

03068

1
201



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS
PROFESIONAL Y DE POSGRADO

LA PEROXIDACION DE LIPIDOS EN UN MODELO
EXPERIMENTAL DE LA ENFERMEDAD
DE PARKINSON

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS
P R E S E N T A ,
PATRICIA ROJAS CASTAÑEDA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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

RESUMEN

1. INTRODUCCION	1
2. PARKINSONISMO INDUCIDO POR LA 1-METIL- 4- FENIL 1.2.3.6-TETRAHIDROPIRIDINA (MPTP)	3
2.1. NEUROTOXICIDAD AGUDA POR LA MPTP	
2.1.1. EFECTOS EN EL COMPORTAMIENTO	6
2.1.2. EFECTOS BIOQUIMICOS	7
2.2. NEUROTOXICIDAD CRONICA POR LA MPTP	8
2.1.1. EFECTOS EN EL COMPORTAMIENTO	8
2.1.2. EFECTOS BIOQUIMICOS	8
2.3. CAMBIOS PATOLOGICOS EN ANIMALES TRATADOS CON MPTP	9
2.4. METABOLISMO DE LA MPTP	11
2.5. MECANISMOS DE NEUROTOXICIDAD DEL ION 1-ME- TIL 4-FENILPIRIDINO (MPP+)	17
2.5.1. HIPOTESIS DEL ESTRES REDOX	18
2.5.2. POSIBLE PAPEL DE LA NEUROMELANI- NA EN LA NEUROTOXICIDAD DE LA MPTP	23
2.5.3. INHIBICION DE LA RESPIRACION MI- TOCONDRIAL POR EL MPP+	24
3. OXIDANTES. METALES Y CEREBRO	27
3.1 DANO OXIDATIVO Y ENFERMEDAD DE PARKINSON....	28
4. PEROXIDACION DE LIPIDOS	
4.1. QUIMICA DE LA PEROXIDACION DE LIPIDOS	30
4.2. REACCIONES DE LA PEROXIDACION DE LIPIDOS... 30	
4.2.1. INICIACION DE LA PEROXIDACION	

DE LIPIDOS	34
4.2.2. PROPAGACION DE LA PEROXIDACION DE LIPIDOS. RUPTURA DE LOS HI- DROPEROXIDOS LIPIDICOS	37
4.3. PEROXIDACION DE LIPIDOS Y DAÑO CELULAR	39
4.4. PEROXIDACION DE LIPIDOS EN MEDICINA	41
4.5. DETECCION Y MEDICION DE LA PEROXIDACION DE LIPIDOS	44
5. HIPOTESIS	47
6. OBJETIVOS	47
7. MATERIAL Y METODO	
7.1. EVALUACION DE LA PEROXIDACION DE LIPIDOS POR EL ENSAYO DE LAS SUSTANCIAS REACTIVAS AL ACIDO TIOBARBITURICO (TBARS) DESPUES DE LA ADMINISTRACION DE MPP+	49
7.2. DETERMINACION DE PRODUCTOS FLUORESCENTES LIPIDICOS (PFL) COMO INDICE DE LA PEROXIDA- CION DE LIPIDOS DESPUES DE LA ADMINISTRA - CION DE MPP+	50
7.3. EFECTO DE LA ADMINISTRACION ORAL DE MANGANESO SOBRE LA NEUROTOXICIDAD DE LA MPTP	52
7.4. ANALISIS DEL CONTENIDO DE DOPAMINA ESTRIA- TAL	53
7.5. DETERMINACION DE MANGANESO POR ESPECTROFO- TOMETRIA DE ABSORCION ATOMICA CON HORNO DE GRAFITO	53
8. RESULTADOS	55

9. DISCUSION Y CONCLUSIONES	65
-----------------------------------	----

APENDICES

A.1. ANATOMIA DE LOS GANGLIOS BASALES	71
A.2. ENFERMEDAD DE PARKINSON	
A.2.1. SINTOMATOLOGIA	72
A.2.2. NEUROLOGIA Y BIOQUIMICA	78
A.3. MODELOS EXPERIMENTALES DE PARKINSON	82
A.3.1. MODELO COLINERGICO	82
A.3.2. LESIONES NEURONALES NO SELECTIVAS	83
A.3.3. METODOS QUIMICOS	83
A.3.4. 6-HIDROXIDOPAMINA	84
A.3.5. MODELO DE LA EDAD	86
A.4. RADICALES LIBRES	
A.4.1. TOXICIDAD DEL OXIGENO	87
A.4.2. RADICALES LIBRES DEL OXIGENO	88
A.4.2.1. OXIGENO SINGULETE	89
A.4.2.2. SUPEROXIDO	89
A.4.2.3. PEROXIDO DE HIDROGENO	91
A.4.2.4. RADICAL HIDROXILO	93
A.4.3. FUENTES DE RADICALES LIBRES <u>IN VIVO</u>	96
A.4.4. DANO INDUCIDO POR LAS REACCIONES DE LOS RADICALES LIBRES	98
A.5. PROTECCION CONTRA LOS RADICALES LIBRES EN LOS SISTEMAS- BIOLOGICOS	100
A.5.1. ENZIMAS	100
A.5.1.1. SUPEROXIDO DISMUTASA	100

A.5.1.2. CATALASA Y GLUTATION PEROXIDASA.	101
A.5.2. ANTIOXIDANTES	104
10. REFERENCIAS	107

R E S U M E N

El ión 1-metil-4-fenilpiridino (MPP+) es el metabolito activo de la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina, una droga que induce un modelo de Parkinson en roedores. Los mecanismos de acción de la droga se desconocen, pero las evidencias sugieren que la peroxidación de lípidos inducida por radicales libres puede participar en el daño celular. Para probar esta hipótesis nosotros evaluamos dos índices de la peroxidación de lípidos en este modelo: 1) el ensayo de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) 2) y la formación de productos fluorescentes lipídicos (PFL). Se administraron ratones de la cepa C-57 Black por vía intracerebroventricular (icv) con distintas dosis de MPP+ y se evaluó la producción de TBARS, encontrando una sobreproducción selectiva de TBARS en el cuerpo estriado de 70% a los 30 minutos y de 198% a los 60 minutos, en el mesencéfalo fue de 88% a los 30 minutos, comparado con los controles respectivos inyectados icv con solución salina fisiológica. No observamos cambios en la corteza frontal y en el cerebelo. Los PFL en el cuerpo estriado aumentaron en 40% vs el grupo control a 2 h después de la administración de MPP+, manteniéndose hasta 24h después (38% vs control). También se evaluó el efecto de la administración del manganeso, un metal antiperoxidante, sobre la neurotoxicidad de la MPTP, encontrando una protección del 60% sobre la acción reductora del contenido de dopamina en el cuerpo estriado producido por la MPTP. Nuestros resultados sugieren que la peroxidación de lípidos puede estar involucrada como mediadora de los efectos neurotóxicos del MPP+ in vivo. Esto puede ser de gran importancia ya que cabe esperar la existencia de este mecanismo en la enfermedad de Parkinson.

1. INTRODUCCION

La enfermedad de Parkinson es un trastorno neurológico progresivo de la actividad motora extrapiramidal, caracterizado por síntomas como el temblor en las extremidades, bradicinesia, rigidez muscular, etc.

En este padecimiento, el daño se localiza fundamentalmente en las neuronas dopaminérgicas que constituyen la vía nigroestriatal, pero también se lesionan núcleos del tallo cerebral como el locus coeruleus, el rafe y el motor del vago.

En 1983, Langston y cols. descubrieron que la droga 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) produce toxicidad celular en la vía nigroestriatal en humanos, monos y roedores (Chiueh, C. et al., 1984), y con un desorden indistinguible de la enfermedad de Parkinson idiopática.

Se ha mostrado que la MPTP es oxidada in vivo por la monoaminooxidasa B, formándose el ión 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP+) (Chiba, K. et al., 1984). Un estudio posterior de Javitch, J. y col., (1985) mostró que éste se acumula en las neuronas dopaminérgicas a través del sistema de recaptura de la dopamina, donde ejerce sus efectos tóxicos.

El mecanismo de daño celular causado por esta toxina se desconoce, sin embargo, se ha mostrado que el MPP+ es captado in vitro por la mitocondria, en donde se acumula (Ramsay, P. and Singer, T., 1986) e inhibe la oxidación de sustratos unidos al NADH de la mitocondria (Nicklas, W. et al., 1985; Ramsay, R. et al., 1987).

Esos resultados sugieren que su acción tóxica in vivo se puede atribuir a la inhibición de las funciones de la mitocondria y a la subsecuente disminución del ATP (Mizuno, Y. et al., 1988). Por otro lado, se ha involucrado a la formación excesiva de radicales libres como un posible mecanismo de daño de la droga.

Un proceso relacionado con la formación y ataque de radicales libres, es la peroxidación de lípidos (PL) el cual consiste en la asimilación del oxígeno y el rearrreglo de los dobles enlaces de los lípidos de la membrana celular, lo que produce su destrucción.

Se sabe que la MPTP genera radicales libres del oxígeno in vitro (Poirier, J. and Barbeau, A., 1985) y reduce las defensas endógenas antioxidantes, como el glutatión reducido, contra los radicales libres (Ferraro, T. et al., 1986). El MPP+ es capaz de inducir PL en homogenados de cerebro de ratón in vitro (Ríos, C. and Tapia, R., 1987). Esos resultados sugieren que la PL inducida por radicales libres puede estar involucrada en las acciones neurotóxicas del MPP+.

El objetivo de esta tesis es evaluar si el MPP+ es un agente lipoperoxidativo in vivo, en varias regiones del cerebro de ratones tratados por vía intracerebroventricular con dosis variables de MPP+, para probar la posible participación de este proceso en la neurotoxicidad de la MPTP/MPP+. Para este propósito se analizaron dos productos terminales de la PL: la producción de materiales reactivos al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y la formación de productos fluorescentes lipídicos (LPF).

2. PARKINSONISMO INDUCIDO POR LA 1-METIL-4-FENIL-1,2,3,6-TETRAHIDROPIRIDINA (MPTP).

El cuerpo estriado es una estructura que desempeña importantes funciones (ver apéndice 1), y una alteración en esta puede producir la enfermedad de Parkinson, que se identifica como un desorden neurodegenerativo progresivo con características patológicas y clínicas bien conocidas (ver apéndice 2).

La investigación sobre la etiología de la enfermedad de Parkinson indica que no hay factores hereditarios implicados (Calne, D.B. and Langston, J.W., 1983), pero se señala que su inducción puede ser por compuestos químicos neurotóxicos endógenos o exógenos (Snyder, S.H. and D'Amato, R.J., 1986; Markey, S.P. and Schmuff, N.R. 1986; Tanner, C.M., 1989).

Para el estudio de los mecanismos etiológicos de la enfermedad de Parkinson se han utilizado varios modelos que son similares, aunque no idénticos a la enfermedad idiopática (ver apéndice 3). El hallazgo más importante es el de la toxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), que produce síntomas clínicos y patología muy similar a la enfermedad de Parkinson (Langston et al., 1983; Davis et al., 1979). Esta neurotoxina se produjo y se distribuyó como un contaminante intermediario químico de una droga de abuso producida ilícitamente, el 1-metil-4-fenil-4-propionoxiperidinio (MPPP) que se forma por la deshidratación de un precursor de este compuesto (figura 1). El resultado fue que los adictos a las drogas que se inyectaron esta meperidina sintética que contenía MPTP presentaron un síndrome parkinsoniano permanente (Langston et al., 1983; Davis et al., 1979). Ninguno

de estos sujetos presentaron demencia, pero con pruebas neuropsicológicas se han mostrado cambios intelectuales similares a los que se presentan en los pacientes con la enfermedad de Parkinson tardía (Stern, Y. and Langston, J.W., 1985). En otro grupo expuesto a la MPTP pero asintomático, se observaron cambios neuropsicológicos en menor grado (Stern, Y. et al., 1986) y con tomografía de emisión de positrones se encontró que presentaban disminución en el contenido de dopamina en el cuerpo estriado (Calne, D.B. et al., 1985), sugiriendo que la fase preclínica puede existir en esos individuos.

En la enfermedad idiopática hay variaciones considerables de paciente a paciente, algunos muestran prominente temblor, mientras otros acinesia o rigidez predominante. Esta variación individual presenta otro paralelo entre el parkinsonismo inducido con la MPTP y la enfermedad de Parkinson (Langston et al., 1983).

Las observaciones más importantes desde el punto de vista patológico, es que la MPTP produce daño localizado en el sistema dopaminérgico de la vía nigroestriatal, como el descrito en el Parkinson idiopático.

Los síntomas clínicos y signos de la intoxicación por la MPTP en pacientes es semejante a lo observado en la enfermedad de Parkinson, por lo que es justificable que pueda ser usado para crear un modelo animal de la enfermedad.

Se ha encontrado que esta neurotoxina produce un modelo similar a la enfermedad de Parkinson cuando se administra a los monos (Burns, R.S. et al., 1983; Jenner, P. et al., 1984; Langston, J.W. et al., 1984a; Langston, J.W. et al., 1984b) y al ratón (Heikkila, R.E. et al., 1984; Heikkila, R.E. et al., 1984a).

