el cobre cerebral es elevado (165). La función de la MT-Cu en el metabolismo cerebral es desconocida.

vii) Lisil oxidasa

Estrictamente hablando, esta proteína se encuentra en el sistema nervioso periférico en el tejido conectivo asociado con el lecho vascular cerebral (156).

El cobre es requerido para la actividad de la desaminación oxidativa de la peptidil lisina que resulta de la formación del entrecruzamiento de la colágena y la elastina. Las funciones del Cu a través de esta proteína, es mantener un flujo sanguíneo óptimo hacia el cerebro.

viii) Complejos de cobre

Existe incertidumbre respecto al transporte de cobre de la sangre hacia el cerebro. Algunos creen que la ceruloplasmina es responsable, otros sugieren que los complejos cobre-aminoácidos son los encargados (166). El cobre neural puede existir unido a ligandos de bajo peso molecular (167), si el ligando es apropiado

se puede observar una profunda actividad biológica; por ejemplo, ciertos complejos de cobre han demostrado actividad anticonvulsivante (168). El Cu, a altas concentraciones, puede también modificar la captura y liberación de dopamina, norepinefrina y serotonina desde las terminales presinápticas (169). También los complejos cobre-aminoácidos pueden cambiar la secreción de hormonas liberadas por los granulos hipotalámicos (170), sugiriendo además un papel del Cu en la homeostasis neuroendócrina. Este último efecto puede estar mediado vía prostanglandina E₂ (171).

2

C) Toxicidad.

En humanos con enfermedad de Menkes, las lesiones neuropatológicas son similares a aquellas en animales experimentales.

La enfermedad de Menkes resulta de una anomalía del flujo de cobre del tejido epitelial, de tal modo que el cobre se eleva como cobre-tioneína en el riñón e intestino. Los niveles de Cu son bajos en el hígado y el cerebro. Este defecto es el resultado de una mutación sobre el cromosoma X. Han sido descritas la degeneración neuronal, la hipomielinización, la lesión vascular cerebral, anomalías mitocondriales, y la disfunción motora, en jóvenes con la enfermedad de Menkes (12).

Bioquímicamente, los cerebros contienen bajos niveles de cobre (12) y una disminución de la citocromo c oxidasa (172,173), así como de la actividad de la DBM (174). También existen evidencias

de un aumento en la peroxidación de lípidos (173), quizás reflejando un daño en la actividad de la SOD dependiente de Cu y Zn. Esta mutación demuestra claramente la importancia del cobre en el desarrollo y metabolismo del cerebro humano.

La enfermedad de Wilson es otra mutación humana recesiva, la cual influencia la homeostasis del cobre y la función neural. En este desorden, el cobre no es depurado por el hígado, excediéndose eventualmente la capacidad hepática, y por lo tanto se eleva el cobre cerebral (12). Las personas con enfermedad de Wilson exhiben temblores que pueden ser debidos en parte al metabolismo alterado de monoaminas en el cerebro (175). El cobre puede también inhibir algún proceso metabólico fundamental como la glicólisis y dañar su metabolismo energético (176).

II.8.Radicales libres

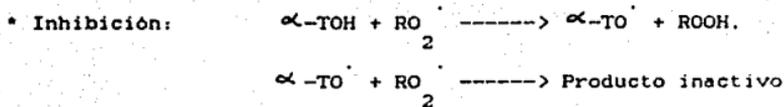
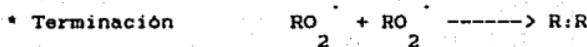
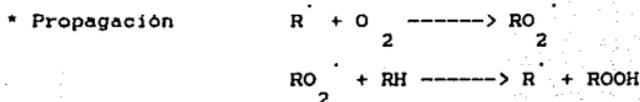
Un radical libre es una especie que tiene uno o más electrones desapareados. Esta definición incluye al átomo de hidrógeno (1 electrón desapareado), a la mayoría de los metales de transición, al oxígeno molecular singuleto, al radical superóxido y al radical hidroxilo (177).

El mecanismo más general y que ayuda a explicar la toxicidad de los radicales libres, lo constituyen las llamadas reacciones en cadena: el radical libre con gran reactividad intrínseca, choca contra una molécula y genera dos moléculas más pequeñas, pero cada una de ellas posee un radical libre; cada nuevo radical libre a su vez genera otros dos radicales libres y así sucesivamente.

Las reacciones catalizadas por enzimas son procesos bien controlados que llevan a la conversión de 100% de productos. En contraste, las reacciones de radicales libres, que con frecuencia proceden de mecanismos que involucran intermediarios reactivos, producen una multitud de productos. Por ejemplo, la autoxidación de lípidos poliinsaturados produce varias docenas de productos que incluyen hidroperóxido, aldehídos, cetonas y varios hidrocarburos.

II.8.1. Reacciones de radicales libres.

Las reacciones de los radicales libres son irreversibles (178.179), caracterizadas por la presencia transitoria de intermediarios altamente reactivos con electrones no apareados. Estas reacciones pueden ser divididas en cuatro fases: iniciación, propagación, terminación e inhibición.



$\alpha\text{-TOH} = \alpha\text{-tocoferol}$.

La fase de propagación puede ser disminuida por antioxidantes. Aunque las fases de las reacciones de radicales libres son relativamente simples, los productos de ellas pueden ser complejos.

II.8.2. Fuentes de reacciones de radicales libres.

Las reacciones de radicales libres son iniciadas continuamente en las células y en los tejidos, tanto por reacciones enzimáticas como no enzimáticas. Las reacciones enzimáticas sirven como fuente de reacciones de radicales libres, como aquellas involucradas en la cadena respiratoria (180,181,182), en la fagocitosis (183,184), en la síntesis de prostaglandinas (185) y en sistema del citocromo p-450 (186). Los radicales libres también surgen de reacciones no enzimáticas del oxígeno con compuestos orgánicos tales como las iniciadas por radiación ionizante.

Los radicales libres formados en las anteriores reacciones incluyen O_2^- (radical superóxido), HO^{\cdot} , R^{\cdot} (radicales orgánicos, RO_2^{\cdot} , RO_2). Estos intermediarios activos participan en las reacciones en cadena de los radicales libres.

II.8.3. Daño inducido por reacciones de radicales libres

Las defensas desarrolladas por las células para protegerse contra los radicales libres incluyen:

Los tocoferoles (187); los carotenos (183); el hemo que contienen las peroxidasas (188); la superóxido dismutasa (189); el ácido úrico (190).

La protección contra las reacciones de los radicales libres no es completa. Los cambios relacionados con estas reacciones incluyen:

a) Alteraciones oxidativas acumulativas en las biomoléculas como la colágena (178), la elastina (191) y material cromosomal (192).

b) Rompimiento de mucopolisacáridos (193)

c) Acumulación de material metabólicamente inerte como el ceroide (194) y pigmentos fluorescentes de la edad (195)

d) Cambios en la membrana característica de los organelos (196,197,198) como la mitocondria y los lisosomas, por la peroxidación de lípidos.

e) Fibrosis arteriocapilar (199,200).

f) Decremento en la actividad enzimática (201)

g) La peroxidación de lípidos modifica el contenido lipídico de las membranas y de los sinaptosomas aislados. Esas modificaciones producen un incremento en la tasa de captura de dopamina, probablemente debida a cambios conformacionales en los acarreadores y/o en la membrana (202).

Las reacciones inducidas por los radicales libres, producen cambios responsables probablemente de la enfermedad de Parkinson y la muerte con el avance de la edad (203).

II.8.4. Fuentes de radicales libres in vivo

Numerosos agentes exógenos y procesos endógenos son capaces de generar radicales libres in vivo (190):

a) Las especies reactivas del oxígeno como el superóxido, peróxido de hidrógeno, y radical hidroxilo son generados in vivo como una consecuencia del metabolismo normal (190,204,205,206). La interacción de ciertos componentes celulares con esas especies de oxígeno, pueden contribuir a enfermedades dependientes de la edad como el cáncer (190,207). Se ha demostrado que los radicales hidroxilo producen daño en las bases, separando las hebras del DNA (205,206).

b) Los oxidantes en presencia de iones metálicos inician la peroxidación de lípidos (205,206).

c) Los peroxisomas que oxidan grandes cantidades de ácidos grasos de la dieta, generan una molécula de peróxido de hidrógeno (un mutágeno, promotor y carcinógeno) (208,209,210,211,212,213, 214).

d) Los leucocitos en la respuesta inmune celular generan el carcinógeno y mutágeno peróxido de hidrógeno y los mutágenos radicales superóxido e hidroxilo (204).

e) La exposición a la luz puede dañar compuestos susceptibles, induciendo oxidación de lípidos y proteínas.

II.8.5. Radicales libres del oxígeno

La fuente principal de daño la constituye el O_2 , que se caracteriza por la presencia transitoria de intermediarios altamente reactivos con electrones desapareados. Los compuestos

tóxicos formados a partir del oxígeno molecular son:

A) Radical superóxido

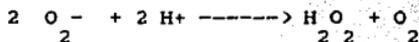
El radical superóxido se forma cuando el oxígeno molecular adquiere un electrón, cedido habitualmente por un metal de transición:

$$O_2 + e \longrightarrow O_2^-$$

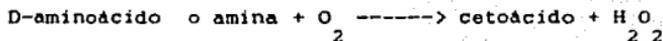
El radical superóxido es formado en casi todas las células aeróbicas (154,215,216). Las células fagocíticas que producen O_2^- incluyen a: neutrófilos, monocitos, macrófagos y eosinófilos.

B) Peróxido de hidrógeno

La adición de un segundo electrón al O_2^- da el ión peróxido O_2^{2-} , el cual tiene electrones apareados y no es un radical, el O_2^{2-} formado, a pH fisiológico, produce inmediatamente peróxido de hidrógeno (H_2O_2).



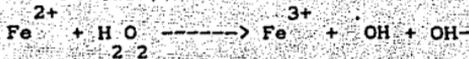
El peróxido de hidrógeno puede resultar también de la oxidación de aminas por medio de enzimas:



C) Radical hidroxilo

La fisión homolítica de la unión O-O en el H_2O_2 produce 2 radicales hidroxilos OH. La homólisis puede ser por calentamiento o radiación ionizante. Una mezcla de H_2O_2 y una sal

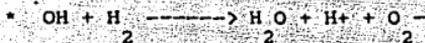
de hierro (II) forma también el radical $\cdot\text{OH}$, reacción observada por Fenton en 1894 (217):



Trazas de Fe^{3+} pueden reaccionar con H_2O_2 :

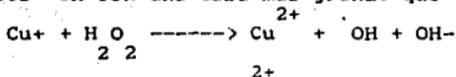


Y más reacciones son posibles:



Una mezcla simple de una sal de hierro y H_2O_2 pueden provocar una serie de reacciones de radicales.

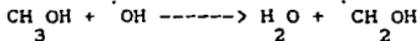
Las sales de cobre (I) reaccionan con H_2O_2 para formar radicales $\cdot\text{OH}$ con una tasa más grande que las sales de Fe^{2+} :



Aunque los iones de Mn^{2+} están presentes en algunas células animales (218) y bacterias (219.) ha sido imposible demostrar la generación de radicales $\cdot\text{OH}$ dependiente de Mn^{2+} (220).