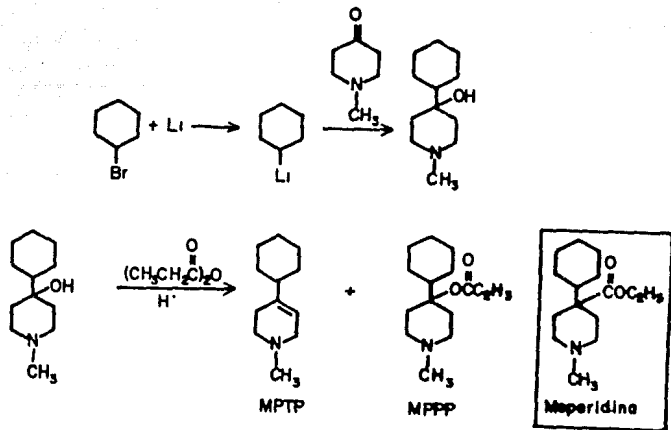


FIGURA 1. Formación de la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) como un producto de reacción de la síntesis ilícita para producir un análogo meperidinio, el 1-metil-4-fenil-4-propionoxipiridinio (MPPP). La estructura de la meperidina se muestra en el rectángulo (tomado de Kopin, 1986a).

2.1. NEUROTOXICIDAD AGUDA POR LA MPTP

2.1.1. Efectos en el comportamiento

La administración de la MPTP produce cambios en la conducta de ratas (Davis, G.C. et al., 1979). Segundos después de administrar intravenosamente la MPTP (10-20 mg/Kg) aparecen patrones de comportamiento relacionados con el síndrome serotoninérgico (Chiuéh, C.C. et al., 1984; Chiuéh, C.C. et al., 1984a), que pudieron revertirse por la administración de un antagonista de la 5-HT, la metiserghida.

Si se aplican dosis repetidas de la MPTP a ratones (mas de 50 mg/Kg) se produce destrucción parcial de las neuronas dopaminérgicas. Conductualmente, se presenta inmovilidad transitoria, sin diferencias notables en la actividad motora después de la recuperación de los efectos iniciales. En el mono, los efectos agudos de las dosis (0.2-0.6 mg/Kg) de la MPTP son inicialmente moderados, pero a dosis altas algunas especies de primates presentan temblores agudos, cambios posturales (incluyendo cola erecta) y movimiento rotatorio de los ojos. Además presentan actividad similar a la de la enfermedad de Parkinson idiopática (Burns, R.S., et al., 1983; Langston, J.W., et al., 1984), con la posible excepción del temblor en reposo. Sin embargo, en el mono verde se ha identificado este síntoma con una frecuencia de 4 a 5 Hertz, que es indistinguible al que se presenta en humanos parkinsonicos (Tetrud, J.W. et al., 1986). Una observación común en los monos es que el síndrome parkinsonico que presentan es seguido de una recuperación parcial de su comportamiento normal.

En el caso del humano que recibió de manera accidental la MPTP se reporta una sensación de quemadura en el sitio de inyección, un sabor medicinal o metálico, visión borrosa, oscura y alucinaciones ocasionales (Davis, G.C. et al., 1979; Ballard, P.A. et al., 1985).

2.1.2. Efectos bioquímicos

Los cambios bioquímicos agudos después de la administración de la MPTP están relacionados con el metabolismo periférico y central de las catecolaminas. A nivel periférico, el contenido plasmático de norepinefrina y epinefrina en la rata se incrementaron (Chiueh, C.C. et al., 1984) y las cantidades arteriales y cardíacas disminuyeron tanto en ratas como en ratones (Fuller, R.W. et al., 1984).

En el cerebro de la rata y el ratón durante la fase aguda hay disminución en el metabolismo de la serotonina y de la dopamina. Sin embargo, el contenido de serotonina en el núcleo del rafe y en el hipotálamo aumentan; los metabolitos de la serotonina y de la dopamina disminuyen 15 minutos después de la administración de la MPTP. Esto puede deberse a la disminución en la liberación de las aminas por acción directa de la MPTP (Schmidt, C.J. et al., 1984) o por inhibición transitoria de la MAO (Salach, J.I. et al., 1984; Fuller, R.W. et al., 1985; Melamed, E. et al., 1985).

En el mono Rhesus, el análisis de catecolaminas en el líquido cefaloraquídeo muestra una reducción en el contenido de ácido homovanílico, ácido 5-hidroxiindolacético y 3-metoxi-4-hidroxi-fenilglicol en el primer día después de la administración de la

MPTP. permaneciendo así durante varias semanas (Burns, R.S. et al., 1983).

2.2. NEUROTOXICIDAD CRÓNICA DE LA MPTP.

2.2.1. Efectos en el comportamiento

Aunque los efectos agudos de la MPTP son similares en varias especies, se presentan diferencias en las manifestaciones y en la vulnerabilidad a los efectos tóxicos crónicos. En primates, tales como el mono rhesus (Burns, R.S. et al., 1983), el mono ardilla (Langston, J.W. et al., 1984) y el titi (Jenner, P. et al., 1984), el síndrome se desarrolla entre 3 días a 3 semanas, agravándose la bradicinesia, la rigidez, los episodios de congelamiento y el temblor. El grado de deterioro motor puede variar. Esta variabilidad en la severidad de los efectos motores puede estar relacionado con la disminución del 80% del número de las neuronas dopaminérgicas, lo cual es concomitante para producir cambios en la conducta.

2.2.2. Efectos bioquímicos

En el primate, las cantidades del ácido 5-hidroxiindolacético y del 3-metoxi-4-hidroxi-fenilglicol retornan a sus valores normales después de algunos días de la administración de MPTP, pero los del ácido homovanílico permanecen bajos (Burns, R.S. et al., 1983).

En el ratón, (Hallman, H. et al., 1985; Heikkila, R.E. et al., 1984; Hallman, H. et al., 1984; Melamed, E. et al., 1985a), las dosis bajas de la MPTP (20 mg/Kg) producen disminución marcada de la dopamina cerebral que persiste por largo tiempo.

En diferentes cepas de raton, las lesiones no se limitan al sistema nigroestriatal sino que está disminuido el contenido de dopamina en el núcleo accumbens (Jacobowitz, D.M. et al., 1984), así como de norepinefrina en el cuerpo estriado y en la corteza frontal (Heikkila, R. et al., 1984). Sin embargo, hay recuperación de las catecolaminas en el cerebro hasta alcanzar sus valores normales (Hallman, H. et al., 1984).

2.3. CAMBIOS PATOLÓGICOS EN ANIMALES TRATADOS CON LA MPTP.

Davis, G.C. y col. (1979) estudiaron aquellos humanos que desarrollaron parkinsonismo inducido por la MPTP y encontraron destrucción extensa de neuronas en la sustantia nigra, disminución de la neuromelanina y una sola inclusión eosinófila intracitoplásmica, similar al cuerpo de Lewy, pero las células del locus coeruleus permanecieron intactas.

En el mono Rhesus, el parkinsonismo inducido por inyecciones intravenosas repetidas de la MPTP, produce disminución casi completa de la dopamina en las neuronas dopaminérgicas de la sustantia nigra en su pars compacta (Jacobowitz, D.M. et al., 1984). Se presentó degeneración de las fibras terminales dopaminérgicas en el cuerpo estriado. Cuatro meses después de la administración de la MPTP, también se dañaron las células del área ventral tegmental A10, sus proyecciones al núcleo accumbens y al tubérculo olfatorio.

Forno y col. (1986) reportaron que en los monos ardilla tratados con la MPTP, el daño más severo se observó en la porción medial de la sustantia nigra, en el área ventral tegmental

(A10), con lesiones localizadas en el locus coeruleus. Las inclusiones eosinófilas se encontraron en animales viejos.

De manera reciente, se ha encontrado que en los monos ardilla adultos (5-20 años) hay lesiones patológicas adicionales en el locus coeruleus y en los animales muy viejos entre 15 a 20 años se forman inclusiones eosinófilas intraneuronales (Forno, L.S. et al., 1986). Estas formaciones bajo el microscopio fotónico parecen cuerpos de Lewy, pero el análisis con microscopía electrónica indica que no presentan un núcleo denso típico de los cuerpos de Lewy, por lo que se ha sugerido que estas inclusiones inducidas con la MPTP pueden ser una forma inmadura de los cuerpos de Lewy (Forno, L.S. et al., 1989) y se han localizado en el bulbo, núcleo basalis de Meynert, sustantia nigra, locus coeruleus y núcleo del rafe dorsal en la enfermedad de Parkinson (Forno, L.S. et al., 1986).

Las diferencias en la toxicidad inducida por la MPTP se han analizado en diferentes cepas de ratón. Sundstrom y col. en 1987 compararon 4 cepas de ratón: C57 BL/6, NMRI, CBA/Ca y Swiss-Webster. Después de aplicar dos dosis de 50 mg/Kg, sc de la MPTP encontraron marcada disminución de la dopamina en el cuerpo estriado: 96% en C57 BL/6, 92% en el NMRI, y 86% en el CBA/Ca, pero después de 10 dosis diarias de la MPTP durante 10 días en ratón Swiss-Webster, la dopamina en el cuerpo estriado disminuyó sólo 74%. En todas las cepas examinadas, la disminución de la dopamina en el mesencéfalo fue similar (36% en CBA, 45% en NMRI y 52% en C57 BL/6), pero el contenido de norepinefrina en la corteza frontal varió y no se presentó disminución en C57 BL/6, en NMRI pero la disminución en CBA/Ca fue del 8% y de 61%

2.4. METABOLISMO DE LA MPTP

La MPTP es un compuesto soluble en lípidos que fácilmente penetra las membranas, incluyendo la barrera hematoencefálica de monos y ratones (Markey, S. et al., 1984). Después de su administración, la MPTP es convertida al ión 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP+) (Markey et al., 1984; Johannessen et al., 1985; Langston et al., 1984), que se forma en todos los tejidos incluyendo el cerebro. La conversión enzimática de la MPTP a MPP+ se mostró en homogenados de cerebro de rata (Chiba et al., 1984) y mono (Irwin and Langston, 1985; figura 1). Esta biotransformación requiere de la enzima monoaminooxidasa (MAO), porque utilizando un inhibidor de la MAO, la pargilina, se bloquea este paso (Chiba et al., 1984; Markey et al., 1984; Johannessen et al., 1985); un efecto similar se ha observado in vivo en el ratón (Markey et al., 1984) y en el mono (Langston et al., 1984). El deprenyl (un inhibidor selectivo de la MAO-B) bloquea la conversión de la MPTP a MPP+, sugiriéndose que el subtipo B de la MAO es el que está involucrado (Chiba et al., 1984; Arora et al., 1988; Wu et al., 1988; Yang et al., 1988). El efecto protector de los inhibidores de la MAO-B sobre la toxicidad de la MPTP sugiere que la biotransformación a MPP+ es necesaria para que ocurra el daño (Langston, J., et al., 1984; Heikkila, R. et al., 1984).

La oxidación de MPTP a MPP+ ocurre en 2 pasos (figura 2), siendo el 1-metil-4-fenil-3,4-dihidropiridino (MPDP+) un intermediario que se transforma de manera espontánea en MPDP y MPP+ ó por la acción subsecuente de la MAO.

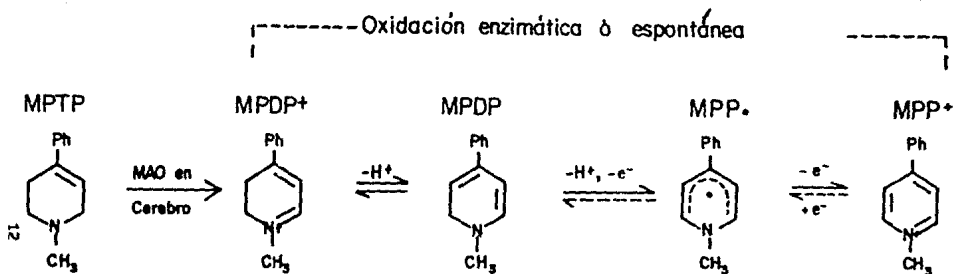


FIGURA 2. Oxidación de la 1-metil-4-fenil-1.2.3.6- tetrahidropiridina (MPTP) a el ión 1-metil-4-fenilpiridino (MPP+) formándose como compuestos intermediarios el ión 1-metil-4-fenil-3.4-dihidropiridino (MPDP+), MPDP y radical MPP (MPP·) (tomado de Sayre, 1989).

El MPP+ permanece en el cerebro del mono por varios días (la vida media se ha calculado en 10 días), pero desaparece rápidamente del cerebro del ratón (Johannessen, J. et al., 1985).

El metabolismo de la MPTP en otros tejidos, como el hígado, involucra dos vías adicionales (figura 3): 1) Conversión a MPTP N-óxido por la enzima flavín mono-oxigenasa (Cashman, J.R. and Ziegler, D.M., 1986; Weissman, J. et al., 1985; Chiba, K. et al., 1988) y en menor grado, 2) N-desmetilación por citocromo P-450 a 4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (PTP) (Weissman, J. et al., 1985). La mayor parte del MPDP+ generado en el hígado por la MAO es convertido por acción de la enzima aldehído oxidasa a 1-metil-4-fenil-5,6, dihidro-2(1H)-piridinona (MPPyH2) (Arora, P. et al., 1988; Wu, E. et al., 1988; Baker, J. K. et al., 1984) que puede oxidarse por citocromo P-450 (Wu, E. et al., 1988) a 1-metil-4-fenil-2 (1H) piridinona (MPPyr) (Arora, P. et al., 1988; Wu, E. et al., 1988; Yang, S. et al., 1988; Baker, J. et al., 1984) y reducirse a 1-metil-4-fenil-2-piperidinona (MPPip) (Arora, P. et al., 1988). Ninguno de esos metabolitos produce toxicidad neurológica o general y a nivel periférico el metabolismo de la MPTP actúa como un mecanismo detoxificante (Chiba, K. et al., 1988).

La localización de la MAO-B puede ser determinante de la toxicidad de la MPTP. Sin embargo, esta enzima no se encuentra en gran proporción en las neuronas dopaminérgicas (figura 4), sino que predomina en las neuronas serotoninérgicas (Westlund et al., 1985; Shen et al., 1985; Nakamura y Vincent, 1986), en los astrocitos (Javitch et al., 1985; Schinelli et al., 1988; Glover and

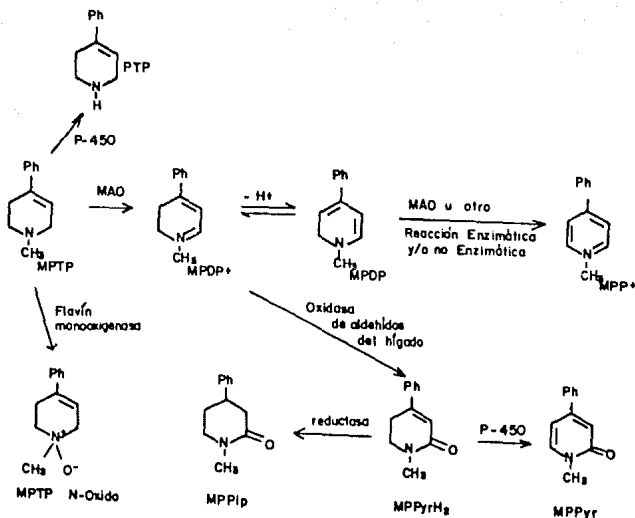


FIGURA 3. Metabolismo de la 1-metil-4-fenil-1.2.3.6-tetrahidropiridina (MPTP) en el hígado formándose diferentes metabolitos que incluyen: MPTP-N-óxido, 4-fenil-1.2.3.6-tetrahidropiridina (PTP), el ión 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-dihidropiridina (MPDP⁺), el ión 1-metil-4-fenilpiridino (MPP⁺), el 1-metil-4-fenil-5,6 dihidro-2 (1H)-piridinona (MPPyH₂), 1-metil-4-fenilpiperidinona (MPPip), el 1-metil-4-fenil-piperidinona (MPPyr) (tomado de Sayre, 1989).

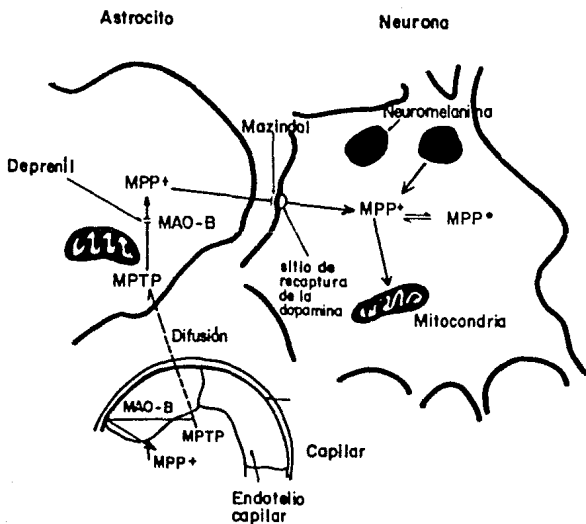


FIGURA 4. Proceso involucrado en la toxicidad de la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) a las neuronas dopaminérgicas. Ión 1-metil-4-fenilpiridino (MPP+), radical 1-metil-4-fenilpiridino (MPP•). (Tomado de Kopin, 1986a).

Sandler, 1986; Ransom et al., 1987; Mytilineou and Friedman, 1988) y en las paredes de los vasos sanguíneos de algunas especies.

Si la MAO-B esta presente en altas concentraciones en los capilares o en los vasos sanguíneos, fuera de la barrera hematoencefálica, la conversión de MPTP a MPP+ en este sitio puede limitar la entrada de la toxina al cerebro. Harik y col. (1987a) atribuyen la resistencia de la rata a los efectos tóxicos de la administración sistémica de MPTP a una barrera enzimática resultante de altos niveles de MAO-B en los capilares del cerebro de la rata.

El MPP+ es un compuesto polar que difunde con dificultad a través de las membranas lipídicas, sin embargo, sale de las neuronas serotoninérgicas y de los astrocitos para concentrarse selectivamente por el sistema de recaptura de la dopamina en las neuronas dopaminérgicas (Javitch and Snyder, 1984; Javitch et al., 1985; Schinelli et al., 1988; Chiba, et al., 1985) donde es secuestrado (Markey et al., 1984; Johannessen et al., 1985; Kopin, 1986), localizándose en las vesículas con la dopamina (Keller and Da Prada, 1985), concentrándose en la mitocondria (Ramsey and Singer, 1986) o uniéndose con alta afinidad a la neuromelanina que está presente en los cuerpos neuronales de los mamíferos superiores (D'Amato et al., 1986; D'Amato et al., 1987a). Si se dan inhibidores del sistema de recaptura de la dopamina (por ejemplo, el mazindol) se evita el daño a las neuronas dopaminérgicas (Javitch, et al., 1985) indicando que este paso es importante para la toxicidad.

2.5. MECANISMOS DE NEUROTOXICIDAD DEL ION 1-METIL-4-FENILPIRIDINO (MPP+).

Se ha encontrado que el MPP+ es una toxina potente en células mesencefálicas en cultivo (Mytilineou, C. and Cohen, G., 1984; Mytilineou, C. et al., 1985) y en hepatocitos (Di Monte, D. et al., 1987; Di Monte, D. et al., 1986; Di Monte et al., 1986a; Smith, M. et al., 1987; Di Monte, D. et al., 1988). La administración directa del MPP+ en diferentes áreas cerebrales (Heikkilä, R. et al., 1985; Heikkilä, R. et al., 1985a; Sayre, L. et al., 1986; Bradbury, A. et al., 1986; Bradbury A. et al., 1986a; Wagner, . et al., 1986; Sundstrom, E. et al., 1986; Harik, S. et al., 1987; Namura, I et al., 1987; Chang, G. and Ramirez, V., 1987; Tadano, T. et al., 1987; Gibb, W. et al., 1988; Sirinath-singhji, D. et al., 1988) ejerce efectos neurotóxicos a largo plazo. Estos hallazgos han conducido a que el MPP+ se considere el responsable de la toxicidad de la MPTP. Sin embargo, los mecanismos de toxicidad celular debidos al MPP+ se desconocen, aunque se han propuesto una serie de hipótesis al respecto que a continuación se mencionan.

El primer mecanismo de toxicidad considerado para el MPP+ fue el de un estrés redox, como el que ocurre con el paraquat (una molécula estructuralmente parecida al MPP+), formándose durante este ciclo radicales del oxígeno que son citotóxicos. Por otro lado, se encontró que el MPP+ inhibe la cadena respiratoria (Nicklas, W. et al., 1985; Poirier, J. and Barbeau, A., 1985; Ramsay, R. et al., 1986a; Vyas, I. et al., 1986; Ramsay, R. et

al., 1987), por su acumulación en la mitocondria (Ramsay, R. and Singer, T., 1986). Esto provocaría la disminución en la producción de ATP (Di Monte, D. et al., 1986a; Smith, M. et al., 1987; Kindt, M. et al., 1987; Nicklas, W. et al., 1987; Cheeseman, A. and Clark, J., 1987) y como consecuencia el dano celular.

2.5.1 Hipótesis estres redox

A continuación se detallan evidencias a favor y en contra de esta hipótesis. La formación de radicales libres (ver apéndice 4) es un mecanismo mediador de los efectos tóxicos de una gran variedad de sustancias (Trush et al., 1982). La similitud en la estructura del MPP+ y el paraquat sugiere que los mecanismos de toxicidad pueden ser similares (Kopin et al., 1985; Fischer, F. and Summers, L. 1980; Elstner, E. et al., 1980). Bus y col. (1976) propusieron que los efectos tóxicos del paraquat son mediados por un estres redox y que en presencia de oxígeno se forman radicales superóxido. Después de la disminución en los antioxidantes protectores endógenos, se forman los radicales hidroxilo, superóxido y el peróxido de hidrógeno, que causan la peroxidación de lípidos de la membrana, dañando el DNA y RNA, o bien inactivando enzimas vitales. En el metabolismo normal las enzimas superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa previenen la acumulación de radicales libres (ver apéndice 5).

Debido a la analogía estructural del paraquat (PQ) y el MPP+, se ha propuesto que este último puede mediar su toxicidad por el estres redox. En el caso del paraquat la molécula se reduce formando radical PQ^{•+}, que es reoxidado a PQ²⁺ por el O₂ formán-

dose el radical superóxido (O_2^-). El superóxido es convertido a

H_2O_2 y subsecuentemente a radical hidroxilo, conduciendo a la

peroxidación de lípidos de las membranas celulares.

La hipótesis de estrés redox para la toxicidad del MPP⁺ relaciona la formación de radicales libres y mecanismos de oxidativos que pueden ser responsables de la disminución de las neuronas de la sustantia nigra con la edad (Mann, D and Yates, P., 1983) (figura 5).

Las evidencias de un papel del estrés redox del MPP⁺ son indirectas:

-Se ha demostrado la formación de radicales libres en presencia de MPTP, MPDP⁺ y MPP⁺. En la transformación del MPDP⁺ a MPDP radical, se puede reducir el oxígeno y así formar el radical superóxido (Chacón, J. et al., 1987). El MPDP produce MPP radical en presencia de MPP⁺ (Rossetti, Z. et al., 1988) o de iones fierro (Korytowski, W. et al., 1987). A su vez en la reducción de MPP⁺ a MPP radical se forma el radical superóxido (Chacón, J. et al., 1987), o bien se forma el radical hidroxilo y también superóxido en presencia de citocromo P-450 reductasa (Sinha, B et al., 1986).

En el caso de la MPTP, se forma el radical superóxido en presencia de metales reactivos (Poirier, J. et al., 1985).

El MPDP⁺ reacciona con la melanina y cataliza la formación del radical superóxido (Korytowski, W. et al., 1988). Indicando que el MPP⁺ es capaz de participar en el ciclo redox, y que el MPDP⁺ puede estar involucrado en su iniciación.

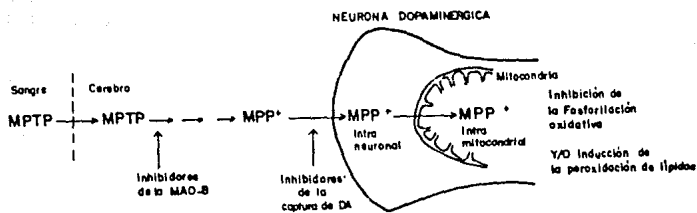


FIGURA 5. Ilustración de los posibles mecanismos neurotóxicos de la 1-metil-4-piril-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), la inhibición de la fosforilación oxidativa y/o inducción de la peroxidación de lípidos. Ion 1-metil-4-pirilpiridino (MPP+), dopamina (DA) (tomado de Ueffach, 1991).

-El peróxido de hidrógeno es un compuesto importante porque media la formación de radicales libres. En el caso de la MPTP, cuando se metaboliza a MPP⁺ se produce el peróxido de hidrógeno en astrocitos, neuronas serotoninérgicas y células endoteliales (Chiba, K. et al., 1985a; Westlund, K. et al., 1985). La producción de H₂O₂ puede generar especies reactivas del oxígeno.

como son los radicales hidroxilo (Cohen, G., 1985). El potencial oxidativo del H₂O₂ puede explicar la toxicidad en astrocitos y células endoteliales inducida por la MPTP (Adams, J. et al., 1989).

-Un inhibidor de la superóxido dismutasa, el dietilditiocarbamato, potencia la neurotoxicidad de la MPTP (Corsini, G. et al., 1985; Pikarsky, E. et al., 1987). Este efecto puede indicar que la superóxido dismutasa es crítica para la protección de la toxicidad de la MPTP, probablemente por la detoxificación del radical superóxido.

-Los antioxidantes protegen de la neurotoxicidad sistémica de la MPTP (Perry, T. et al., 1985; Wagner, G. et al., 1985). Con uno de los antioxidantes más importantes, la vitamina E, se ha demostrado que en animales con deficiencia de esta vitamina tienen elevadas tasas de generación de radicales superóxido después de la administración de la MPTP (LeBel, C. et al., 1989). Por otra parte, la toxicidad de la neurotoxina se ha encontrado que se potencia en animales deficientes en vitamina E (Odunze, I. et al., 1990). Esto puede estar indicando que la MPTP

induce dano oxidativo.

Otro antioxidante importante es la vitamina C, del que se ha demostrado su efecto protector contra la toxicidad de la MPTP (Perry, T. et al., 1985; Sershen, H. et al., 1985; Wegner, G. et al., 1985).