Los radicales hidroxilo reaccionan con tasas extremadamente altas con casi todo tipo de molécula encontrada en las células vivientes: azúcares, aminoácidos, fosfolípidos, bases de DNA y ácidos orgánicos. Estas reacciones son de tres tipos (221):

i) Abstracción de un átomo de hidrógeno, por ejemplo en el metanol:



ii) Adición, por ejemplo puede añadirse en una estructura aromática como las bases purina y pirimidina del DNA.

iii) Transferencia de un electrón, por ejemplo con ión Cl^- :



La reactividad de los radicales $\cdot\text{OH}$ es tan grande que, si son formados en los sistemas vivos, pueden reaccionar inmediatamente con cualquier molécula biológica dentro de su vecindad, produciendo radicales secundarios de reactividad variable.

Tanto el H_2O_2 como las sales de Cu (I) y/o Fe (II) están disponibles in vivo, por lo que pueden formarse radicales $\cdot\text{OH}$.

Las reacciones destructivas de los radicales en las células están dirigidas hacia los ácidos grasos poliinsaturados, porque éstos son más susceptibles al ataque por los radicales libres.

II.8.6. Participación de los metales de transición en la peroxidación de lípidos

La peroxidación de lípidos es un proceso que permite la formación y ataque de los radicales libres a los lípidos de la membrana celular, debido a la asimilación del oxígeno y el rearreglo de sus dobles enlaces, trayendo como consecuencia la destrucción celular.

Todos los metales de transición son radicales libres por tener varios electrones desapareados en la capa D. Algunos de los metales, en particular el Mn , el Cu y el Zn , parecen participar en el mantenimiento del status redox de las neuronas centrales a través de las enzimas detoxificantes superóxido dismutasa y

catalasa. El manganeso (II+) es antiperoxidante in vitro (222) e in vivo (11). En forma de Mn (III+) en cambio, es pro-oxidante (223). El Fe (II+ y III+) ya sea en forma libre o formando compuestos (con el grupo hemo por ejemplo), es promotor de radicales libres a través de la reacción de Fenton. La superóxido dismutasa Cu-Zn es la cuproenzima más importante de el cerebro. Se ha calculado que aproximadamente el 25% del cobre cerebral se encuentra asociado a esta enzima(128). Por otro lado la deficiencia de zinc en las ratas induce un incremento significativo en el malondialdehido cerebral, índice de peroxidación de lípidos. Todos estos resultados podrían estar indicando una estrecha relación entre los metales Mn, Cu y Zn, la peroxidación de lípidos y la composición lipídica de membranas neuronales.

III OBJETIVOS

- 1) Determinar las concentraciones de manganeso, cobre y plomo regional en ratones tratados con MPTP.
- 2) Evaluar la acción neurotóxica de la MPTP in vivo en diferentes regiones del cerebro del ratón.
- 3) Analizar las concentraciones de dopamina en cuerpo estriado y mesencéfalo del ratón, después de la administración de MPTP.

IV HIPOTESIS.

- 1) La muerte celular inducida por la administración de la MPTP en diferentes regiones cerebrales del ratón (cuerpo estriado, mesencéfalo, corteza frontal y cerebelo), influirá sobre los niveles de Mn y Cu, no así en el contenido de Pb.
- 2) La MPTP induce daño celular en el cuerpo estriado y en el mesencéfalo de ratón, pero no en la corteza frontal y en el cerebelo.
- 3) La muerte de las células del cuerpo estriado y mesencéfalo, se reflejará como una disminución en el contenido de dopamina en las dos regiones.

V MATERIAL Y METODOS.

V.1. Material

V.1.1. Reactivos

- MPTP HCl. Research Biochemicals (Wayland, M A).
- Solución fisiológica salina 0.9% (NaCl) de Lab. Pisa.
- Acido nitrico suprapur (HNO₃) de Merck.
- H₂O desionizada₂
- Gas nitrógeno
- Octilfenoxipolietoxietano (Tritón X 100) de Sigma.
- Estándar de Mn de Titrisol Merck.
- Estándar de Cu de Titrisol Merck.
- Estándar de Pb de Titrisol Merck.
- Nitrito de sodio (NaNO₂) de Merck
- Fosfato dibásico de amonio ((NH₄)₂HPO₄) de Merck.
- Potasio dihidrógeno fosfato (KH₂PO₄) de Merck.
- Octil sulfato de sodio (SOS) de Sigma.
- Sal disódica (EDTA) de Productos Químicos Monterrey.
- Acido orto-fosforico (H₃PO₄) de Merck.
- Metanol para cromatografía (CH₃OH) de J.T. Baker Analyzed₃
- Acido perclorico (HClO₄) de Merck.₄
- Solución stock de bitartrato de Noradrenalina (C₁₂H₁₇NO₉) de Merck.₂

- Solución stock de dopamina [3- hidroxitiramina (C H NO
8 11 2
.HCl)] de Sigma.
- Solución stock de serotonina (5-hidroxitriptamina) de Sigma.
- Solución stock de 5-HIAA [ácido 5-hidroxi-indol-3-acético (C H NO)] de Sigma
10 9 3
- Solución stock de HVA [ácido 4-hidroxi-3-metoxi-fenil-acético (C H O)] de Sigma.
9 10 4
- Solución stock de DOPAC [ácido 3,4-dihidroxi-fenil-acético (C H O)] de Sigma.
8 8 4
- Metabisulfito (Na S O) de Aldrich Chemical Company.
2 2 5

V.1.2. Equipo e instrumentos

- Espectrofotómetro de absorción atómica Perkin-Elmer modelo 360 con horno de grafito P-E HGA-2200
- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (Perkin-Elmer) con detector electroquímico (Metrohm).
- Balanza analítica (Bosch modelo S 2000)
- Balanza granataria (Sartorius)
- Baño de agitación (Lab-Line Instrumentals)
- Lámpara de cátodo hueco de Cu de Perkin-Elmer
- Lámpara de cátodo hueco de Mn de Perkin-Elmer
- Lámpara de cátodo hueco de Pb de Buck Scientific
- Centrifuga (Beckman modelo J-21 C)
- pHmetro (Internacional Científica)

- Tubos de grafito
- Micropipetas de 20, 200, 1000 y 5000 ul
- Taladro para homogenizar (Black & Decker)
- Tubo homogenizador (Thomas)
- Tubos de ensayo de polipropileno
- Jeringas de 1 ml (Plastipak)
- Estuche de disección
- Puntas para micropipetas

V.2. Metodología

V.2.1. Experimentos de Parkinson inducido con MPTP

Se utilizaron ratones machos cepa NIH de 25-30 gr de peso para todos los experimentos.

Un total de 52 ratones fueron divididos en 4 lotes para su posterior tratamiento. El primer lote quedó integrado por 14 animales, que fueron inyectados intraperitonealmente (i.p.) con solución salina durante tres días, constituyendo de esta forma el grupo control. El segundo lote lo formaron 14 ratones, que fueron inyectados con MPTP (30 mg/Kg) vía intraperitoneal durante 3 días. El lote 3 quedó conformado por 10 ratones inyectados i. p. con solución salina durante 5 días. El lote 4 incluía 14 ratones inyectados con (30mg/kg) MPTP vía intraperitoneal durante 5 días.

Siete días después de la última administración, todos los animales fueron sacrificados por dislocación y posteriormente decapitados, para ser removido y disecado el cerebro en las regiones de interés: cerebelo, corteza frontal, mesencéfalo y cuerpo estriado, de acuerdo a la técnica descrita por Glowinski e Iversen (224).

Es importante señalar que previamente a la disección se colocaron los instrumentos de disección en ácido nítrico suprapur al 10%, durante 15 minutos, para eliminar cualquier fuente de contaminación externa; enjuagándolos posteriormente con agua desionizada; asimismo al término de la disección de una región y al comienzo de la otra, fué necesario enjuagar de la misma forma los instrumentos para evitar la contaminación cruzada.

Cada una de las regiones disecadas fueron colocadas en tubos de ensayo previamente pesados. y estos a su vez se encontraban en hielo para ser pesados nuevamente ya con el tejido cerebral. Al tejido se le adicionaron 0.5 ml de ácido nítrico suprapur y se sometieron a digestión en baño de agitación a una temperatura de 65 °C durante 30 minutos. Finalmente se guardaron a 5 °C hasta el momento de ser analizadas.

V.2.2 Determinación de metales por espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito

Las muestras digeridas de cada una de las regiones de interés: corteza frontal, cerebelo, mesencéfalo y cuerpo estriado, fueron utilizadas para evaluar las concentraciones de tres diferentes metales como son el manganeso (Mn), el cobre (Cu), y el plomo (Pb), por espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito, ajustando las condiciones de trabajo para cada uno de los metales, tal como se muestra a continuación:

CONDICIONES	MANGANESO	COBRE	PLOMO
Longitud de onda (nm)	279.5	324.7	283.3
Apertura del slit	0.7	0.7	0.7
Corriente de la lámpara (mA)	25.0	20.0	15.0
Flujo de gas	30.0	30.0	20.0
Temperatura de secado (°C)	100.0	100.0	100.0
Temperatura de calcinado (°C)	1000.0	900.0	750.0
Temperatura de atomización (°C)	2500.0	2700.0	2500.0
Tiempo de secado (seg)	30.0	30.0	30.0
Tiempo de calcinado (seg)	30.0	40.0	40.0
Tiempo de atomización (seg)	4.0	5.0	5.0

Una vez ajustadas las condiciones de trabajo se procedió a hacer una solución modificadora de matriz, la cual fué utilizada para obtener los estándares de la curva de calibración, así como la dilución adecuada de la muestra.

En la siguiente tabla se detallan los procedimientos para la dilución de las muestras y los estandares:

	MANGANESO	COBRE	PLOMO
MODIFICADOR DE MATRIZ	100 ml de tritón X 100 + 1 gr de fosfato de amonio	1000 ml de tritón X 100 + 11.5 ml de ácido nítrico suprapur + 10 gr de nitrito de sodio	1000 ml de tritón X 100 + 2 gr de fosfato dibásico de amonio + 2 ml de HNO ₃ suprapur.
ESTANDAR	0.5 ml del estandar de 50 ppm se aforan a 50 ml con agua desionizada para tener un estandar de 0.5 ppm.	0.5 ml del estandar de 50 ppm se aforan a 25 ml con agua desionizada para tener un estandar de 1 ppm.	1.5 ml del estandar de 10 ppm se aforan a 25 ml con agua desionizada para tener un estandar de 1 ppm.
	Adición de estandares	Externa	Externa
TIPO DE CURVA DE CALIBRACION	450 ul del modificador de matriz + 50 ul de la muestra de interés + 10, 20, y 30 ul del estandar de Mn de 0.5 ppm.	1000 ul del modificador de matriz + 20, 40, 60 y 80 ul del estandar de Cu de 1 ppm.	500 ul del modificador de matriz + 200, 500, 1000, 2000 y 3000 ul del estandar de Pb de 1 ppm.
DILUCION DE LA MUESTRA	450 ul del modificador de matriz + 50 ul de la muestra (1:10)	950 ul del modificador de matriz + 50 ul de la muestra (1:20)	450 ul del modificador de matriz + 50 ul de la muestra (1:10)

Teniendo las condiciones de trabajo y la dilución de la muestra para cada uno de los metales: se inyectaron 20 ul de la muestra al tubo de grafito del espectrofotómetro, y se corrió el programa automático en el equipo.

Los resultados se expresaron en ug del metal por gramo de tejido húmedo.

V.2.3. Experimentos para la determinación de dopamina después de la administración de la MPTP

Se usaron treinta ratones macho de la cepa NIH (25-30 gr) para estos experimentos. Nueve de ellos fueron inyectados intraperitonealmente (i.p) con MPTP (30 mg/Kg) durante 3 días. Los siguientes seis ratones fueron inyectados de la misma manera pero con solución salina y de esta manera fueron tomados como grupo control. El tercer lote quedó constituido por nueve ratones, inyectados con 30 mg/kg de MPTP via intraperitoneal durante 5 días. El último lote lo integraron 6 ratones, que fueron inyectados con solución salina i.p. durante 5 días y sirvieron como grupo control.

Todos los animales se sacrificaron por dislocación 7 días después de la última administración de MPTP. se les removi6 el cerebro y se disecaron 2 regiones de interés: mesencéfalo y cuerpo estriado de acuerdo a lo descrito por Glowinski e Iversen (224). Posteriormente, ambas regiones fueron colocadas en tubos previamente pesados y contenidos en hielo. y se les adicionaron 0.5 ml de una solución antioxidante de ácido perclórico y metabisulfito 0.1% (HClO₄ .Na₂SO₃).

El tejido se homogenizó y las muestras se centrifugaron durante 10 min. a 12,000 rpm., recuperándose el sobrenadante en tubos de plástico forrados de papel aluminio para evitar la

degradación de las catecolaminas por la luz y de esta manera ser guardadas dentro del congelador hasta el momento de ser analizadas por cromatografía de líquidos de alta resolución.

V.2.4. Determinación de dopamina por cromatografía de líquidos de alta resolución con detección electroquímica

Las condiciones de trabajo para la determinación de las catecolaminas fueron las siguientes:

SOLUCION	FORMA DE PREPARARSE
FASE MOVIL	Para 2 litros: 8 g de KH_2PO_4 + 900 mg de Na_2SO_4 + 320 mg de EDTA, se disolvieron en 500 ml de agua, ajustando el pH en 3.1 con H_3PO_4 , se aforó a 1700 ml y finalmente se agregaron 300 ml de metanol grado cromatográfico.
SOLUCION	Se tomaron 1.72 ml de HClO_4 (concentrado)
ANTIOXIDANTE	+ 0.1 g de Na_2SO_3 y se aforó a 100 ml.

SOLUCIONES STOCK PARA CATECOLAMINAS

NORADRENALINA	Se pesaron 18.9 mg de bitartrato de nora-drenalina y se aforó a 100 ml con solu-ción HClO_4 - Na_2SO_3 .
DOPAMINA	Se pesaron 11.9 mg de dopamina-HCl y se aforó a 100 ml con HClO_4 - Na_2SO_3 .
SEROTONINA	Se pesaron 12 mg de serotonina-HCl y se aforó a 100 ml con HClO_4 - Na_2SO_3 .
5-HIAA	Se pesaron 12 mg de ácido libre y se aforó a 100 ml con HClO_4 - Na_2SO_3 .
HVA	Se pesaron 10 mg de ácido libre y se aforó a 100 ml con HClO_4 - Na_2SO_3 .
DOPAC	Se pesaron 10 mg de ácido libre y se aforó a 100 ml con HClO_4 - Na_2SO_3 .
MHPG	Se pesaron 20 mg del alcohol en forma de piperazina y se aforó a 100 ml con HClO_4 - Na_2SO_3 .

La curva de calibración se preparó utilizando 4 estándares de diferente concentración (conocida) como a continuación se muestra:

ESTANDAR	FORMA DE PREPARARSE
100	Se tomaron 100 ul de cada una de las soluciones stock para catecolaminas y se aforó a 250 ml con agua desionizada.
200	Se tomaron 200 ul de cada una de las soluciones stock para catecolaminas y se aforó a 250 ml con agua desionizada.
400	Se tomaron 400 ul de cada una de las soluciones stock para catecolaminas y se aforó a 250 ml con agua desionizada.
800	Se tomaron 800ul de cada una de las soluciones stock para catecolaminas y se aforó a 250 ml con agua desionizada.

Posteriormente se inyectaron 20 ul de cada estandar en el cromatógrafo y se analizaron las muestras.

Las muestras de cada una de las regiones de interés fueron descongeladas y filtradas en filtro millipore de 0.45 um de tamaño de poro, colectando la muestra en tubos protegidos de la luz y contenidos en hielo, hasta el momento de ser inyectada al cromatógrafo, para de esta manera evaluar las concentraciones de DA y HVA en dichas regiones, de acuerdo a lo descrito por Diggory y Buckett (225). Los resultados fueron expresados como ug de catecolamina por gramo de tejido húmedo.

VI RESULTADOS

Los resultados que a continuación se muestran fueron obtenidos utilizando el análisis estadístico. Este tiene como objetivo organizar y resumir la información proporcionada por los datos, así como encontrar las relaciones entre las variables que intervienen en el estudio.

Con el fin de investigar si existen diferencias en cuanto a los niveles de manganeso, cobre y plomo en los animales tratados y los no tratados, se decidió realizar un análisis de varianza para cada metal.

El análisis de varianza es una técnica estadística que permite probar la existencia de diferencias entre las medias de varias poblaciones a partir de los datos de las muestras. En términos estadísticos, se pretende probar hipótesis de nulidad de la forma: $H_0 : \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_k$, contra la hipótesis alternativa de que al menos una media poblacional μ_i es diferente, existiendo K medias poblacionales sujetas a comparación.

En el caso de que K sea igual a 2, el análisis de varianza se convierte en una prueba de t de Student, útil para realizar la comparación entre dos medias.

El contenido de manganeso en las regiones cerebrales de ratones tratados durante 3 días, se muestra en la figura V. El contenido de Mn en el cuerpo estriado de los animales tratados con MPTP indica una disminución de un 9.43%, no siendo estadísticamente significativa al ser comparada con el grupo control. Tampoco se observaron cambios significativos en las regiones restantes.

Contenido de manganeso en regiones del cerebro

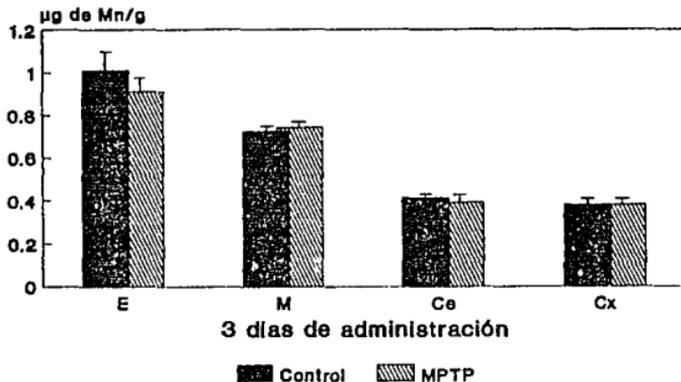


Figura V. Contenido de manganeso en regiones cerebrales de ratones sacrificados 7 días después de la última de 3 administraciones diarias de MPTP (30 mg/kg). Los resultados son expresados como el promedio \pm error estándar de $n = 7-14$ experimentos independientes. E= cuerpo estriado, M= mesencéfalo, Ce= cerebelo, Cx= corteza frontal.

En la figura VI se muestran los cambios observados en el contenido de manganeso en el cuerpo estriado y cerebelo en el grupo de ratones tratados durante 5 días con MPTP. Se encontró una disminución del 19.46% en el contenido de manganeso estriatal, y en el cerebelo un aumento del 15.32%, siendo ambos cambios estadísticamente significativos. No se registraron cambios en el contenido de Mn en las demás regiones.

Contenido de manganeso en regiones del cerebro

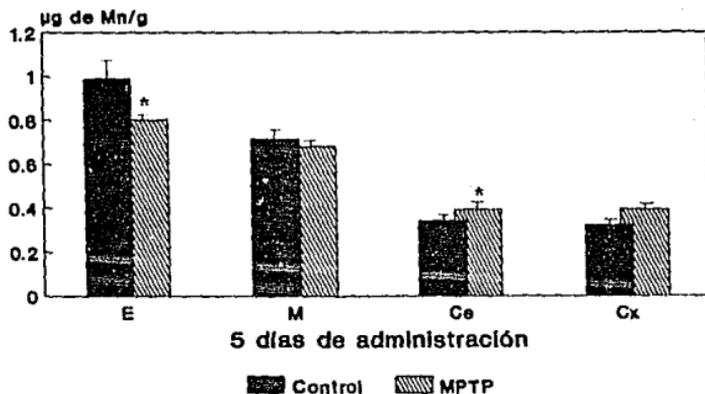


Figura VI. Contenido de manganeso en regiones cerebrales de ratones sacrificados 7 días después de la última de 5 administraciones diarias de MPTP (30 mg/kg). Los resultados son expresados como el promedio +/- error estándar de n= 7-14 experimentos independientes. E= cuerpo estriado, M= mesencéfalo, Ce= cerebelo, Cx= corteza frontal. * p < 0.05 t de student.

El contenido de cobre en las regiones cerebrales de ratones tratados, con 3 días de tratamiento con la MPTP se muestra en la figura VII. El contenido de cobre estriatal presentó una disminución de un 17.31%, siendo estadísticamente significativa, al comparar con el grupo control. No se observó cambios significativos en las demás regiones.

Contenido de cobre en regiones del cerebro

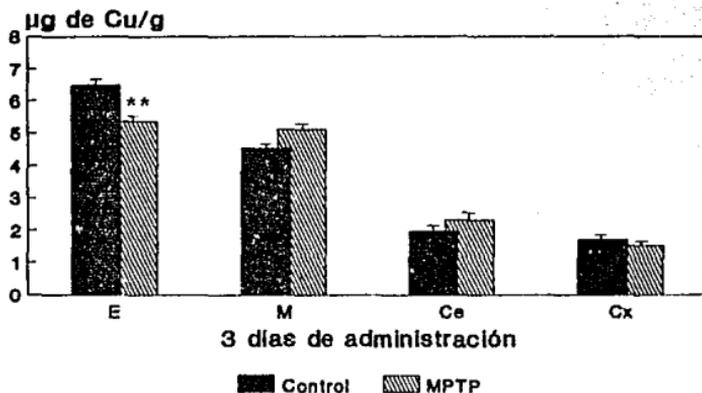


Figura VII. Contenido de cobre en regiones cerebrales de ratones sacrificados 7 días después de la última de 3 administraciones diarias de MPTP (30 mg/kg). Los resultados son expresados como el promedio \pm error estándar de $n = 6-12$ experimentos independientes. E= cuerpo estriado, M= mesencéfalo, Ce= cerebelo, Cx= corteza frontal. ** $p < 0.01$ t de student.

La figura VIII muestra los cambios observados en el contenido de cobre en el cuerpo estriado y mesencéfalo en el grupo de ratones tratados durante 5 días con MPTP. Se encontró una disminución del 51.26% en el contenido de cobre estriatal, y en el mesencéfalo un decremento del 42.88%, siendo ambas estadísticamente significativas con respecto al grupo control. No se registraron cambios en las demás regiones.

Contenido de cobre en regiones del cerebro

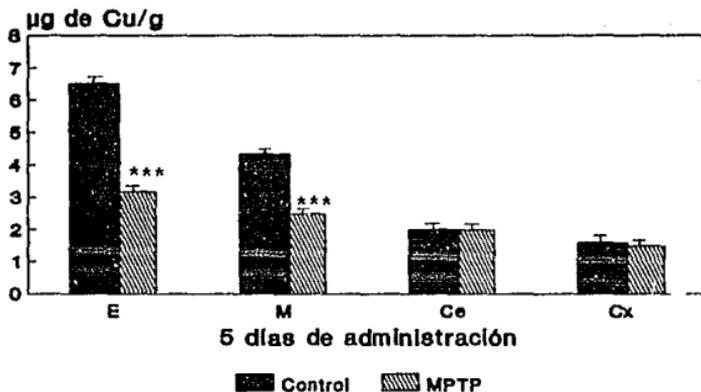


Figura VIII. Contenido de cobre en regiones cerebrales de ratones sacrificados 7 días después de la última de 5 administraciones diarias de MPTP (30 mg/kg). Los resultados son expresados como el promedio \pm error estándar de $n = 6-12$ experimentos independientes. E= cuerpo estriado, M= mesencéfalo, Ce= cerebelo, Cx= corteza frontal. *** $p < 0.001$ t de student.