-La administración de (-)-2-oxo-4-tiazolidine carboxilato (Wiener, H. et al., 1988), precursor del glutatión, incrementa los niveles cerebrales del aminoácido y atenúa la disminución de la DA en cuerpo estriado y sus metabolitos inducida por MPTP. Esto demuestra que el glutatión es un factor crítico en la toxicidad de la MPTP. De la misma manera, se ha reportado que la MPTP disminuye el glutatión en mesencéfalo, pero no en cuerpo estriado (Yong, V. et al., 1986; Ferraro, T. et al., 1986).

-La peroxidación de lípidos puede ser una secuela de la fuerza oxidativa, especialmente en animales deficientes en vitamina E. Una medición indirecta de la peroxidación de lípidos in vivo es la acumulación de la lipofuscina; se ha encontrado que hay un incremento en este tipo de depósito en la sustancia nigra y en la retina después de la administración de MPTP (Mariani, A. et al., 1986; Elsworth, J. et al., 1987). En homogenados de cerebro completo, se encontró que el MPP+ estimula la peroxidación de lípidos (Rios, C. and Tapia, R., 1987), pero la MPTP inhibe ese proceso (Rios, C. and Tapia, R., 1987; Lambert, C. and Bondy, S.C., 1989).

Sin embargo, hay otras evidencias en contra de la participación de los radicales libres en la neurotoxicidad de la MPTP.

-Algunos grupos de investigación no encuentran protección con antioxidantes (Martinovits, G. et al., 1986). Sin embargo, los datos en la literatura muestran que los resultados negativos con la vitamina E, vitamina C, beta-caroteno, N-acetilcisteína y otros antioxidantes son preliminares, porque no se demostró la entrada de los antioxidantes en el cerebro antes de probar el efecto de estos sobre la toxicidad de la MPTP.

-En cultivo de células de mesencéfalo se ha demostrado que los antioxidantes no protegen contra la toxicidad de la MPTP o el MPP+ (Sánchez-Ramos, J. et al., 1988; Mytilineou, C. et al., 1988).

-Químicamente, es imposible que el MPP+ participe en el ciclo redox, porque para que se lleve a cabo fisiológicamente la reducción de MPP+ y así que se formen los radicales libres, se necesita de un potencial electroquímico elevado (Frank, D. et al., 1987; Elstner, E et al., 1980).

-El dietilditiocarbamato produce retención de la MPTP y el MPP+ en el tejido (Irwin, I. et al., 1987) y esto puede producir la toxicidad.

-La MPTP y el MPP+ no inducen fuerza oxidativa en hepatocitos (Smith, M. et al., 1987).

-La administración sistémica de MPTP no forma peróxidos lípidos medidos (Corongiu, F. et al., 1987) a través de la técnica de dienos conjugados.

- La administración de algunas drogas que incrementan el conte-

niao de glutation intracelular no protegen de la neurotoxicidad de la MPTP (Perry, T. et al., 1986).

2.5.2. Posible papel de la neuromelanina en la neurotoxicidad de la MPTP.

Las neuronas de la sustantia nigra de mamíferos superiores (mono, hombre, perro) se distinguen de las de los mamíferos inferiores (puerco de guinea, rata, ratón) por la presencia de polímeros oscuros, y que se denominan neuromelanina. Este compuesto es un complejo químicamente heterogéneo que contiene gránulos de lipofuscina y quinonas que se forman por la autooxidación de las catecolaminas (Barden, H. and Levine, S., 1983; Rodgers, A. and Curzon, G., 1975; Graham, D., 1978). Se ha demostrado que los complejos de melanina contienen radicales libres y quinonas reactivas redox (Graham, D., 1978; Sealy, R., et al., 1982; Baldry, P. and Swan, G., 1977; Crippa, P. and Mazzini, A., 1983; Swan, G. and Waggott, A., 1970; Graham, D., 1984). El papel fisiológico de la neuromelanina es desconocido pero se ha propuesto que es un producto no funcional (Graham, D., 1978, 1979) o un protector, porque atrapa especies tóxicas del oxígeno (Goodchild, N. et al., 1981; Korytowski, W. et al., 1985) y/o quinonas reactivas derivadas de las catecolaminas. El contenido de neuromelanina se incrementa con la edad del animal (Graham, D., 1979), lo que sugiere que puede tener un papel importante en los estados degenerativos relacionados con la edad, de origen natural o ambiental (Mann, D. and Yates, P., 1983a). Recientemente se demostró que la disminución de las neuronas dopaminérgicas

incrementa en proporción al contenido de neuromelanina (Hirsch, E. et al., 1988).

Snyder propuso que la alta afinidad del MPP⁺ a la neuromelanina puede explicar la selectividad de la MPTP para dañar los cuerpos celulares de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra (Snyder, S. and D'Amato, R., 1986; Javitch, J. and Snyder, S., 1984; Javitch, J. et al., 1985; D'Amato, R. et al., 1986; D'Amato, R., 1987; D'Amato, R. et al., 1987a).

2.5.3. Inhibición de la respiración mitocondrial por el MPP⁺.

Otra hipótesis para explicar la toxicidad del MPP⁺, esta en relación a los recientes hallazgos que sugieren que esa neurotoxina es un inhibidor del transporte de electrones en la mitocondria a nivel del complejo I (NADPH-CoQ reductasa) (figura 5), esto se ha demostrado en preparaciones de mitocondria de cerebro de rata, ratón o hígado de rata (Nicklas, W. et al., 1985; Poirier, J. and Barbeau, A., 1985; Ramsay, R. et al., 1986b; Vyas, I. et al., 1986; Ramsay, R. et al., 1987; Mizuno, Y. et al., 1987), así como en rebanadas de estriado de rata (Sanchez-Ramos, J. et al., 1988a).

Nicklas y col. (1985) reportaron que el MPP⁺ inhibe casi completamente la oxidación de los sustratos unidos a NAD⁺ como son el piruvato/malato y glutamato/malato, que ceden equivalentes reductores hacia la cadena de transporte de electrones a través del complejo I. Mientras la oxidación del succinato que involucra el paso de equivalentes reductores a la coenzima Q (CoQ) via el complejo II, no se encuentra inhibida.

Para que los efectos mencionados puedan llevarse a cabo es

necesario que el MPP+ se concentre en la mitocondria. Esta concentracion se lleva acabo por un sistema de transporte dependiente de energia (Ramsay, R. and Singer, T., 1986).

Se ha sugerido que el MPP+ no inhibe la reduccion de ferricianuro (Ramsay, R. and Singer, T., 1986), indicando que el sitio de inhibicion del MPP+ en el Complejo I esta entre el potencial más alto del grupo Fe-S de la NADH deshidrogenasa y CoQ, probablemente cerca o en el sitio de union de la rotenona (Ramsay, R. et al., 1987), porque administrando estereotaxicamente en el mesencéfalo de la rata inhibidores del sitio I como la rotenona, barbituricos y ptericidina A, se produce daño a las neuronas dopaminérgicas como sucede con el MPP+. Por otro lado, los iones de calcio también interfieren con la captura del MPP+ en mitocondrias aisladas de rata (Frei, B. and Richter, C., 1986) debido a que este catión puede competir por el mismo gradiente electroquímico. En otros estudios se ha encontrado que el MPP+ produce cambios metabólicos (ejemplo acumulacion de lactato) en rebanadas de neocórtex de rata que conducen a la disminucion de la energia almacenada (Vyas, I. et al., 1986; Ramsay, R. et al., 1987; Nicklas, W. et al., 1987). Se ha demostrado que los efectos citotóxicos de la MPTP/MPP+ en hepatocitos de rata, producen disminucion del ATP, evento que ocurre antes de la muerte celular (DiMonte, D. et al., 1987; Chacon, J. et al., 1987). También se ha observado que aunque el MPP+ y el paraquat tienen actividades citotóxicas similares, los mecanismos que conducen a la muerte celular pueden ser distintos (DiMonte, D. et al., 1986).

Estudios recientes con hepatocitos aislados sugieren que los

eventos bioquímicos que directamente conducen a la muerte celular son debido a cambios en la concentración de calcio intracelular como son un incremento del calcio citosólico y una disminución del calcio mitocondrial, que disminuye la salida del catión a través de la membrana celular (Kass, G., 1988). Este hallazgo sugiere que el desequilibrio en la entrada o salida de calcio puede ser el mecanismo de muerte celular en la neurotoxicidad producida por MPTP (Frei, B. and Richter, C., 1986).

Pocos experimentos han investigado los efectos in vivo de la MPTP en la función mitocondrial. Sin embargo, la inhibición in vivo de la respiración mitocondrial por MPTP pueden ser de duración corta (unas pocas horas) con un retorno total de la función pocos días después del tratamiento (Mizuno, Y. et al., 1988). Un estudio ha reportado cambios en las mitocondrias cerebrales después de la administración de la MPTP a monos (Nakamura, H et al., 1989). Esos cambios no son similares a los observados en el ratón (Adams, J. D. et al., 1989). Es posible que esos cambios inducidos por MPTP sean transitorios y no pueden explicar completamente los efectos a largo plazo.

3. OXIDANTES, METALES Y CEREBRO

El cerebro y el sistema nervioso periférico son susceptibles al daño producido por los radicales libres, debido a las siguientes razones: ciertas áreas del sistema nervioso central, como son los ganglios basales, son áreas blanco para la acción degenerativa de los radicales libres, debido a su elevado contenido y consumo de oxígeno, alto contenido de metales como el

hierro y el cobre, que conducen a la formación de H_2O_2 y OH^- .

(Riederer, P. et al., 1989; Donaldson and Barbeau, 1985; Youdim, 1985). Esto puede causar que los lípidos de las membranas que son muy ricos en ácidos grasos poliinsaturados sean susceptibles al mecanismo de peroxidación de lípidos (Halliwell and Gutteridge, 1985).

El cerebro tiene poca actividad de catalasa, enzima responsable de la descomposición del H_2O_2 y prevención del daño celular (Chance, B. et al., 1979) y tiene solo pequeñas cantidades de las enzimas superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa (Cohen, G., 1988).

Ciertas áreas del cerebro como el globus pallidus y la sustantia nigra son ricas en hierro, sin embargo, el líquido cefaloraquídeo no tiene la capacidad para unir al hierro. Gran cantidad de este metal a nivel cerebral está unido a las proteínas, pero se conoce poco sobre su naturaleza molecular (Youdim, M., 1988).

El hierro tiene un papel esencial en el aprendizaje y la memoria, porque se requiere para la unión de algunos neurotransmisores a sus receptores (Youdim, M., 1988).

El alto contenido de hierro en el cerebro es esencial, pero también puede causar daño a las células que pueden liberar los iones de hierro y así estimular las reacciones de los radicales libres.

3.1. DAÑO OXIDATIVO Y ENFERMEDAD DE PARKINSON

Hay un gran interés sobre el posible papel de las neurotoxinas en la generación de la EP, especialmente desde el descubrimiento de la MPTP (Langston, J. et al., 1987; Singer, T. et al., 1987).

Es posible que las reacciones de los radicales libres dependientes de hierro puedan contribuir al daño de las células de la sustantia nigra en la EP.

Dexter y col. (1989) han reportado un aumento de hierro en las sustantia nigra y disminución cerebral del contenido de ferritina en el cerebro de pacientes parkinsoníacos, especulándose que el incremento de la peroxidación de lípidos dependiente de hierro puede contribuir a la destrucción celular. Pall y col. (1987) no encontraron cambios en la cantidad de hierro presente en el líquido cefalorraquídeo de pacientes parkinsoníacos, pero sí un aumento en el contenido de cobre en el líquido cefalorraquídeo. Riederer y col. (1989) reportaron incremento del hierro en la sustantia nigra y de la ferritina en el cerebro de parkinsoníacos, así como un decremento en el contenido de glutatión reducido (Riederer, P. et al., 1989). El daño a las células de la sustantia nigra puede producir la liberación de hierro y así generar más reacciones de los radicales libres.

Por otro lado, hay que recordar que ciertas drogas como la clorpromazina, tienen la capacidad de transportar iones de metales dentro y fuera del cerebro (Blake, D. et al., 1985; Weiner, W. et al., 1977). Esto es de gran interés para poder interpretar los cambios en los cerebros de pacientes con la EP que han sido tratados con este tipo de drogas.

4. PEROXIDACION DE LIPIDOS

4.1. QUIMICA DE LA PEROXIDACION

La fluidez de la membrana proporciona las propiedades esenciales para el funcionamiento de la célula (Finean, J. et al., 1979), como son la difusión del agua, el funcionamiento de las proteínas asociadas a la membrana (receptores, transportadores, enzimas), la unión de la membrana y su fusión. En las eucariotas, la fluidez de la membrana esta dada por los ácidos grasos poliinsaturados.

La estructura general de los ácidos grasos poliinsaturados se muestra en la figura 6. La presencia de un doble enlace en la unión del hidrógeno y en el carbón alílico produce que esos hidrógenos alílicos, sean sustraídos por especies químicamente reactivas que contienen uno o más electrones desapareados (radicales libres) (Bus, J. and Gibson, J. 1979; Demopoulos, H., 1973). El radical lípido formado reaccionará con el oxígeno molecular en la primera de las reacciones que producen el rompimiento de la estructura de los AGP. Esta secuencia de reacciones se denomina peroxidación de lípidos.