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

El contenido de plomo en las regiones cerebrales de ratones tratados durante 3 días se muestra en la figura IX. El contenido de Pb en ninguna de las regiones de interés muestra cambios significativos con respecto al grupo control.

Contenido de plomo en regiones del cerebro

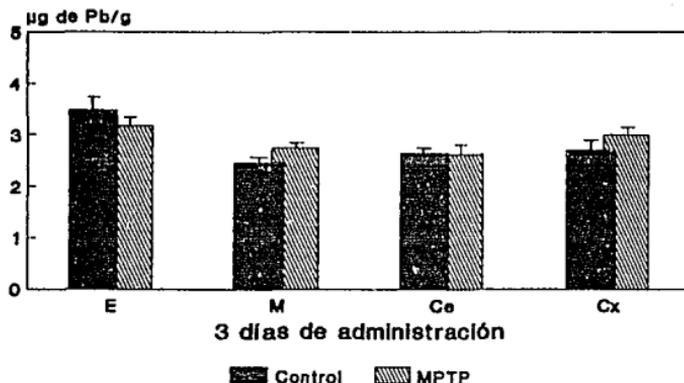


Figura IX Contenido de plomo en regiones cerebrales de ratones sacrificados 7 días después de la última de 3 administraciones diarias de MPTP (30 mg/kg). Los resultados son expresados como el promedio \pm error estándar de $n=6-10$ experimentos independientes. E= cuerpo estriado, M= mesencefalo, Ce= cerebelo, Cx= corteza frontal.

En la figura X se muestra el contenido de plomo en las regiones cerebrales de ratones con 5 administraciones de MPTP. Como se puede observar ninguna de las regiones analizadas muestran cambios con importancia significativa con respecto al grupo control.

Contenido de plomo en regiones del cerebro

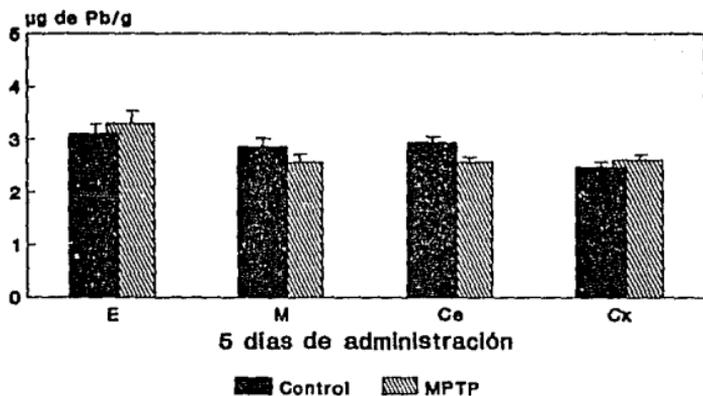


Figura X contenido de plomo en regiones cerebrales de ratones sacrificados 7 días después de la última de 5 administraciones diarias de MPTP (30 mg/kg). Los resultados son expresados como el error estándar de n= 6-12 experimentos independientes. E= cuerpo estriado, M= mesencéfalo, Ce= cerebelo, Cx= corteza frontal.

El contenido de DA estriatal, se encontró disminuido en un 53.4% y un 73.8% respectivamente en los grupos de animales tratados por 3 y 5 días con MPTP (Tabla 6), respecto a los grupos control, lo cual indica la acción neurotóxica de la MPTP.

TABLA 6. CONTENIDO DE DOPAMINA EN CUERPO ESTRIADO

	Control	MPTP
3 días	5.7 ± 0.9	7.3 ± 1.0**
5 días	17.6 ± 1.8	4.6 ± 0.3**

Tabla 6. Los resultados son expresados como el promedio +/- el error estándar de n= 6 experimentos independientes; las unidades utilizadas son ug de DA/ g de tejido humedo. ** p < 0.01 t de student.

Finalmente el contenido de DA en mesencéfalo, indica una disminución del 28.6% y del 22.9%, respectivamente en los grupos de animales tratados con MPTP por 3 y 5 días (Tabla 7), con respecto a los grupos control, no siendo estadísticamente significativos.

TABLA 7. CONTENIDO DE DOPAMINA EN MESENFALO

	Control	MPTP
3 días	0.31 ± 0.04	0.22 ± 0.03
5 días	0.30 ± 0.04	0.23 ± 0.01

Tabla 7. Los resultados son expresados como el promedio ± el error estándar de n= 6 experimentos independientes; las unidades utilizadas son ug de DA/ g de tejido húmedo.

VII DISCUSION

Los resultados obtenidos para el caso del Pb sólo han sido utilizados como grupo control, ya que como sabemos el plomo no juega ningún papel en el metabolismo celular, comparado con los elementos traza esenciales analizados como son el Mn y el Cu. Por lo tanto, el plomo fué un elemento analizado con la finalidad de hacer evidente que los cambios en el contenido de Cu y Mn en las diferentes regiones cerebrales, en caso de que se presentaran, no fueron un efecto inespecifico sobre los metales.

Los resultados mostrados sugieren que la disminución en las concentraciones de Mn en el cuerpo estriado pueden ser debidas a al daño celular de las neuronas dopaminérgicas inducida por la MPTP, debido a que las terminales dopaminérgicas en estriado son capaces de captar y liberar Mn (226). Después del daño celular es posible que el Mn quede libre en el líquido cefalorraquídeo y disponible para ser recapturado por otro tipo de células, en este caso podemos suponer que el metal es retomado por el cerebelo. Esto debe permanecer como una especulación hasta que no haya resultados al respecto. Si realmente ocurriera de esta manera, es válido suponer que la disminución de Mn puede ser tomada como un índice bioquímico de daño neuronal de las células del cuerpo estriado, ya que en este trabajo no se utilizó una técnica directa para cuantificar el daño o la muerte celular.

Otro factor importante para el efecto biológico del Mn, es el estado de oxidación en el cual está presente el metal, ya que en la literatura se reporta que el Mn^{3+} incrementa la producción de radicales libres (144) y el Mn^{2+} es reportado como antioxidante (11). Ésto es de suma importancia ya que los radicales libres generados por MPP+ y MPTP, pueden atacar las membranas lipídicas y llevar como consecuencia a la muerte celular (113). Es importante aclarar que los resultados que aquí se muestran sólo incluyen el contenido total de Mn.

Por otra parte, el contenido de cobre en el cuerpo estriado se encontró disminuido por la acción neurotóxica de la droga. Este efecto podría ser también explicado por el daño de las neuronas dopaminérgicas inducida por la MPTP.

Se ha reportado que un incremento en el contenido cerebral de cobre produce una hiperactividad dopaminérgica (227). El hallazgo del presente trabajo, por tanto es importante pues concuerda con lo reportado en la literatura, ya que es consistente con una relación directa entre el contenido de DA y el contenido de Cu en el cerebro.

Por otra parte se ha reportado que la administración de dietilditiocarbamato, un quelante de Mn y Cu, e inhibidor de la enzima Cu-Zn SOD, potencia los efectos neurotóxicos de la MPTP y su metabolito el ión MPP+ en el ratón (111). Estos resultados permiten pensar que la participación de estos metales en la generación de los mecanismos de daño neuronal por MPTP, puede estar relacionada con la acción redox de Mn y Cu.

Se ha descrito que una gran cantidad del cobre total celular se encuentra en la mitocondria. Cuando se presenta una deficiencia en los niveles de cobre se observan anomalías en el proceso de la fosforilación oxidativa (228): se encontró una alteración en la oxidación de glutamato pero no de succinato, este defecto fue específico del sitio I de la cadena respiratoria (229), y puede ser motivo del daño celular.

De todo lo anterior podemos rescatar un aspecto de suma importancia, como lo es observar que si hay una disminución en el contenido de Mn y Cu grupos prostéticos de las isoenzimas superóxido dismutasa, la neurona puede carecer de los mecanismos necesarios para la detoxificación del tejido cerebral en contra de los radicales libres. Una evidencia reciente a favor de esta suposición ha sido publicada y hace notar la importancia del Zn, (otro metal traza cofactor de las enzimas ya mencionadas) que se encuentra disminuido en un 50% después de la administración intraestriatal de 6-OH-DA, la otra toxina que destruye al sistema nigroestriatal descrita en los antecedentes (90).

Por otra parte, al evaluar la acción neurotóxica de la MPTP sobre las concentraciones de DA, encontramos que este neurotransmisor se encuentra disminuido, siendo esta disminución un indicador bioquímico que permite comprobar el daño neuronal específico de las neuronas productoras de dicha catecolamina, bajo las condiciones de nuestros experimentos.

Han sido muchos los intentos por explicar la posible causa de la enfermedad de Parkinson idiopática, sin hasta el momento encontrar una respuesta satisfactoria. No obstante, el presente trabajo aporta evidencias indirectas a favor del papel potencial de los radicales libres y la participación de los metales de transición en el proceso degenerativo que ocurre en la enfermedad de Parkinson.

VIII CONCLUSIONES

1) Las concentraciones de Mn estriatal fueron disminuidas por la acción neurotóxica de la MPTP. Este efecto puede ser el resultado del daño neuronal inducido por la droga, ya que las terminales sinápticas dopaminérgicas en el estriado son capaces de capturar y liberar Mn. Si realmente ocurriera de esta manera es válido suponer que la disminución de Mn puede ser tomada como un índice bioquímico de daño neuronal de las células del cuerpo estriado.

2) El contenido de cobre en el cuerpo estriado se encontró disminuido por la acción neurotóxica de la droga. Este efecto puede ser explicado también por la muerte de las neuronas dopaminérgicas inducidas por la MPTP.

3) Se ha reportado que un incremento en el contenido cerebral de cobre produce hiperactividad dopaminérgica. Por lo tanto este trabajo concuerda con lo reportado en la literatura, ya que es consistente con una relación directa entre el contenido de DA y el contenido de Cu en el cerebro.

4) Se sugiere que cuando hay una disminución en el contenido de Mn y Cu, grupos prostéticos de las isoenzimas superóxido dismutasa, la neurona puede carecer de los mecanismos necesarios para la detoxificación del tejido cerebral en contra de los radicales libres.

5) Las concentraciones de DA se encuentran disminuidas debido al daño neuronal específico de las células productoras de dicho neurotransmisor.

6) Son necesarios posteriores experimentos para aclarar el posible papel del Mn y del Cu en la neurotoxicidad inducida por la MPTP.

IX REFERENCIAS

- 1) Langston, J. W.; Ballard, P.; Tetrud, J. W. and Irwin, I. (1983). Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*. 219: 979-980.
- 2) Davis, G. C.; Williams, A. C.; Markey, S. P.; Ebert, M. H.; Caine, E. D.; Reichert, C. M. and Kopin, I. J. 1979. Chronic parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry Res.* 1: 249-254.
- 3) Langston, J. W.; Forno, L. S.; Rebert, C.S. and Irwin, I. (1984). Selective nigral toxicity after systemic administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the squirrel monkey. *Brain Res.* 292: 390-394.
- 4) Burns, R.S.; Chiueh, C.C.; Markey, S.P.; Eberth, M.E.; Jacobowitz, D.M. and Kopin, I.J. 1983. A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80: 4546-4550.
- 5) Langston, J. W.; Irwin, I.; Langston, E. B. and Forno, L. S. (1984). Pargyline prevents MPTP-induced parkinsonism in primates. *Science*. 225: 1480-1482.
- 6) Schultz, W., Studer, A., Jonsson, G., Sundstrom, E. and Mefford, I. (1985). Deficits in behavioral initiation and execution processes in monkeys with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinsonism. *Neurosci. Lett.* 59: 225-232.

7) Markey, S. P., Castagnoli, N. Jr., Trevor, A. J. and Kopin, I. J. 1986. (Eds) MPTP: a neurotoxin producing a parkinsonian syndrome. Academic Press New York.

8) Markey, S. P., Johannessen, J. N., Chiueh, C. C., Burns, R.S. and Herkenham, M. A. 1984. Intra-neuronal generation of a pyridinium metabolite may cause drug-induced parkinsonism. *Nature*. 311: 464-467.

9) Pileblad, E. and Carlsson, A. 1985. Catecholamine-uptake inhibitors prevent the neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in mouse brain. *Neuropharmacol.* 24: 689-692.

10) Ferraz, H. B., Bertolucci, P. H. F., Pereira, J.S., Lima, J. G. C. and Andrade, L. A. F. (1988). Chronic exposure to the fungicide maneb may produce symptoms and signs of CNS manganese intoxication. *Neurology*. 38: 550-553.

11) Donaldson, J., McGregor, D. and LaBella, F. 1982. Manganese neurotoxicity: a model for free radical mediated neurodegeneration? *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 60: 1398-1405.

12) Danks, D. M. 1983. Hereditary disorders of copper metabolism in Wilson's disease and Menke's disease. In: *The Metabolic Basis of Inherited Disease* (5th ed.), edited by Stanbury, J. B., Wyngaarden, J. B., Fredrickson, D. S., Goldstein, J. L. and Brown, M. S. New York: McGraw-Hill. 1251-1268.

13) Danks, D. M., Campbell, P. E., Walker-Smith, J., Stevens, B.J., Gillespie, J. M., Bloomfield, J. and Turner, B. 1972. Menke's Kinky-hair syndrome. *Lancet* 1: 1100-1103.

14) Carpenter, M. B. 1986. Anatomy of the basal ganglia. In: *Handbook of Clinical Neurology*. 49: 1-18. Vinken, P.J. et al. (Eds.) Elsevier Science Publishers CO.

15) Cools, A. R. 1986. Clinical Neuropharmacology of the basal ganglia. In: *Handbook of Clinical Neurology*. 49: 47-63. Vonken, P. J. et al. (Eds.) Elsevier Science Publishers Co.

16) Roger, N. and Rosenberg, M. D. 1983. The Clinical Neurosciences. *Neuropathology*. New York, pp. 443-72.

17) Goetz, C.G., Lutge, W., Tanner, C. M. (1986). Autonomic dysfunction in Parkinson's disease. *Neurology*. 36: 73-75.

18) Lang, A. E. and Johnson, K. 1987. Akathisia in idiopathic Parkinson's disease. *Neurology*. 37: 477-481.

19) Quinn, N. P., Lang, A. E., Koller, W. C. and Marsden, C. D. (1986). Painful Parkinson's disease. *Lancet* 1: 1366-1369.

20) Koller, W. C. (1984). Sensory symptoms in Parkinson's disease. *Neurology*. 34: 957-959.

21) Ward, C., Duvoisin, R. C., Ince, S., Nutt, J. D. F., Eldridge, R. and Calne, D. B. 1983. Parkinson's disease in 65 twins and a set of quadruplets. *Neurology*. 33: 815-824.

22) Kidron, P. and Melamed, E. (1987). Forms of dystonia in patients with Parkinson's disease. *Neurology*. 37: 1009-1011.

23) Nausieda, P. A., Weiner, W. J., Klawans, H. L. (1980). Dystonic foot response of parkinsonism. *Arch. Neurol.* 37: 136.

- 24) Schwab, R. S. (1960). Progression and prognosis of Parkinson's disease. *J. Nervous & Mental disease.* 130: 556-566.
- 25) Carlsson, A., Lindqvist and Magnusson, T. 1957. 3,4-dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. *Nature.* 180: 1200.
- 26) Brimblecombe, R. W. and Pinder, R. M. 1972. Tremors and tremorogenic agents. *Scientifica, Bristol.*
- 27) Everett, G. M. 1964. Animal and clinical techniques for evaluating antiparkinson agents. In: *Animal and clinical pharmacologic techniques in drug evaluation.* Eds. Nodine, J. H. and Siegler, P. E. Year Book Medical Publ., Chicago. 359-468.
- 28) Ahmed, A. and Marshall, P. B. 1962. Relationship between anti-acetylcholine and anti-tremorine activity in antiparkinsonian and related drugs. *Brit. J. Pharmacol.* 18: 247-254.
- 29) Duvoisin, R. C. 1976. Parkinsonism: animal analogues of the human disorder. In: *The basal ganglia.* Ed.: M. D. Yahr. Raven Press. New York. 293-303.
- 30) Zetler, G. 1968. Cataleptic state and hypothermia in mice, caused by central cholinergic stimulation and antagonized by anticholinergic and antidepressant drugs. *Int. J. Neuropharmacol.* 7: 325-335.
- 31) Poirier, L. J., Sourkes, T. L., Bouvier, G., Boucher, R. and Carabin, S. 1966. Striatal amines, experimental tremor and the effect of harmaline in the monkey. *Brain.* 89: 37-52.

32) Pêchadre, J. C., Larochele, L. and Poirier, L. J. 1976. Parkinsonian akinesia, rigidity and tremor in the monkey. *J. Neurol. Sci.* 28: 147-157.

33) Goldstein, M., Battista, A. F., Lieberman, A., Lew, J. Y. and Hata, F. 1977. The use of animal model for parkinsonism and its extension to human parkinsonism. In: *Animal models in psychiatry and neurology*. Eds.: Hanin, I. and Usdin, E. Pergamon Press, Oxford. 331-337.

34) Andén, N. E., Dahlstrom, A., Fuxe, K., Larsson, K. 1966. Functional role of the nigrostriatal dopamine neurons. *Acta pharmacol et toxicol.* 24: 263-274.

35) Ungerstedt, U., Avemo, A., Avemo, E., Ljungberg, T. and Ranje, C. 1973. Animal models of parkinsonism. *Adv. Neurol.* 3: 257-271.

36) Hornykiewicz, O. 1966. Dopamine (3-hydroxytyramine) and brain function. *Pharmacol. Rev.* 18: 925-964.

37) Bürki, H. R. 1979. Extrapyramidal side-effects. *Pharmacol. Therap.* 5: 525-534.

38) Sachs, C. and Jonsson, G. 1975. Mechanism of action of 6-hydroxydopamine. *Biochem. Pharmacol.* 24: 1-8.

39) Ungerstedt, U. 1971 a. Adipsia and aphagia after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta Physiol. Scand.* (suppl. 367) 82: 95-122.

40) Ungerstedt, U. 1971 b. Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta Physiol. Scand.* (suppl. 367) 82: 69-93.

41) Fuxe, K. and Ungerstedt, U. 1976. Antiparkinsonian drugs and dopaminergic neostriatal mechanism: studies in rats with unilateral 6-hydroxydopamine (6-OH-DA) induced degeneration of the nigro-neostriatal DA pathway and quantitative recording of rotational behaviour. *Pharmacol. Therap. B.* 2: 41-47.

42) Poirier, L. J., Langelier, P., Roberge, A., Boucher, R. and Kitsikisi, A. 1972. Non-specific histopathological changes induced by the intracerebral injection of 6-hydroxydopamine (6-OH-DA). *J. Neurol. Sci.* 16: 401-416.

43) Butcher, L. L., Eastgate, S. M., and Hodge, G. K., 1974. Evidence that pinctate intracerebral administration of 6-hydroxydopamine fails to produce selective neuronal degeneration. Comparison evith copper sulfate and factors governing the departemen of fluids injected into brain. *Naunyn. Schmiedeberg's. Arch. Pharmacol.* 285: 31-70.

44) Agid, Y., Javay, F., Glowinski, J., Bouvet, D. and Soteio, C. 1973. Injection of 6-hydroxydopamine into the substantia nigra of the rat. II Diffusion and specificity. *Brain Res.* 58: 291-301.

45) Hokfelt, T. and Ungerstedt, U. 1973. Specificity of 6-hydroxydopamine induced degeneration of central monoamine neurones: an electron and fluorescence microscopic study with special reference to intracerebral injection on the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res.* 60: 269-297.

46) Perese, D. A., Ulman, J., Vipla, J., Ewing, S. E. and Bankiewicz, K. S. 1969. A 6-hydroxydopamine-induced selective parkinsonian rat model. *Brain Res.* 494: 285-293.

47) Burns, R. S., Lewitt, P. A., Ebert, M. H., Pakkenberg, H. and Kopin, I. J. 1985. The clinical syndrome of striatal dopamine deficiency: parkinsonism induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *New Engl. J. Med.* 312: 1418-1421.

48) Calne, D. B., Langston, J. W., Martin, W. R., Stoessl, A. J., Ruth, T. J., Adam, M. J., Pate, D. B. and Schulzer, M. 1985. Positron emission tomography after MPTP: observations relating to the cause of Parkinson's disease. *Nature.* 317: 246-248.

49) Langston, J. W. and Irwin, I. 1989. Pyridine toxins In: *Drugs for the treatment of Parkinson's disease. Handbook of Experimental Pharmacology.* Vol. 88. Ed. Calne, D. B., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. 203-226.

50) Chiba, K., Trevor, A. and Castagnoli, Jr. 1984. Metabolism of the neurotoxin tertiary amine-MPTP, by brain monoamine oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120: 574-578.

51) Ransom, B. R., Kunis, D. M., Irwin, I. and Langston, J. W. 1987. Astrocultures convert the parkinsonism inducing neurotoxin MPTP to its active metabolite, MPP+. *Neurosci. Lett.* 75: 323-328.

52) Chiba, K., Trevor, A. and Castagnoli, Jr. 1985. Active uptake of MPP+, a metabolite of MPTP, by brain sinaptosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1985. 1228-1232.

53) Javitch, J. A. and Snyder, S. H. 1985. Uptake the MPP(+) by dopamine neurons explains selectivity of parkinsonism-inducing neurotoxin, MPTP. *Eur. J. Pharmacol.* 106: 455-456.

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

55) Trevor, A. J., Castagnoli, N. Jr., Caldera, P., Ramsay, R. R. and Singer, T. P. 1987. Bioactivation of MPTP; reactive metabolites and possible biochemical sequelae. *Life Sci.* 40: 713-719.

56) Heikkila, R. E., Manzino, L., Cabbat, F. S. and Duvoisin, R. C. 1984 b. Protection against the dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine by monoamine oxidase inhibitors. *Nature.* 311: 467-469.

57) Cohen, G., Pasik, P., Cohen, B., Leist, A., Mytilineou, C. and Yahr, M. D. 1984. Pargyline and deprenyl prevent the neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in monkeys. *Eur. J. Pharmacol.* 106: 209-210.