4.2. REACCIONES DE LA PEROXIDACION DE LIPIDOS

Las reacciones de la peroxidación de lípidos se han dividido en tres etapas conocidas como: iniciación, propagación y terminación (figura 7).

1. En la etapa de iniciación un lípido de los ácidos grasos poliinsaturados reacciona con un radical libre, formándose un

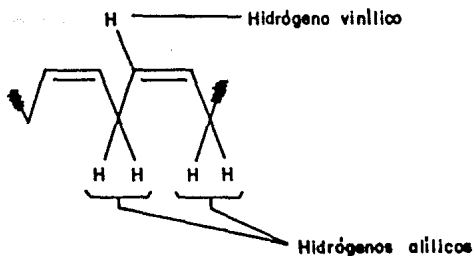


FIGURA 6. Estructura de los 6cidos grasos poliinsaturados que facilitan la iniciaci6n de la peroxidaci6n de l6pidos (tomado de Horton and Fairhurst, 1987).

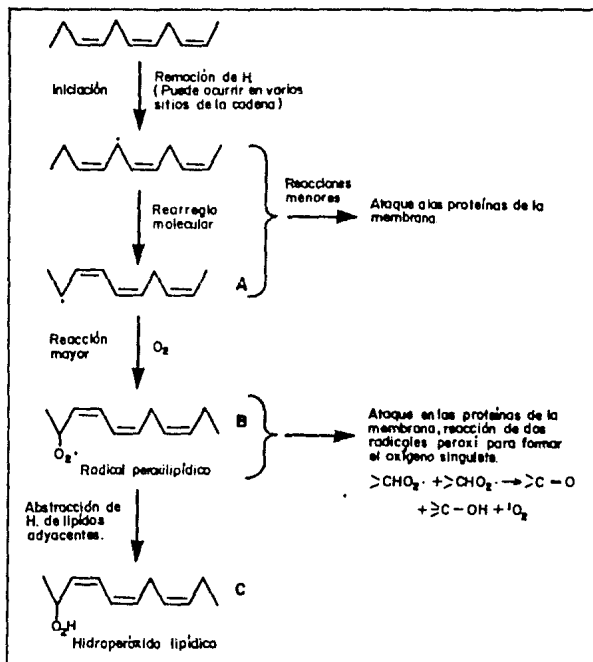


FIGURA 7. Formación de radicales lipídicos, radicales peroxilípidicos e hidropéroxidos lipídicos en la secuencia de reacciones que constituyen la peroxidación de lípidos (tomado de Horton and Fairhurst, 1967).

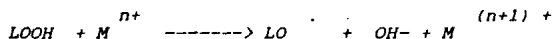
radical lípido, que después reacciona con el oxígeno molecular y forma un radical peroxilípido.

2. En la etapa de propagación reacciona un radical peroxilípido con otro ácido graso poliinsaturado produciendo un hidroperóxido lípidico y un radical lípido.

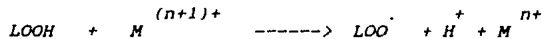
3. La etapa de terminación se lleva a cabo cuando 2 radicales se combinan y forman un producto no radical.

El número de radicales formados en la reacción en cadena no se altera durante la propagación, pero se incrementa con el rompimiento de los hidroperóxidos.

La descomposición de los hidroperóxidos lípidicos es catalizada por metales de transición, principalmente el hierro y el cobre, de acuerdo a las siguientes reacciones.



Hidroperóxido	Radical
lípidico	Alcoxil



Hidroperóxido	Radical
lípidico	peroxil

Algunos de los productos de la peroxidación de lípidos son los epóxidos lípidicos, los hidroperóxidos, los epoxi alcoholes, el malondialdehído, el etano, el pentano y el 4-hidroxi-alqueno

(Dahle, L. et al., 1962; Mead, J. et al., 1979; Benedetti, A. et al., 1980).

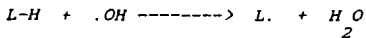
4.2.1. Iniciación de la peroxidación de lípidos

Para que inicie la peroxidación de lípidos se necesita de la presencia de los radicales libres, sin embargo, no todos son suficientemente reactivos para iniciar la reacción en cadena, por ejemplo, el radical O_2^- , sólo tiene un electrón reducido que no es suficiente para iniciar la peroxidación de lípidos (Fee, J., 1981; Fong, .K. et al., 1973). El oxígeno triplete no es muy reactivo con los ácidos grasos poliinsaturados, por lo que no es suficiente para causar peroxidación de lípidos (McCay, P. and Poyer, J., 1976).

Los metales, como el fierro en forma reducida (Fe^{2+}) presente en el sistema NADPH (Hochstein, P. et al., 1963) es necesario para que se inicie la peroxidación de lípidos.

4.2.1.1. Especies reactivas que inician la peroxidación de lípidos.

La irradiación de alta energía en soluciones acuosas produce radicales $\cdot OH$ altamente reactivos que pueden atacar todas las moléculas biológicas, incluyendo los lípidos de la membrana y así iniciar la peroxidación de lípidos.



Este mecanismo probablemente inicia la peroxidación de lípidos en organismos irradiados, sin embargo, en varios estudios biológicos se ha involucrado a los metales de transición.

En las fracciones de las membranas se pueden formar los radicales $\cdot\text{OH}$ cuando se produce la reducción del O_2 al radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ produciéndose el H_2O_2 que puede reaccionar con el Fe^{2+} ó con el Cu^+ y generar esos radicales. En la figura 8 se muestran algunas de las reacciones que ocurren en estos sistemas de peroxidación.

Los radicales $\cdot\text{OH}$ participan en la peroxidación dependiente de los metales iónicos, pero no son necesarios para que inicie el evento, porque la adición de atrapadores de este radical o de la catalasa (para remover H_2O_2 y bloquear la formación del radical $\cdot\text{OH}$) en ocasiones inhiben el proceso (Gutteridge, J., 1988; Minotti, G. and Aust, S., 1987). Como puede observarse en la figura 8 se pueden formar otras especies reactivas además del radical $\cdot\text{OH}$, como el perferril y el ferril (donde el hierro tiene un número de oxidación +4).

Se ha propuesto que el perferril es una especie pobremente reactiva que no puede abstraer hidrógeno (Halliwell, B. and Gutteridge, J., 1989), aunque se puede descartar su participación para iniciar la peroxidación de lípidos. La peroxidación iniciada por el Fe^{2+} se incrementa si esta presente el Fe^{3+} . Esto sugiere que el iniciador de la peroxidación de lípidos es un complejo $\text{Fe}^{2+} + \text{O}_2$ (Minotti, G. and Aust, D., 1987), sin embargo, hay que considerar que otros iones metálicos (como el Pb^{2+}) pueden reemplazar al Fe^{3+} y estimular ese mecanismo por dependencia del Fe^{2+} (Aruoma, O. et al., 1989).

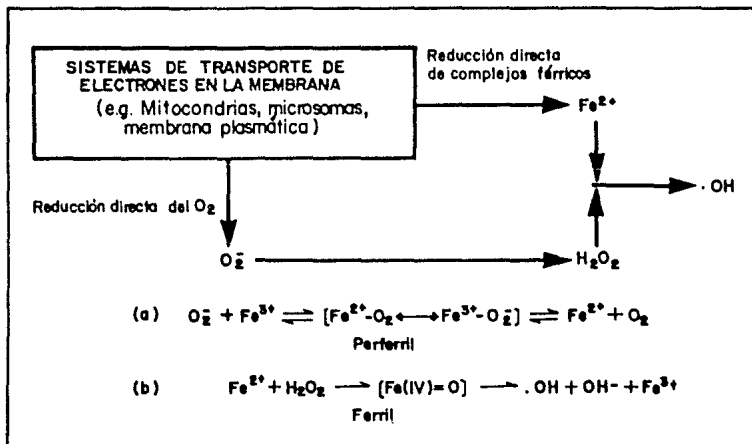


FIGURA 8. Generación del radical hidroxilo dependiente de hierro y de otras especies reactivas en sistemas de membranas biológicas. Pueden ocurrir reacciones comparables con los iones cobre aunque existe un debate considerable de si se forman los radicales hidroxilo. (a) El radical superóxido puede reducir Fe (III) a Fe (II) siendo el perferril un intermediario. Es posible la reducción directa de quelantes de metales por sistemas reductores unidos a la membrana o por agentes reductores adicionados (por ejemplo el ascorbato, al cisteína). (b) la reacción de Fenton, muestra que el ferril es un intermediario en la formación de radicales $\cdot\text{OH}$ del peróxido de hidrógeno en combinación con el Fe (II) (tomado de Gutteridge and Halliwell, 1990).

Por otro lado, las células contienen enzimas (ciclooxigenasas y lipoxigenasas) que producen peróxidos con importantes funciones biológicas (por ejemplo los eicosanoides). Esas enzimas se pueden activar por el daño celular.

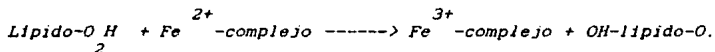
La peroxidación de lípidos catalizada por enzimas puede estimularse cuando se produce la salida de los metales de transición de las células dañadas. Así, la iniciación en esos sistemas puede llevarse a cabo adicionando metales que estimulan la peroxidación por descomposición de los peróxidos a radicales que son capaces de abstraer hidrógeno (LO_2 , LO_2) y continuar la reacción en cadena.

4.2.2. Propagación de la peroxidación de lípidos. Ruptura de los hidroperóxidos lipídicos.

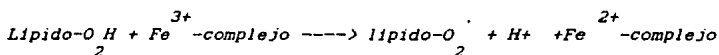
Los hidroperóxidos lipídicos formados durante la peroxidación de lípidos son estables (Wills, E., 1969), pero su descomposición es catalizada in vivo por la presencia de complejos de metales de transición. En la ruptura de los hidroperóxidos lipídicos se producen radicales libres en la membrana produciendo las reacciones en cadena y estimulando la peroxidación de lípidos.

La ruptura de los hidroperóxidos lipídicos puede ser más eficiente si se incluyen complejos de sales de hierro con iones fosfato o ésteres de fosfato como el ADP. Pueden también utilizarse la hemoglobina, la metahemoglobina, la peroxidasa, el citocromo P-450, otros citocromos y proteínas que contienen hierro (O'Brien, 1969; Kaschnitz and Hatefi, 1975; Gutteridge, 1977; Aust and Svingen, 1982); de esta manera se puede contribuir

a la propagación de la peroxidación de lípidos de las membranas. La lactoferrina y la transferrina no estimulan la descomposición de los hidroperóxidos (Gutteridge et al., 1981), pero la ferritina estimula el proceso (Gutteridge et al., 1983). Los compuestos que contienen hierro reducido reaccionan con los hidroperóxidos lipídicos (lípidO-O₂H) y forman los radicales alcoxi (lípidO-O₂·).



El hierro III forma el radical peroxi (lípidO-O₂·):



Los radicales alcoxi y peroxi estimulan la reacción en cadena por la abstracción de los átomos de hidrógeno.

El EDTA y el DATAPAC incrementan o inhiben la peroxidación de lípidos estimulada por sales de hierro, este efecto se produce dependiendo de la concentración del agente quelante, pero la desferrioxamina inhibe a cualquier concentración probada (Wills, 1969; Gutteridge et al., 1979).

Las sales de cobre también estimulan la descomposición de los peróxidos (Gutteridge, 1977; Sree Kumar et al., 1978).

El radical O₂· puede participar en la ruptura de los hidroperóxidos lipídicos mediante la siguiente reacción (Thomas, M. et

que pueden atravesar el enlace de las proteínas inactivando enzimas y produciendo agregados fluorescentes de alto peso molecular connotados como ceroides, gránulos de lipofuscina o pigmento de la edad (Tappel, A., 1973; Mead, J., 1976; Shimasaki, H. et al., 1984). El malondialdehído puede atravesar el enlace de los grupos amino de la fosfatidiletanolamina y de otras proteínas que rompen la estructura de la membrana (Koster, J. and Slee, R., 1980; Jain, S. et al., 1983; Jain, S., 1984). Puede interactuar con el DNA y producir productos fluorescentes (Brooks, B. and Klammerth, O., 1968; Summerfield, F. and Tappel, A., 1984). La fluorescencia de las bases de Schiff producidas durante la peroxidación se utiliza como índice de la peroxidación de lípidos (Fletcher, B. et al., 1973; Tappel, A., 1982; Dillard, C. and Tappel, A., 1984). Se pueden formar otros productos fluorescentes debido a la reacción del malondialdehído con aminas primarias produciendo el 1,4-dihidropiridina-3,5-dicarbaldéhído el DNA puede también formar compuestos fluorescentes cuando reacciona con el malondialdehído y con otros productos de la peroxidación de lípidos (Fujimoto, K. et al., 1984).

Sin embargo, se pueden generar grupos tóxicos cuando reaccionan el glutatión o los grupos -SH de las proteínas con el (4-hidroxiacetalqueno Benedetti, A. et al., 1980) y con el malondialdehído produciendo algunos efectos tóxicos en la membrana de la célula.