58) Schultz, W., Scarnati, E., Sundström, E. and Romo, R. 1989. Protection against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinsonism by the catecholamine uptake inhibitor nomifensine: behavioral analysis. In monkeys with partial striatal dopamine depletions.

59) Heikkila, R. E. and Sonsalla, P. K. 1987. The use of the MPTP-treated mouse as an animal model of parkinsonism. *Can. J. Neurol. Sci.* 14 (suppl 3) 436-440.

60) Chiueh, C. C., Markey, S. P., Burns, R. S., Johannessen, J. N., Jacobowitz, D. M. and Kopin, I. J. 1984. Neurochemical and behavioral effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in rats, guinea pig, and monkey. *Psychopharmacol. Bull.* 20: 548-553.

61) Crossman, A. R., Clarke, C. E., Boyce, S., Robertson, R. G. and Sambrook, M. A. 1987. MPTP-induced parkinsonism in the monkey: neurochemical pathology, complications of treatment and pathophysiological mechanism. *Can. J. Neurol. Sci.* 14 (suppl. 3) 428-435.

62) Burns, R. S., Phillips, J. M., Chiueh, C. C., Parisi, J. E. 1986. The MPTP-treated monkey model of Parkinson's disease. In MPTP: a neurotoxin producing a parkinsonian syndrome. Eds.: Markey, S. P., Castagnoli, N. Jr., Trevor, A. J. and Kopin, I. J. Academic Press, New York. 23-42.

63) Bankiewicz, K. S., Oldfield, E. H., Chiueh, C. C., Doppman, J. L., Jacobowitz, D. M. and Kopin, I. J. 1986. Hemiparkinsonism in monkeys after unilateral internal carotid artery infusion of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Life Sci.* 39.

64) Clarke, C. E., Boyce, S., Robertson, R. G., Sambrook, M. A. and Crossman, A. R. 1989. Drug-induced dyskinesia in primates rendered hemiparkinsonian by intracarotid administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *J. Neurol. Sci.* 90: 307-314.

65) Chiueh, C. C., Burns, R. S., Kopin, I. J., Kirk, K. L., Firnau, C., Nahmias, Jacobowitz, D. M.; Burns, R. S.; Chiueh, C. C. and Kopin, I.J. 1984. N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) causes destruction of the nigrostriatal but not the mesolimbic dopamine system in the monkey. *Psychopharmacol. Bull.* 20: 416.

66) Quinn, N. 1990. The modern management of Parkinson's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 53: 93-95.

67) Knoll, J. 1987. R-(-)-Deprenyl (Selegiline, Movergan) facilitates the activity of the nigrostriatal dopaminergic neuron. *J. Neural. Transm. Suppl.* 25: 45-46.

68) Shoulson, I. 1989. Experimental therapeutics directed at the pathogenesis of Parkinson's disease: In: *Drugs for the treatment of Parkinson's disease. Handbook of Experimental Pharmacology Vol. 88 Ed. : D. B. Calne. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.* pp 289-305.

69) Tetrad, J. W. and Langston, J. M. 1989 b. The effect of deprenyl (selegiline) on the natural history of Parkinson's disease. *Science.* 245: 519-522.

70) Knoll, J. 1988. The striatal dopamine dependency of life span in male rats. Longevity study with (-) deprenyl. *Mech. Ageing. Dev.* 46: 237-262.

71) Knoll, J., Dallo, J. and Yen, T. T. 1989. Striatal dopamine, sexual activity and lifespan. Longevity of rats treated with (-) deprenyl. *Life Sci.* 45: 525-531.

72) Sherman, D., Desnos, C., Darchen, F., Pollak, P., Javoy-Agid, F. and Agid Y. 1989. Striatal dopamine deficiency in Parkinson's disease: role of aging. *Ann. Neurol.* 26: 551-557.

73) Marshall, J. F. and Berrios, N. 1979. Movement disorders of aged rats: reversal by dopamine receptor stimulation. *Science.* 206: 477-479.

74) Kopin, I. J., and Markey, S. P. 1988. MPTP toxicity: Implications for Research in Parkinson's Disease. *Ann. Rev. Neurosci.* 11: 81-96.

75) Jacobowitz, D. M., Burns, R. S., Chiueh, C. C. and Kopin, I. J. 1984. N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) causes destruction of the nigrostriatal but not the mesolimbic dopamine system in the monkey. *Psychopharmacol. Bull.* 20: 416.

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

77) Tanaka, J., Nakamura, H., Honda, S., Takada, K. and Kato, S. (1988). Neuropathological study on 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine of the Crabeating monkey. *Acta Neuropathol (Berl).* 75: 370-376.

78) Forno, L. S., Langston, J. W., DeLanney, L. E., Irwin, I. and Ricaurte, G. A. 1986. Locus ceruleus lesions and eosinophilic inclusions in MPTP-treated monkeys. *Ann. Neurol.* 20: 449-455.

- 79) Heikkila, R. E., Hess, A. and Duvoisin, R. C. (1984). Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine in mice. *Science*. 224: 1451-1453.
- 80) Hornykiewicz, O. 1982. Imbalance of brain monoamines and clinical disorders. *Prog Brain Res*. 55: 419-429.
- 81) Burns, R. S., LeWitt, P. A., Ebert, M. H., Pakkenberg, H., Kopin, I. J. 1984 a. The clinical syndrome of striatal dopamine deficiency: Parkinsonism induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *New Eng. J. Med.* 312: 1418-1421.
- 82) Chiba, K., Trevor, A. and Castagnoli, Jr. N. 1984. Metabolism of the neurotoxic tertiary amine, MPTP, by brain monoamine oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120: 574-578.
- 83) Diliberto, E. J. Jr. and Allen, P. L. 1980. Semidehydroascorbate as a product of the enzymic conversion of dopamine to norepinephrine. *Mol. Pharmacol.* 17: 421-426.
- 84) Fuller, R. W., Hemrich-Leucke, S. K. 1985. Influence of selective, reversible inhibitors of monoamine oxidase on the prolonged depletion of striatal dopamine by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mice. *Life Sci.* 37: 1098.
- 85) Westlund, K. N., Denney, R. M., Kochersperger, L. M., Rose, R. M. and Abell, C. W. 1985. Distinct monoamine oxidase A and B populations in primate brain. *Science*. 230. 181-183.

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

87) Keller, H. H. and DaPrada, M. 1985. Evidence for the release of 1-methyl-phenylpyridinium (MPP+) from rat striatal neurons in vitro. *Eur. J. Pharmacol.* 114: 247-250.

88) Mayer, R. A., Kindt, M. V., Heikkila, R. E. 1986. Prevention of the nigrostriatal toxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine by inhibitors of 3,4 dihydroxyphenylethylamine transport. *J. Neurochem.* 47: 1073-1079.

89) Melamed, E., Rosenthal, J., Cohen, O., Globus, M. and Uzzan, A. 1985. Dopamine but not norepinephrine or serotonin uptake inhibitors protect mice against neurotoxicity of MPTP. *Eur. J. Pharmacol.* 116: 179-181.

90) Ebadi, M., Pfeiffer, R. F., Murrin, L. C. and Shiraga, H. 1991. Metallothionein and oxidation reactions in Parkinson's disease. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 34: 285-290.

91) Ramsey, R. R., Dadgar, J., Trevor, A. and Singer, T. P. 1986 a. Energy-driven uptake of N-methyl-4-phenylpyridine by brain mitochondria mediates the neurotoxicity of MPTP. *Life Sci.* 39: 561-568.

92) Ramsey, R. R., Salach, J. I. and Singer, T. P. 1986 b. Uptake of the neurotoxin 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP+) by mitochondria and its relation to the inhibition of the mitochondrial oxidation of NAD⁺ linked substrates by MPP+. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 134: 343-348.

93) Ramsey, R. R. and Singer, T. P. 1986. Energy-dependent uptake of N-methyl-4-phenylpyridinium, the neurotoxic metabolite of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, by mitochondria. *J. Biol. Chem.* 261: 7585-7587.

94) Frei, B. and Richter, C. 1986. 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP+) together with 6-hydroxidopamine o dopamine stimulates Ca²⁺ released from mitochondria. *FEBS. Lett.* 198: 99-102.

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

96) Heikkila, R. E., Nicklas, W. J., Duvoisin, R. C. (1985). Dopaminergic toxicity of rotenone and MPP+ ion after their stereotaxic administration to rats: implication for the mechanism of MPTP toxicity. *Neurosci. Lett.* 62: 389-394.

97) Di Monti, D., Ekstrom, G., Shinka, T., Smith, M. T., Trevor, A. J. and Castagnoli, Jr. N. 1987. Role of MPP+ ion formation and accumulation in MPTP toxicity to isolated hepatocytes. *Chem. Biol. Interact.* 62: 105-116.

98) Kass, G. E. M., Wright, J. M., Nicotera, P. and Orrenius, S. 1988. The mechanism of MPTP toxicity: role of intracellular calcium. *Arch. Biochem. Biophys.* 260: 789-797.

- 99) Adams Jr., J. D., Kalivas, P. W. and Miller, C. A. 1989. The acute histopathology of MPTP in the mouse CNS. Brain Res. Bull. 23: 1-17.
- 100) Kutty, R. H., Santostasi, G., Horng, J. and Krishna, G. 1991. MPTP-induced ATP depletion and cell death in neuroblastoma x glioma hybrid NG 108 - 15 cells: Protection by glucose and sensitization by tetraphenylborate. Toxicol. Appl. Pharmacol. 107: 377-388.
- 101) Trush, M. A., Mimnaugh, E. G. and Gram, T. E. 1982. Activation of pharmacologic agents to radical intermediates. Implications for the role of free radicals in drug action and toxicity. Biochem. Pharmacol. 31: 3335-3346.
- 102) Kopin, I. J., Markey, S. P., Burns, R. S., Johannessen, J. N. and Chiueh, C. C. 1985. Mechanisms of neurotoxicity of MPTP. In: Recent developments in Parkinson's disease. Ed. Fahn, S., Marsden, C. D., Jenner, P. and Teychenne, P. New York. Raven. 165-173.
- 103) Bus, J. S., Cogen, S., Olgaard, M., Gibson, J. E. 1976. A mechanism of paraquat toxicity in mice and rats. Toxicol. Appl. Pharmacol. 35: 501-513.
- 104) Barber, A. A. and Berheim, F. (1967). Lipid peroxidation: Its measurement, occurrence and significance in animal tissues. Adv. Gerontol. Res. 2: 355-403.

105) Rehncrona, S., Smith, D. S., Akesson, B., Westerberg, E. and Siesjö, Bo K. 1980. Peroxidative changes in brain cortical fatty acids and phospholipids, as characterized during Fe^{2+} and ascorbic acid-stimulated lipid peroxidation in vitro. *Journal of Neurochemistry*, 34(6): 1630-1638.

106) Donaldson, J. and Barbeau, A. 1985. Metal Ions in Neurology and Psychiatry, pp 259-285. Alan R. Liss, New York.

107) Adams, J. D., Odunze, I. N. and Sevanian, A. 1990. Induction by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine of lipid peroxidation in vivo in vitamin E deficient mice. *Biochem. Pharmacol.* 39, R5.

108) Dexter, D. T., Carter, C. J., Wells, F. R. et al. 1989. Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 52: 381-389.

109) Sinha, B. K., Singh, Y. and Krishna, G. 1986. Formation of superoxide and hydroxyl radicals from 1-methyl-4-phenylpyridinium ion MPP+: Reductive activation by NADPH cytochrome P-450 reductase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 135: 283-288.

110) Goldstein, B. D., Rozen, M. G., Quintavalla, J. C. and Amoruso, M. A. 1979. Decrease in mouse lung and liver glutathione peroxidase activity and potentiation of the lethal effects of ozone and paraquat by the superoxide dismutase inhibitor diethylcarbamate. *Biochem. Pharmacol.* 29: 27-30.

111) Corsini, G. U., Pintus, S., Chiueh, C. C., Weiss, J. F. and Kopin, I. J. 1985. 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) neurotoxicity in mice is enhanced by pretreatment with diethylthiocarbamate. *Eur. J. Pharmacol.* 119: 127-128.

112) Johannessen, J. N., Adams, J. D., Schuller, H. M., Bacon, J. P. and Markey, S. P. 1986. 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP+) induces oxidative stress in the rodent. *Life Sci.* 38: 743-749.

113) Poirier, J. and Barbeau, A. 1985. A catalyst function for MPTP in superoxide formation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 131: 1284-1289.

114) Poirier, J., Donaldson, J. and Barbeau, A. 1985. The specific vulnerability of the substantia nigra to MPTP is related to the presence of transition metals. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 126: 25-33.

115) Yong, V. W., Perry, T. L. and Krisman, A. 1986. Depletion of glutathione in brainstem of mice caused by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine is prevented by antioxidant pretreatment. *Neurosci. Lett.* 63: 56-60.

116) Perry, T. L., Yong, V. W., Clavier, R. M., Jones, K., Wright, J. M., Foulks, J. G. and Wall, R. A. 1985. Partial protection from the dopaminergic neurotoxin N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine by four different antioxidants in the mouse. *Neurosci. Lett.* 60: 109-114.

117) Wagner, G. C., Carelli, R. M. and Jarvis, M. F. 1986. Ascorbic acid reduces the dopamine depletion induced by methamphetamine and 1-methyl-4-phenylpyridinium ion. *Neuropharmacology*. 25: 559-561.

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

119) Perry, T. L., Yong, V. W., Jones, K., Wright, J. M. 1986. Manipulation of glutathione contents fails to alter dopaminergic nigrostriatal neurotoxicity of N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the mouse. *Neurosci. Lett.* 70: 261-265.

120) Martinovits, G., Melamed, E., Cohen, O., Rosenthal, J. and Uzzan, A. Systemic administration of antioxidants does not protect mice against the dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Neurosci. Lett.* 69: 192-197.

121) Irwin, I., Wu, E. Y., DeLanney, L. E., Trevor, A. and Langston, J. W. 1987. The effect of diethyldithiocarbamate on the biodisposition of MPTP: an explanation for enhanced neurotoxicity. *Eur. J. Pharmacol.* 141: 209-217.

122) Corongiu, F. P., Dessi, M. A., Banni, S., Bernardi, F., Piccardi, M. P., Del Zompo, M. and Corsini, G. U. 1987. MPTP fails to induce lipid peroxidation in vivo. *Biochem. Biophys. Pharmacol.* 14: 2251-2253.

123) Jenner, P. 1989. Clues to the mechanism underlying dopamine cell death in Parkinson's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* (Suppl.) 22-28.

124) Perry, T. L., Godin, D. V., Hansen, S. 1982. Parkinson's disease: A disorder due to nigral glutathione deficiency. *Neurosci. Lett.* 33: 305-310.

125) Youdim, M. B. H., Ben-Shachar, D., and Riaderer, P. 1989. Is Parkinson's disease a progressive siderosis of substantia nigra resulting in iron and melanin induced neurodegeneration. *Acta Neurol. Scand.* 126: 47-54.

126) Clausen, J. 1984. Demential syndromes and the lipid metabolism: L-DOPA treatment of Parkinson's disease. *Acta Neurol. Scand.* 70: 345-355.

127) Nielsen, F. H. 1984. Ultratrace elements in nutrition. *Annu. Rev. Nutr.* 4: 21-41.

128) Prohaska, J. R. 1987. Functions of Trace Elements in Brain Metabolism. *Physiological Reviews.* 67:3.

129) Höck, A., Demmel, U., Schicha, H., Kasperek, K. and Feinendegen, L. E. 1975. Trace element concentration in human brain. Activation analysis of cobalt, iron, rubidium, selenium, zinc, chromium, silver, cesium, antimony and scandium. *Brain* 98: 49-64.

130) Larsen, N. A., Pakkenberg, H., Damsgaard, E. and Heydorn, K. 1979. Topographical distribution of arsenic, manganese, and selenium in the normal human brain. *Neurol. Sci.* 42: 407-416.

- 131) Smeyers-Verbeke, J., Defrise-Gussenhoven, E., Ebinger, G., Lowenthal, A. and Massart, D. L. 1974. Distribution of Cu and Zn in human brain tissue. *Clin. Chim. Acta.* 51: 309-314.
- 132) Donaldson, J., Pierre, T. ST., Minnich, J. L. and Barbeau, 1973. Determination of Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Cu³⁺, Zn³⁺ and Mn³⁺ in rat brain regions. *Can. J. Biochem.* 51: 87-92.
- 133) Kishi, R., Ikeda, T., Miyake, H., Uchino, E., Tsuzuki, T. and Inoue, K. 1982. Regional distribution of lead, zinc, iron and copper in suckling and adult rat brain. *Brain Res.* 251: 180-182.
- 134) Prohaska, J. R., and Ganther, H. E. 1976. Selenium and glutathione peroxidase in developing rat brain. *J. Neurochem.* 27: 1379-1387.
- 135) Kofod, B. 1970. Iron, copper, and zinc in rat brain. *Eur. J. Pharmacol.* 13: 40-45.
- 136) Hurley, L. S. 1981. The roles of trace elements in foetal and neonatal development. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 294: 145-152.
- 137) Maekesbery, W. R., Ehmann, W. D., Alauddin, M. and Hossain, T. I. M. 1984. Brain trace element concentrations in ageing. *Neurobiol. Ageing.* 5: 19-28.
- 138) Wedler, F. C., Denman, R. B. and Roby, W. G. 1982. Glutamine synthetase from ovine brain is a manganese (II) enzyme. *Biochemistry.* 21: 6389-6396.
- 139) Wedler, F. C. and Denman, R. B. 1984. Glutamine synthetase: the major Mn (II) enzyme in mammalian brain. *Curr. Top. Cell. Regul.* 24: 153-169.

140) Chandra, S. V. and Shukla, G. S. 1981. Concentrations of striatal catecholamines in rats given manganese chloride through drinking water. *J. Neurochem.* 36: 683-687.

141) Wills, E. D. 1965. Mechanisms of lipid peroxide formation in tissues. Role of metals and haematin proteins in the catalysis of the oxidation of unsaturated fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta.* 98: 238-251.

142) Misra, H.P. 1974. Generation of superoxide free radicals during the autoxidation of thiols. *J. Biol. Chem.* 249: 2151-2155.

143) De Rycker, J. and Halliwell, B. 1978. Oxidation of thiol compounds by catalase and peroxidase in the presence of manganese (II) and phenols. *Biochem. Soc. Trans.* 6: 1343-1345.

144) Donaldson, J., LaBella, F. S. and Gesser, D. 1981. Enhanced autoxidation of dopamine as a possible basis of manganese neurotoxicity (Park Forest South, III), 2: 53-64.

145) Matsuba, Y. and Takahashi, Y. 1970. Spectrophotometric determination of copper with N, N, N', N'-tetraethyl-thiuram disulfide and an application of this method for studies of subcellular distribution of copper in rat brain. *Anal. Biochem.* 36: 182-191.

146) Rajan, K. S., Colburn, R. W. and Davis, J. M. 1976. Distribution of metal ions in the subcellular fractions of several rat brain areas. *Life Sci.* 18: 423-432.

147) Cohen, E. and Elvehjem, C. A. 1934. The relation of iron and copper to the cytochrome and oxidase content of animal tissues. *J. Biol. Chem.* 107: 97-105.

- 148) Wainio, W. W., Vander Wende, C. and Shimp, N. F. 1959. Copper in cytochrome C oxidase. *J. Biol. Chem.* 234: 2433-2436.
- 149) Winter, D. B., Bruyninckx, W. J., Foulke, F. G., Grinich, N. P. and Mason, H. S. 1980. Location of heme a on subunits I and II and copper on subunit II of cytochrome c oxidase. *J. Biol. Chem.* 255: 11408-11414.
- 150) Weintraub, S. T. and Wharton, D. C. 1981. The effects of copper depletion on cytochrome c oxidase. *J. Biol. Chem.* 256: 1669-1676.
- 151) Kageyama, G. H., and Wong-Riley, M. T. T. 1982. Histochemical localization of cytochrome oxidase in the hippocampus: correlation with specific neuronal types and afferent pathways. *Neuroscience*, 7: 2337-2361.
- 152) Prohaska, J. R. and Wells, W. W. 1974. Copper deficiency in the developing rat brain: a possible model for Menkes' steely hair disease. *J. Neurochem.* 23: 91-98.
- 153) Fridovich, I. 1975. Superoxide dismutase. *Annu. Rev. Biochem.* 44: 147-159.
- 154) Marklund, S. L. 1984. Extracellular superoxide dismutase in human tissues and human cell lines. *J. Clin. Invest.* 74: 1398-1403.
- 155) Porter, H. and Folch, J. 1957. Cerebrocuprein I, A. Copper containing protein isolated from brain. *J. Neurochem.* 1: 260-271.

156) O'Dell, B. L. and Prohaska, R. 1983. Biochemical aspects of copper deficiency in the nervous system. In: Neurobiology of the Trace Elements. Ed. by Dreosti, I. E. and Smith, R. M. Clifton, N. J. Humana. Vol. 1: 41-81.

157) Prohaska, J. R. and Wells, W. W. 1975. Copper deficiency in the developing rat brain: evidence for abnormal mitochondria. J. Neurochem. 25: 221-228.

158) Puglia, C. D. and Loeb, G. A. 1984. Influence of rat brain superoxide dismutase inhibition by diethyldithiocarbamate upon the rate of development of central nervous system oxygen toxicity. Toxicol. Appl. Pharmacol. 75: 258-264.

159) Sinet, P. M., Garber, P. and Jerome, H. 1988. H₂O₂ production, modification of the glutathione status and methemoglobin formation in red blood cells exposed to diethyldithiocarbamate in vitro. Biochem. Biophys. Res. Commun. 135: 283-288.

160) Coyle, J. T. and Axeldod, J. 1979. Dopamine B-hydroxylase in the brain: developmental characteristics. J. Neurochem. 19: 449-459.

161) Reis, D. J. and Molinoff, D. B. 1972. Brain dopamine-B-hydroxylase: regional distribution and effects of lesions and 6-hydroxy-dopamine on activity. J. Neurochem. 19: 195-204.

162) Cimarusti, D. L., Saito, K., Vaughn, J. E., Barber, R., Roberts, E. and Thomas, P. E. 1979. Immunocytochemical localization of dopamine-B-hydroxylase in rat locus coeruleus and hypothalamus. Brain Res. 162: 55-67.