Los efectos de la peroxidación de lípidos incluyen fragmentación y destrucción de la enzima citocromo P-450 (Högberg, J. et al., 1973), disminución de la actividad de la enzima glucosa-6-

fosfatasa y de la UDP-glucuronil transferasa (Hogberg, J. et al., 1973; de Groot, H. et al., 1985; Ferrali, M. et al., 1980). Hay inactivación de la ATPasa-Ca²⁺ de la membrana plasmática

debido a la oxidación de los grupos -SH de la enzima (Jones, D. et al., 1983), que conduce a una deficiencia en la homeostasis del calcio citosólico. Los ribosomas empiezan a separarse del retículo endoplásmico (Palmer, D. et al., 1978). En la mitocondria, se observa hinchazón de la membrana, deterioro del transporte de electrones y lisis del organelo (Hunter, F. et al., 1963). En los lisosomas se presenta lisis y liberación de enzimas (Fong, K. et al., 1973; Wills, E. and Wilkinson, A., 1966). Las enzimas citosólicas que contienen grupos SH pueden inactivarse (Chio, K. and Tappel, A., 1969).

El malondialdehído es mutágeno (Mukai, F. and Goldstein, B., 1976) y carcinogénico. Sin embargo, parece que el efecto mutagénico del malondialdehído es debido a contaminantes que incluyen el beta-alcoxyacrolein y el aldehído 3,3-dialcoxiopropión (Marnett, L. and Tuttle, M., 1980).

4.4. PEROXIDACION DE LIPIDOS EN MEDICINA

Existe un gran interés por el papel que tiene la peroxidación de lípidos y las reacciones de los radicales libres en la enfermedad y en la toxicología (Halliwell, B., 1987; Orrenius, S. et al., 1989; Halliwell, B. and Gutteridge, J., 1984; Steinberg, D. et al., 1989; Burton, G. and Ingold, K., 1986; McCay, P., 1985).

La medición de los productos terminales de la peroxidación de lípidos en el material humano es de gran apoyo para asociar a la

participación de las reacciones de los radicales libres con el daño al tejido por enfermedad o por toxinas. Los inicios de estos estudios en los 50's apoyan en gran medida su participación como mecanismo de toxicidad de algunos compuestos como el tetracloruro de carbono (Slater, T. and Sawyer, B., 1971) y probablemente para el bromobenceno (Comporti, M., 1987).

La peroxidación de lípidos frecuentemente es (aunque no siempre) un evento tardío que acompaña la muerte celular (Halliwell, B. and Gutteridge, J. 1989; Halliwell, B. and Gutteridge, 1984; Cochrane, G. et al., 1988). La destrucción de la célula y del tejido (si es mediada por radicales u otros agentes o mecanismos) puede aumentar su extensión, como ocurre durante la aterosclerosis (Steinberg, D. et al., 1989). En esta enfermedad los antioxidantes están presentes en poca proporción y los metales de transición que pueden estimular la peroxidación de lípidos, se liberan de las células destruidas (figura 9).

Hay evidencias de que el daño producido por un trauma al cerebro y a la médula espinal conduce a la liberación de los iones hierro en el área circundante extendiéndose el daño por reacciones de los radicales libres estimuladas por el hierro (Halliwell, B., 1989).

En otras enfermedades este tipo de reacciones no contribuye a la patología de la enfermedad (Halliwell, B. and Gutteridge, J., 1984).

Para medir esos procesos en las células y tejidos se requiere de métodos que desafortunadamente son poco adecuados, pero se han desarrollado algunos para estudiar este fenómeno.

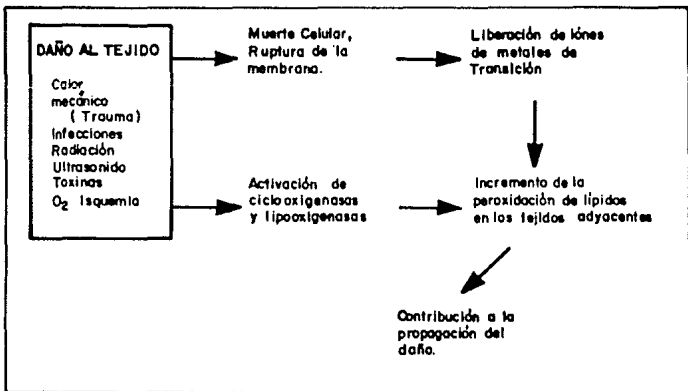


FIGURA 9. Diagrama que muestra como la muerte celular puede incrementar las reacciones de los radicales libres en los tejidos adyacentes. Algunas veces esto puede producir un daño considerable al tejido y en otras situaciones puede ser de consecuencia no biológica (tomado de Gutteridge and Halliwell, 1990).

4.5. DETECCIÓN Y MEDICIÓN DE LA PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS

La oxidación de los lípidos se puede medir en diferentes fases, que incluyen la disminución de los ácidos grasos insaturados, la medición de los productos primarios de la peroxidación de lípidos y medición de carbonilos secundarios y de gases hidrocarburos. Entre estas fases se pueden detectar los radicales con el carbono ó el oxígeno en el centro (por la técnica de resonancia spin electrón: ESR) además de identificarlos por su espectro de ESR (Davies, M., 1987).

Entre los métodos más usados están los siguientes:

1- Análisis titrimétrico usando liberación de yoduro: mide peróxidos lipídicos que oxidan el I^- a I_2 . Este método puede ser aplicado a extractos de muestras biológicas si otros agentes oxidantes están ausentes (Thomas, S. et al., 1989).

2-Glutatión peroxidasa (GSPasa) mide los peróxidos lipídicos. En esta técnica la GSAasa reacciona con el H_2O_2 y el hidroperóxido, oxidando el glutatión reducido a glutatión oxidado. La adición de glutatión reductasa y NADPH reduce glutatión oxidado a glutatión reducido que resulta en el consumo de NADPH que esta relacionado al contenido de peróxido (Gutteridge, J. and Halliwell, G., 1990).

3-Con la ciclooxigenasa se miden los peróxidos lipídicos. La estimulación de esta enzima se puede usar para medir cantidades traza de peróxidos en fluidos biológicos. La sensibilidad es en picomoles (Marshall, P. et al., 1985).

4-La espectrofotometría de masas por cromatografía gas/líquido (GLC) mide los peróxidos lipídicos. Se realiza la extracción, la reducción a alcoholes y la separación se hace por GLC, realizando la identificación por espectrometría de masas (Hughes, H. et al., 1986; Van Kuijk, F. et al., 1986; Carpenter, K. et al., 1987).

5-La medición del pentano y etano que se forman durante la descomposición de los peróxidos lipídicos (Burk, R. and Ludden, T., 1989) se lleva a cabo por cromatografía de gases (Burk, R. and Ludden, T., 1989).

6-Medición de luz. La reacción de los radicales peróxido puede producir carbonilos en estado excitado y oxígeno singlete, ambas especies emiten luz.

7-Por fluorescencia se miden los aldehídos como el malondialdehído que puede reaccionar con los grupos amino y formar las bases de Schiff (Triggs, W. and Willmore, L., 1984).

8-La formación de dienos conjugados durante la oxidación de los ácidos grasos insaturados se identifica por un incremento en la absorbancia de UV entre 230-235 nm (Corongiu, F. and Milla, A., 1983).

9-La prueba del ácido tiobarbitúrico es de las técnicas más usadas para medir la peroxidación de lípidos. El material es calentado con ácido tiobarbitúrico (TBA) a pH bajo y se mide la formación de un cromógeno rosa a 532 nm. Este cromógeno es formado por reacción de una molécula de malondialdehído con 2 moléculas de TBA que se puede separar por cromatografía de líquidos de

alta resolución (HPLC) (Largilliere, C. and Melancon, S., 1988).

Parte del malondialdehído detectado con esta prueba se forma durante el proceso de peroxidación de lípidos pero también se genera por descomposición de los peróxidos lipídicos durante la fase de calentamiento con el ácido que se acelera por los metales de transición (Gutteridge, J., 1988; Gutteridge, J. and Quinlan, G., 1983) presentes en el TBA, el ácido y las sustancias de la muestra probada. Algunos grupos utilizan antioxidantes con el TBA para estandarizar esos problemas (Gutteridge, J. and Quinlan, G., 1983). Por lo anterior es mejor utilizar el término sustancias reactivas al TBA (TBARS) (Gutteridge, J., 1988; Gutteridge, J. and Quinlan, G., 1983).

Puede notarse que la composición química de los productos terminales de la peroxidación dependerá de la composición de los ácidos grasos y de los iones de metales presentes. Se conoce que los iones de cobre y los iones de fierro producen diferentes productos terminales (por ejemplo cuando se mide por la prueba del ácido tiobarbitúrico, TBA), así los iones de cobre son buenos estimuladores de la peroxidación en las lipoproteínas de baja densidad, pero pobres estimuladores en microsomas, de tal forma que la selección de sólo una prueba puede dar resultados engañosos.

5. HIPOTESIS

Con base en los antecedentes expuestos en los que se describe que el MPP+ es capaz de inducir peroxidación de lípidos en homogenados de cerebro de ratón y de generar radicales libres de oxígeno in vitro. se sugiere que la peroxidación de lípidos inducida por radicales libres puede estar involucrada en las acciones neurotóxicas del MPP+. Por otro lado, la posible participación de este mecanismo sugiere que la acción antiperoxidante del manganeso (II) pueda proteger de la acción neurotóxica del MPP+.

6. OBJETIVOS

-Probar si el MPP+ es un agente lipoperoxidante in vivo en distintas regiones del cerebro.

-Valorar el mecanismo de peroxidación de lípidos por dos índices del proceso. Una de esas técnicas es por el ensayo del ácido tiobarbitúrico y la otra es la acumulación de productos fluorescentes lipídicos.

-Analizar el contenido de dopamina en el cuerpo estriado y correlacionarlos con el grado de peroxidación inducida por la administración intracerebroventricular del MPP+.

-Probar la posible participación del manganeso (II) como agente antiperoxidante en la toxicidad inducida por la administración de la MPTP, analizando el contenido de dopamina en el cuerpo estriado de ratón en animales pretratados con manganeso (II) y administrados subsecuentemente con MPTP.

7. MATERIAL Y METODO

Animales, drogas y reactivos

El yoduro de MPP+ y el clorohidrato de MPTP fueron obtenidos de Research Biochemicals (Wayland, MA), el ácido tiobarbitúrico fue de Sigma (St. Louis, MO.), y todos los demás reactivos se obtuvieron de Merck (Mexico).

Los animales empleados fueron ratones de las cepas C-57 Black y NIH.

Equipo

- Los reactivos fueron pesados en una balanza analítica Bosch S2000.

- La centrifuga Beckman modelo J-21C se empleó para la separación de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico del tejido. En el análisis del contenido de dopamina estriatal utilizamos la centrifuga para poder realizar la extracción de esa catecolamina para su análisis posterior.

- La homogenización de las muestras a las que se les analizó la dopamina se realizó por sonicación con un sistema Labsonic No. 9100 Lab-Line utratip.

- El espectrofotómetro Beckman DU-6 se utilizó para medir la absorbancia en las muestras analizadas con el ensayo del ácido tiobarbitúrico y para el análisis de las proteínas.

- Para la determinación de productos fluorescentes lipídicos se utilizó el espectrofotómetro de fluorescencia MPF 44-A Perkin-Elmer.

- En la determinación de manganeso se empleó un espectrofotómetro

de absorción atómica 360 Perkin-Elmer con horno de grafito Perkin-Elmer HGA-2200.

7.1. EVALUACION DE LA PEROXIDACION DE LIPIDOS POR EL ENSAYO DE LAS SUSTANCIAS REACTIVAS AL ACIDO TIOBARBITURICO (TBARS) DESPUES DE LA ADMINISTRACION DE MPP+.

Con el fin de evaluar el efecto lipoperoxidativo *in vivo* de MPP+, 29 ratones machos de la cepa C-57 black (10 a 12 semanas de edad) fueron anestesiados por exposición a éter e inyectados en el ventrículo lateral derecho usando la técnica descrita por Haley y McCormick (1957) con 3 μ l de una solución que contenía 18 μ g de MPP+. Se ha demostrado que esta dosis induce daño dopaminérgico al ratón (Mihatsch, W. et al., 1988). Otro grupo de animales inyectados de manera similar con 3 μ l de solución salina fisiológica sirvieron como controles. Después de la administración, los ratones de ambos grupos fueron sacrificados por dislocación a tiempos variables (30 y 60 min.) después de la inyección. Los cerebros se extrajeron y se disecaron sobre hielo obteniendo cinco regiones: cerebelo, corteza frontal, mesencéfalo, hipocampo y cuerpo estriado (caudado-putamen), usando la técnica de disección descrita por Glowinski e Iversen (1966).

La peroxidación de lípidos fue evaluada por el ensayo del ácido tiobarbitúrico (Buege and Aust, 1978) para medir el contenido tisular de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).