- 163) Fushimi, H., Hamison, C. R. and Ravin, H. A. 1971. Two new copper proteins from human brain isolation and properties. *J. Biochem. Tokyo*. 69: 1041-1054.
- 164) Harrison, P. M. and Hoare, R. J. (1980). *Metals in Biochemistry*. Chapman and Hall, London.
- 165) Waalkes, M. P., Ross, S. M., Craig, C. R. and Thomas, J. A. 1982. Induction of metallothionein in the rat brain by copper implantation but not by cobalt implantation. *Toxicol. Lett. Amst.* 12: 137-142
- 166) Linder, M. C. and Moor, J. R. 1977. Plasma ceruloplasmin evidence for its presence in and uptake by heart and other organs of the rat. *Biochim. Biophys. Acta*. 499: 329-336.
- 167) Hunt, D. M. 1980. Copper and neurological function. In: *Biological Roles of Copper*, Ed. by Evered, D. and Lawrenson, G. Amsterdam. *Excerpta Med.* 247-266.
- 168) Sorenson, J. R. J., Reuls, D. O., Ramakrishna, K., Stull, R. E. and Voldeng, A. N. 1979. Anticonvulsant activity of some copper complexes. In: *Trace substances in Environmental Health*. Edited by Hemphill, D. D. Columbia: Univ. of Missouri. Vol. 13. 360-367.
- 169) Komulainen, H. and Tuomisto, J. 1981. Effect of copper on the uptake and release of monoamines in rat brain synaptosomes. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 48: 205-213.
- 170) Barnea, A. and Cho, G. 1984. Evidence that copper-aminoacid complexes are potent stimulators of the release of luteinizing hormone-releasing hormone from isolated hypothalamic granules. *Endocrinology*. 115: 936-943.

171) Barnea, A., Cho, G., Colombani-Vidal, 1985. A role for extracellular copper in modulating prostaglandin E₆ (PGE₆) action: facilitation of PGE₆ stimulation of the release of gonadotropin-releasing hormone (LHRH) from median eminence explants. *Endocrinology*, 117: 415-417.

172) Maehara, M., Ogasawara, W., Mizutani, N., Watanabe, K. and Suzuki, S. 1983. Cytochrome C oxidase deficiency in Menkes kinky hair disease. *Brain Dev.* 5: 533-540.

173) French, J. H., Sherard, E. S., Lubell, H., Brotz, M. and Moore, C. L. 1975. Tridopoliodystrophy, Report of a case and biochemical studies. *Arch. Neurol.* 26: 229-244.

174) Rohmer, A., Krug, J. P., Mennesson, M., Mandel, P., Mack, G. and Zawislak, R. 1977. Maladie de Menke's. Etude de deux enzymes cupro-dependentes. *Pediatric*, 32: 447-456.

175) Nijeholt, J. L. and Korf, J. 1978. Wilson's disease and monoamines. *Arch. Neurol.* 35: 617-618.

176) Lai, J. C. K. and Blass, J. P. 1984. Neurotoxic effects of copper: inhibition of glycolysis and glycolytic enzymes. *Neurochem. Res.* 9: 1699-1709.

177) Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. (1985). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Clarendon Press, Oxford, England.

178) LaBella, F. S. and Paul, G. (1965). Structure of collagen from human tendon as influenced by age and sex. *J. Gerontol.* 20: 54-59.

- 179) Pryor, W. A. (1966). Free Radicals. Edited by Hartroft. W. S. 1965. Raven Press. New York.
- 180) Chance, B., Sies, H. and Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 59: 527-605.
- 181) Harman, D. (1972). The biological clock: The mitochondria? *J. Am. Geriatr. Soc.* 20: 145-147.
- 182) Nohl, H. and Hegner, D. (1978). Do mitochondria produce oxygen radicals in vivo? *Eur. J. Biochem.* 82: 863-867.
- 183) Klebanoff, S. J. (1980). Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes. *Ann. Intern. Med.* 93: 480-489.
- 184) Rossi, F., Bellavite, P., Berfon, G., Dri, P. and Zabucchi, G. (1982). The respiratory burst of phagocytic cells: Facts and Problems. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Vol. 141. Ed. by Rossi, F. and Patriarca, P. Plenum, New York. 283-320.
- 185) Porter, N. H. (1980). Prostaglandin endoperoxides. In: *Free Radicals in Biology*. Vol. 4, edited by Pryor, W. A. Academic Press, New York. 261-294.
- 186) Sato, R. and Omura, T. (eds.) (1978). *Cytochrome P-450*. Academic Press, New York.
- 187) DeDuve, C. and Hayaishi, O. (1978). *Tocopherol, oxygen, and Biomembranes*. Elsevier/ North Holland, New York.
- 188) Flohe, L., Gunzies, W. A. and Ladenstein, R. (1976). Glutathione peroxidase. In: *Glutathione: Metabolism and Function*. Edited by I. N. Arias and Jakoby, W. B. Raven Press, New. 115-138.

189) Michaelson, A. M., McCord, J. M. and Fridovich, I. (1977). (eds.) Superoxide and superoxide dismutases. Academic Press New York.

190) Ames, B. N. (1983). Dietary carcinogens and anticarcinogens (oxygen radicals and degenerative diseases). Science. 221: 1256-1264.

191) LaBella, F. S., Vivian, S. and Thornhill, D. P. (1966). Aminoacid composition of human aortic elastin as influenced by age. J. Gerontol. 21: 550-555.

192) Harman, D. (1967). Chromatic template capacity: Effect of oxygen. Gerontologist 7 (3) (part 2): 29 (abstract).

193) Matsumura, G., Herp, A. and Pigmon, W. (1966). Depolymerization of hyaluronic acid by autoxidants and radiations. Radiat. Res. 28: 735-752.

194) Hartroft, W. S. and Porta, E. S. (1965). Ceroid. Am. J. Med. Sci. 258: 324-344.

195) Miquel, J., Oro, J., Bensch, K. G. and Johnson, J. E. Jr. (1977). Lipofuscin: Fine-structural and biochemical studies. In Free Radicals in Biology, edited by Pryor, W. A. Academic Press. New York. 133-182.

196) Hegner, D. (1980). Age-dependence of molecular and functional changes in biological membrane properties. Mech. Ageing Dev. 14: 101-118.

197) Robinson, J. D. (1965). Structural changes in microsomal suspension III. Formation of lipid peroxide. Arch. Biochem. Biophys. 122: 170-179.

198) Witting, L. (1980). Vitamin E and lipid antioxidants in free-radical initiated reactions. In: Free Radicals in Biology. Vol. 4. Edited by Pryor, W. A. Academic Press, New York. 295-317.

199) Casarett, G. W. (1964). Similarities and contrasts between radiation time pathology. In: Advances in Gerontological Research. Vol. 1. edited by Strehler, B. L. Academic Press. New York. 109-163.

200) Harman, D. and Piette, L. H. (1966). Free radical theory of aging: Free radical reactions in serum. J. Gerontol. 21: 560-565.

201) Fucci, L., Oliver, C. N., Coon, M. J. and Stadman, E. R. (1983). Inactivation of key metabolic enzymes by mixed-function oxidation reactions: Possible implication in protein turnover and aging. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80: 1521-1525.

202) Pastuszo, A., Gordon-Majszak, W. and Dabrowiecki, Z. 1983. Dopamine uptake in striatal synaptosomes exposed to peroxidation "in vitro". Biochemical Pharmacology 32(1): 141-146.

203) Harman, D. (1985). Role of free radicals in aging and disease. In: Aging. Vol. 28. Relations between Normal Aging and Disease, edited by Johnson, H. A. pp 45-84. Raven Press, New York.

204) Autor, A. (1982). Pathology of oxygen. Academic Press. New York.

205) Nygaard, O. F. and Simic, M. G. (eds) (1983). Radioprotectors and Anticarcinogens. Academic Press, New York.

206) Pryor. W. A. (ed.) (1976-1982). Free Radicals in Biology. Vols. I-V. Academic Press. New York.

207) Cerutti. P. A. (1985) Prooxidant states and tumor promotio. Science. 227: 375-380.

208) Hirota. N. and Yokoyama. T. (1981). Enhancing effect of hydrogen peroxide upon duodenal and upper jejunal carcinogenesis in rats. Gann. 72: 811-812.

209) Ito. A., Naito. M., Naito. Y. and Watanabe. H. (1982). Induction and characterization of gastro-duodenal lesions in mice given continuous oral administration of hydrogen peroxide. Gann. 73: 315-322.

210) Plaine. H. L. (1955). The effect of oxygen and of hydrogen peroxide on the action of a specific gene and on tumor induction in Drosophila melanogaster. Genetics. 40: 268-280.

211) Reddy. J. K. and Lalwani. N. D. (1983). Carcinogenesis by hepatic peroxisome proliferators: Evaluation of the risk of hypolipidemic drugs and industrial plasticizers to humans. CRC. Crit. Rev. Toxicol. 12: 1-58.

212) Reddy. J. K., Warren. J. R., Reddy. M. K. and Lalwani. N. D. (1982). Hepatic and renal effects of peroxisome proliferators: Biological implications. Ann. N. Y. Acad. Sci. 386: 81-110.

213) Speit. G., Vogel. W. and Wolf. M. (1982). Characterization of sister chromatid exchange induction by hydrogen peroxide. Environ. Mutagen. 4: 135.

214) Tsuda, H. (1981). Chromosomal aberrations induced by hydrogen peroxide in cultured mammalian cells. *Jpn. J. Genet.* 56: 1-8

215) Fridovich, I. (1978). The biology of oxygen radicals. *Science.* 201: 875-880.

216) Halliwell, B. (1981 b). In: *Age Pigments* (Sohal, R. S., ed. 1) Elsevier/ North-Holland, Amsterdam. 1-62.

217) Walling, C. (1982). In *oxidases and related redox systems* (King, T. E., Mason, H. S. and Morrison, M., eds.) pp 85-97. Pergamon Press, Oxford.

218) Schramm, V. L. (1982). Metabolic regulation: could Mn^{2+} be involved?. *Trends Biochem. Sci.* 7: 369-371.

219) Archibald, F. S. and Fridovich, I. (1981). Manganese, superoxide dismutase and oxygen tolerance in some lactic acid bacteria. *J. Bacteriol.* 146: 928-936.

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

221) Willson, R. L. (1978 a). In *biochemical mechanisms of liver injury* (Slater, T. F., ed), pp 123-224., Academic Press London.

222) Shukla, G. S. and Chandra, S. V. (1981). Manganese toxicity: lipid peroxidation in rat brain. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 48: 95-100.

223) Archibald, F. S. and Tyree, C. (1987). Manganese poisoning and the attack of trivalent Manganese upon catecholamines. Arch. Biochem. Biophys. 256: 638-650.

224) Glowinski, J. and Iversen, L. L. (1966). Regional studies of catecholamines in the rat brain. Disposition of 3H-norepinephrine, 3H-dopamine, and 3H-DOPA in various regions of the brain. J. Neurochem. 13: 655-669.

225) Diggory, G. L. and Buckett, W. R. (1984). An automated method to measure monoamines and metabolites using elevated temperature reversed phase HPLC with electrochemical detection. Applications to striatal dopamine and hippocampal serotonin turnover. J. Pharmacol. Meth. 11: 207-217.

226) Daniels, A. J., Gysling, K. and Abarca, J. 1981. Uptake and release of manganese by rat striatal, slices. Biochem. Pharmacol. 30: 1833-1837.

227) Messripour, M., and Haddaddy, H. 1988. Effect of ascorbic acid administration on copper-induced changes of rat brain hypothalamic catecholamine contents. Acta Neurol. Scand. 77: 481-485.

228) Gallagher, C. H., Judah, J. D. and Rees, K. R. 1956. The biochemistry of copper deficiency. I. Enzymological disturbances, blood chemistry and excretion of amino-acids. Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 145: 134-149.

229) Prohaska, J. R. and Wells, W. W. 1975. Copper deficiency in the developing rat brain: evidence for abnormal mitochondria. J. Neurochem. 25: 221-228.