El tejido de las regiones se homogenizó en 2ml de buffer de fosfatos 0.05 M frío (pH 7) que contenía NaCl (0.015 M) y KCl

(0.145 M). Se separaron alícuotas de 1ml del homogenado, una de ellas se colocó en tubos de centrifuga y a la otra alícuota se le realizó la determinación de proteínas. A las alícuotas colocadas en los tubos se les adicionó 2 ml del reactivo de ácido tiobarbitúrico (TBA) (0.5 g de TBA + 16 g de ácido tricloroacético + 2.5 ml de HCl concentrado en 100 ml de agua) con la finalidad de cuantificar las TBARS en cada tubo. La solución con el homogenado fue calentada en un baño a ebullición durante 30 minutos, enfriada y centrifugada a 2000 g por 10 minutos a 4°C. Al sobrenadante se le midió la absorbancia en un espectrofotómetro Beckam DU -6 a 532 nm. Se prepararon tubos blanco que fueron tratados de la misma forma pero sin tejido. La concentración de TBARS en las muestras se cuantificó usando una curva de calibración de malondialdehído obtenido por oxidación peryódica de la 2-desoxi-D-ribosa. La proteína fue analizada de acuerdo con Lowry (1951). Todas las muestras fueron analizadas por duplicado. Los resultados se expresan como nmol de TBARS formadas por mg de proteína.

7.2. DETERMINACION DE PRODUCTOS FLUCRESCENTES LIPIDICOS (PFL) COMO INDICE DE PEROXIDACION DE LIPIDOS DESPUES DE LA ADMINISTRACION DE MPP+.

Esta serie experimental se llevó a cabo con la finalidad de obtener otro índice de valoración del mecanismo de peroxidación de lípidos.

Se conoce que el malondialdehído, producto terminal de la peroxidación de lípidos, se metaboliza rápidamente in vivo y es capaz

de reaccionar con aminoácidos libres, grupos amino de las proteínas o con las bases de los ácidos nucleicos produciendo bases de Schiff, que son productos fluorescentes.

La formación de productos fluorescentes lipídicos fue monitoreada en este trabajo usando la técnica descrita por Triggs y Willmore (1984). Se repitió el esquema de administración de MPP+ a los ratones descrito anteriormente y se sacrificaron los animales a tiempos variables (0.5, 1, 2, 24 h y 7 días). Después de extraer el cerebro se disecó sólo el tejido estriatal y se pesó en una balanza analítica y se homogenizó en 2.5ml de solución salina. Se tomaron alícuotas de 1ml del homogenado y se colocaron en tubos de vidrio con tapa adicionando 3 ml de una solución de cloroformo-metanol, 2:1 v/v. Los tubos se taparon y la mezcla se agitó suavemente, depositando los tubos en hielo durante 30 minutos para permitir la separación de las fases. La fase acuosa se descartó, transfiriendo la capa clorofórmica a una celda de cuarzo, que contenía 0.1 ml de metanol. La fluorescencia se midió a 370 nm de excitación y 430 nm de emisión en un espectrofotómetro de fluorescencia Perkin-Elmer MPF-44A. Previamente a la medición de las muestras, la sensibilidad del espectrofotómetro de fluorescencia se ajustó a 160 unidades de fluorescencia con un estándar de quinina 0.1 µg/ml preparado en ácido sulfúrico 0.05 M. Los resultados se expresaron como unidades de fluorescencia/gramo de tejido húmedo/ml de extracto leído.

Se valoró la dependencia de la dosis de MPP+ inyectado con esta técnica después de la administración de 3 µl de una solución que contenía 4.5, 9 ó 18 µg de MPP+.

7.3. EFECTO DE LA ADMINISTRACION ORAL DE MANGANESO SOBRE LA NEUROTOXICIDAD DE LA MPTP.

El manganeso (Mn^{2+}) es un elemento traza esencial que se encuentra relacionado con el metabolismo de las monoaminas y participa como agente antioxidante.

Para evaluar el posible efecto protector del Mn^{2+} utilizamos ratones machos cepa NIH (25-30 g) a los que se les administró $MnCl_2$ durante 7 días en el agua de bebida a dosis de 0.5 y 1 mg/ml. Se usaron como controles animales administrados con NaCl (0.5, 1 mg/ml). Posteriormente se les administró diariamente MPTP (30 mg/Kg) via ip durante 3 días; el tratamiento con $MnCl_2$ se continuó hasta el día en que fueron sacrificados los animales. Los animales fueron decapitados 7 días después de la última administración de MPTP y se extrajeron los cerebros y se diseccionó el cuerpo estriado. Se analizó el contenido de dopamina por cromatografía de líquidos de alta resolución como se describe más adelante.

Los grupos experimentales estuvieron organizados de la siguiente manera:

- 1- SALINA + SALINA
- 2- SALINA + MANGANESO
- 3 SALINA + MPTP
- 4- MANGANESO + MPTP

7.4 ANALISIS DEL CONTENIDO DE DOPAMINA ESTRIAL

Con el fin de observar el curso temporal del efecto neurotóxico del MPP+ sobre las neuronas dopaminérgicas, un grupo adicional de 29 animales fue tratado con la misma dosis de MPP+ o solución salina: los ratones fueron sacrificados 2, 24h y 7 días después de la microinyección. Se diseccionó el cuerpo estriado, se pesó y se homogenizó en 500 µl de ácido perclórico (0.4N). El tejido de cada tubo se homogenizó por sonicación manteniendo en hielo la preparación para prevenir el calentamiento, posteriormente se centrifugó a 2000g durante 10 minutos y el líquido sobrenadante se le analizó el contenido de dopamina por cromatografía de líquidos de alta resolución con detector electroquímico siguiendo la técnica descrita por nuestro grupo (Saldívar, A. et al., 1991). Para este propósito, usamos un cromatógrafo de líquidos LC 250 de Perkin-Elmer equipado con un detector electroquímico Metrohm 656.

7.5 DETERMINACION DE MANGANESO POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCION ATOMICA CON HORNO DE GRAFITO.

En esta parte experimental se analizó el contenido de manganeso en el cuerpo estriado y el mesencéfalo de los animales que se administraron con $MnCl_2$. Esto fue con el fin de evaluar si este metal es capaz de acumularse en el cerebro atravesando la barrera hematoencefálica. Con este propósito se utilizaron ratones machos cepa NIH de 25-30 g a los que se les administró $MnCl_2$ durante 16 días en el agua de bebida a dosis de 0.5 y 1 mg/ml. Se usaron como controles animales administrados con NaCl (0.5, 1 mg/ml).

Se sacrificó a los animales, se extrajeron los cerebros y se diseccionó el cuerpo estriado como previamente describió Glowinski e Iversen (1966). Se analizó el contenido de manganeso usando la técnica descrita por Bonilla (1978). El tejido cerebral se colocó en tubos de polipropileno libres de metales. Posteriormente se adicionaron 500 μ l de HNO_3 suprapur (Merck) y se colocaron en un baño a 60°C durante 30 minutos para la digestión del tejido. Las muestras se dejaron enfriar y se guardaron tapadas a 5°C hasta que fueron analizadas. De esta solución se tomaron 20 μ l para analizar el contenido del metal por espectrofotometría de absorción atómica (Perkin-Elmer 360) con horno de grafito P-E HGA-2200. Se corrieron curvas de calibración de estándares acuosos de concentración conocida de manganeso. Los valores de las muestras se obtuvieron por interpolación de la muestra en la curva de calibración respectiva. Los resultados se expresaron como μ g del metal/g de tejido húmedo.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se analizaron mediante el uso de análisis de varianza, seguido de la prueba de Tukey. En algunos casos solo se utilizó la t de student. Los valores de $p < 0.05$ y $p < 0.01$ se consideraron significativos.

8. RESULTADOS

8.1 DETERMINACION REGIONAL DE TBARS.

La formación de TBARS en las cinco regiones del cerebro de ratón se muestra en la tabla 1. Como puede notarse no se encontraron diferencias significativas (prueba de t) en la formación basal de TBARS en las diferentes regiones cerebrales analizadas a los tiempos empleados.

En la presencia de MPP+, hay un incremento significativo en la producción de TBARS en cuerpo estriado a 30 y 60 minutos después de la administración de la toxina, siendo este aumento del 70% y 198% respectivamente, comparando con el grupo control. En el mesencéfalo se observó el mismo efecto a los 30 minutos con un incremento de 88% en la formación de TBARS, efecto que no se presentó a los 60 minutos (tabla 1). Las regiones de corteza y cerebelo no modificaron su producción de TBARS después de la microinyección de MPP+ a los tiempos examinados (tabla 1). Estos resultados indican que el MPP+ indujo un incremento selectivo sobre la formación de TBARS en las regiones que se dañan por efecto de la neurotoxina.

8.2 DETERMINACION DE PFL EN CUERPO ESTRIADO

Se midió otro índice de la peroxidación de lípidos mediante el análisis del contenido de PFL. En la figura 10 se muestra la formación de PFL en el cuerpo estriado después de la administración i.c.v. de MPP+ (18µl/3µl), analizada a 0.5, 1, 2, 24 h y 7 días después de la inyección. A 0.5 y 1 h después de la adminis -

TABLA 1. FORMACION DE TBARS EN REGIONES CEREBRALES.

REGION	TIEMPO (MIN)	CONTROL	MPP+(18µg/3µL)	
Mesencefalo	30	0.18 (0.01)	0.34 (0.05)	**
	60	0.21 (0.02)	0.27 (0.04)	n.s.
Estriado	30	0.19 (0.02)	0.33 (0.05)	**
	60	0.23 (0.05)	0.69 (0.09)	***
Cerebelo	30	0.2 (0.06)	0.2 (0.04)	n.s.
	60	0.26 (0.03)	0.26 (0.04)	n.s.
Corteza	30	0.24 (0.03)	0.18 (0.02)	n.s.
	60	0.21 (0.03)	0.20 (0.01)	n.s.
Hipocampo	30	0.17 (0.02)	0.18 (0.03)	n.s.
	60	0.27 (0.02)	0.30 (0.06)	n.s.

*TABLA 1. Evaluación de la peroxidación de lípidos por el ensayo de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en mesencéfalo, estriado, cerebelo, corteza e hipocampo a 30 y 60 minutos después de la administración intracerebroventricular del ión 1-metil-4-fenilpiridino (MPP+, 18 µg/3µl). Los valores experimentales están expresados como nmol de TBARS formadas por mg de proteína. Los resultados representan el promedio +/- error estándar de 8-11 experimentos independientes. *** p<0.001; ** p<0.01, prueba t de student. n.s. diferencia no significativa.*

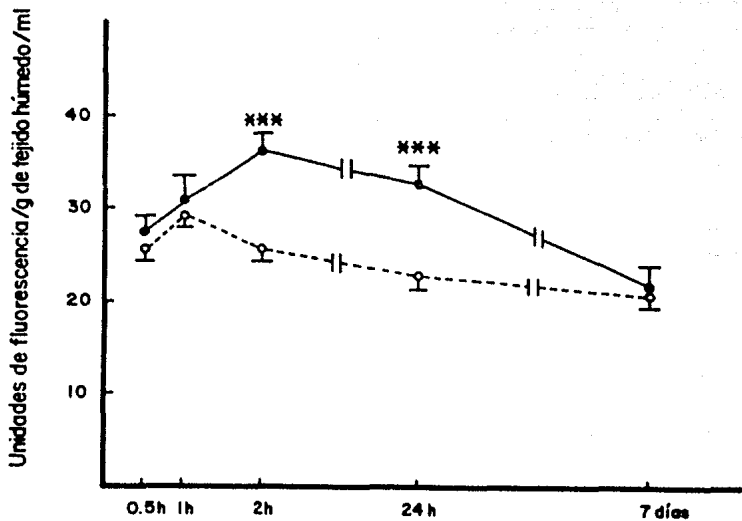


FIGURA 10. Determinación de productos fluorescentes lipídicos como índice de peroxidación de lípidos a 0.5h, 1h, 2h, 24h, 7 días después de la administración intracerebroventricular del ión 1-metil-4-piridinio (MPP⁺, 18ug/3ul). Los resultados son expresados en unidades de fluorescencia/g de tejido húmedo/ml de extracto. Cada punto representa el promedio \pm error estandar de 5-8 experimentos independientes. \circ control, \bullet MPP⁺. *** diferente del grupo control $p < 0.001$, prueba t de student.

tracción intracerebroventricular de la toxina no hay diferencia significativa en la formación de PFL al comparar con el grupo control. Sin embargo, se observó una mayor acumulación de estos productos fluorescentes en los animales tratados con MPP+ a las 2h (40% respecto al grupo control). A las 24 h también se observó un incremento significativo de PFL (38% respecto al grupo control). Este efecto no se presenta a los 7 días de la administración del tóxico, cuando se presentan niveles semejantes al control.

8.3 EFECTO DE LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE MPP+ EN LA FORMACION DE LPF EN EL CUERPO ESTRIADO

En la figura 11 se muestra la dependencia de la dosis de MPP+ en la formación de productos fluorescentes lipídicos (PFL) en el cuerpo estriado 2 horas después de la administración de la neurotoxina. Donde se observa una relación directa entre la dosis de MPP+ y el aumento en los PFL de la siguiente manera: con una dosis de 4.5 $\mu\text{g}/3\mu\text{l}$ de MPP+ se encontró un incremento de 10.4% en los LPF respecto a los valores control, que no fue estadísticamente significativo; a una dosis de 9.0 $\mu\text{g}/3\mu\text{l}$ se encontró un incremento estadísticamente significativo de 37% comparado con el grupo control y a dosis de 18 $\mu\text{g}/3\mu\text{l}$ se observó una acumulación también significativa del 41% respecto a los valores control. Esto indica que la acumulación de LFP es dependiente de la dosis de MPP+.

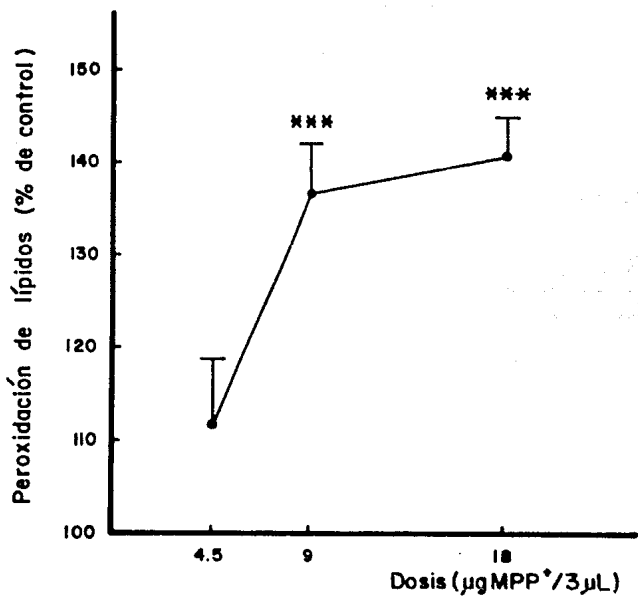


FIGURA 11. Curva dosis-respuesta de la administración del ión 1-metil-4-fenilpiridino (MPP⁺) en la peroxidación de lípidos en cuerpo estriado evaluada con la técnica de productos fluorescentes lipídicos 2h después de la administración intracerebroventricular de dosis variables de MPP⁺ (4.5, 9 y 18 µg de MPP⁺/3 µl). Los resultados son expresados como porcentaje contra los valores control de 5-7 experimentos independientes. *** diferente del grupo control. $p < 0.01$, prueba de t- de student.

8.4 ANALISIS DEL CONTENIDO DE DOPAMINA EN EL CUERPO ESTRIADO DESPUES DE LA ADMINISTRACION DE MPP+.

El análisis del contenido de dopamina en cuerpo estriado se presenta en la figura 12, donde se muestra que a las 2 horas no existen diferencias significativas entre los grupos control y el tratado con MPP+. A las 24 h y a los 7 d se encontraron disminuciones significativas en el contenido de dopamina de 52% y 37% respectivamente, sugiriendo que las neuronas dopaminérgicas empiezan a dañarse de manera irreversible después de las 2 horas de la microinyección del MPP+, y la peroxidación de lípidos se presenta antes de que disminuya este índice bioquímico de daño.

8.5 EFECTO DE LA ADMINISTRACION ORAL DE CLORURO DE MANGANESO SOBRE LA NEUROTOXICIDAD INDUCIDA POR LA ADMINISTRACION DE MPTP.

En la figura 13 se muestra el contenido estriatal de DA. Se observó una disminución significativa ($p < 0.01$) del 44.3% en los niveles de DA en el grupo tratado sólo con MPTP, indicando la acción neurotóxica del compuesto. Con el pretratamiento de cloruro de manganeso a dosis de 0.5 mg/ml ó 1 mg/ml y la administración posterior de MPTP se encontró incremento del 60% y 52% respectivamente, en el contenido de dopamina comparado con el grupo tratado sólo con MPTP. En la misma gráfica se muestra que la administración de cloruro de manganeso a 0.5 mg/ml ó 1 mg/ml no altera el contenido de dopamina en los animales control.

En la figura 13 se puede observar que el pretratamiento con MnCl₂ a una dosis de 0.5 mg/ml no cambia el contenido de dopamina. El contenido de este neurotransmisor fue reducido en ani-

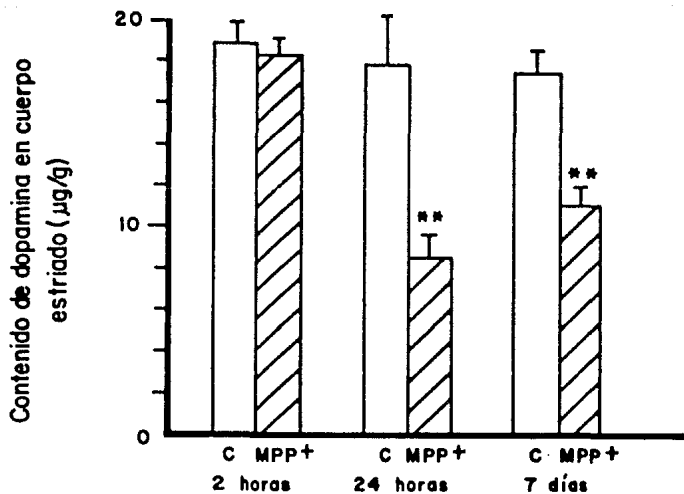


FIGURA 12. Contenido de dopamina en estriado 2h, 24h y 7 días después de la administración intracerebroventricular del ión 1-metil-4-fenilpiridino (MPP+, 18 µg/3µl). Los resultados son expresados como µg de dopamina/g de tejido. Cada barra representa el promedio +/- el error estandar de 4-6 experimentos independientes. ** $p < 0.01$, prueba t de student. Inyección con salina (C) e inyección con MPP+ (MPP+).

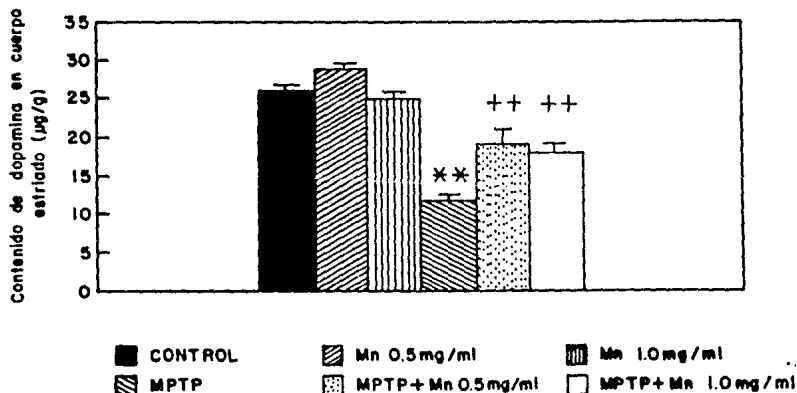


FIGURA 13. Efecto de la administración oral de manganeso en la neurotoxicidad de la MPTP evaluando el contenido de dopamina en estriado después de los tratamientos (cloruro de manganeso a una dosis de 0.5 y 1.0 mg/ml). Los resultados están expresados como µg de dopamina/g de tejido. Cada barra representa el promedio +/- el error estándar de 5-6 experimentos independientes. ** Contenido de dopamina significativamente más bajo que los demás grupos ($p < 0.01$, prueba de Tukey). ++ Contenido de dopamina es más bajo que el grupo control y el grupo de manganeso.

males tratados con MPTP y con $MnCl_2 + MPTP$ se observó un incremento en el contenido de dopamina.

8.6 DETERMINACION DE MANGANESO POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCION ATOMICA CON HORNO DE GRAFITO.

En la figura 14 se muestran las concentraciones de manganeso en el cuerpo estriado despues de la administración de cloruro de manganeso a 0.5 y 1 mg/ml.

El contenido de manganeso en cuerpo estriado con una dosis de 0.5 mg/ml indica un aumento del metal del 14% , no siendo estadisticamente significativa al ser comparada con el grupo control. A una dosis de 1 mg/ml se encontró un incremento del 42% en el contenido del manganeso, siendo estadisticamente significativa la diferencia al ser comparado con su grupo control, lo que indica acumulación del metal.

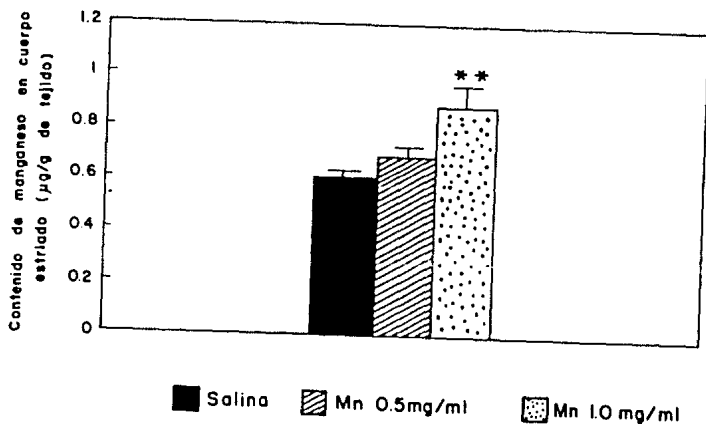


FIGURA 14. Contenido de manganeso en cuerpo estriado después del tratamiento con cloruro de manganeso a una dosis de 0.5 y 1.0 mg/ml. Los resultados están expresados como μg de manganeso/g de tejido. Cada barra representa el promedio \pm el error estándar de 6-7 experimentos independientes. ** Contenido de manganeso significativamente más alto que los demás grupos ($p < 0.01$, prueba de Tukey).

9. DISCUSION

Un hallazgo interesante de nuestro trabajo fue que el MPP+ indujo un incremento en el valor de dos indices de la peroxidación de lípidos en las regiones que son específicamente dañadas por la toxina: esto sugiere que el MPP+ inyectado en el ventrículo es captado selectivamente por las células de las regiones mencionadas.

Se ha reportado el incremento en la formación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico en la sustancia nigra de sujetos parkinsonícos y una reducción en el contenido de ácidos grasos poliinsaturados de las membranas, que son el sustrato de la lipoperoxidación, comparados con sujetos control (Dexter, D. et al., 1989). Nuestros resultados señalan un efecto similar en el modelo experimental de Parkinson en ratones, lo que permite suponer la existencia de un proceso neurodegenerativo común en el modelo y en la enfermedad idiopática.

Esto es apoyado por reportes de la disminución del contenido de glutatión en la enfermedad de Parkinson (Perry, T et al., 1982) y en la neurotoxicidad inducida por la MPTP (Perry, V et al., 1986).

Las diferencias en la magnitud del efecto lipoperoxidante del MPP+ se observaron cuando medimos la producción de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico o la formación de productos fluorescentes lipídicos. Esto puede ser el resultado de dos distintas pozas de malondialdehído medidas por cada técnica. Los productos fluorescentes lipídicos son formados en las capas

lipídicas por la reacción del malondialdehído con los grupos amino de las moléculas biológicas que conducen a la formación de las conocidas bases de Schiff que son fluorescentes (Gutteridge, J. and Halliwell, B., 1990). Los compuestos fluorescentes de polimalondialdehído también contribuyen a este índice (Halliwell, B. and Gutteridge, J., 1985). Con la medición de productos fluorescentes lipídicos solo se mide una fracción del total de malondialdehído formado por los tejidos. Una explicación alternativa es que la producción de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico sobre-estiman la peroxidación de lípidos como un resultado de una reacción no específica del ácido tiobarbitúrico con otros aldehídos que no son el malondialdehído (Gutteridge, J. and Halliwell, B. 1990).

En este estudio el curso temporal de la producción de la peroxidación de lípidos también fue dependiente de la técnica usada. La peroxidación de lípidos a tiempos cortos (0.5 y 1 h) en el estriado medida como la producción de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico fue diferente con respecto al grupo control, pero no midiendo el mecanismo como la formación de productos fluorescentes lipídicos (ver tabla 1 y figura 10). Esto indica menos sensibilidad de este último índice a la formación de malondialdehído. Esto es apoyado por los datos de Triggs and Willmore, 1984) quienes encontraron un incremento en la formación de productos fluorescentes lipídicos, que fue solo significativa 2h después de la administración de sulfato ferroso al cerebro de la rata. El curso temporal de la formación de productos fluorescentes lipídicos después de la inyección de este potente lipo-

peroxidante ($FeSO_2$) fue similar a lo que encontramos para el

2

MPP+.

Rehncrona et al. (1980) reportó diferente sensibilidad entre la medición de dienos conjugados, producción de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico y formación de productos fluorescentes lipídicos en tejido de cerebros sujetos a condiciones pro-oxidantes. En esos experimentos, la medición de dienos conjugados se encontró menos sensible que la producción de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico y formación de productos fluorescentes lipídicos a la medición de peroxidación de lípidos, como resultado de cantidades basales elevadas en el índice formado. Esto puede explicar las diferencias observadas en la peroxidación de lípidos como la medición de dienos reportada por Corangiu et al. (1987) en contraste a los datos presentados en nuestro trabajo.

La formación de especies activas del oxígeno derivadas del MPP+ se ha demostrado in vitro (Rosseti et al., 1988). Hasegawa y col. (1990) mostraron incremento en la peroxidación de lípidos dependiente de NADH en mitocondrias expuestas a MPP+ y este efecto fue similar al producido por la rotenona, sugiriendo que la sobreproducción de malondialdehído puede ser el resultado de la inhibición de la respiración mitocondrial inducida por el MPP+.

En el presente trabajo, nosotros encontramos que el aumento en la producción de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico y formación de productos fluorescentes lipídicos in vivo son eventos posteriores en la neurotoxicidad del MPP+.

El incremento en la formación de productos fluorescentes lipídicos 24 h después de la administración de MPP+ sugiere que la peroxidación de lípidos además de actuar a corto plazo puede actuar como mecanismo de destrucción neuronal a largo plazo, en adición al mecanismo agudo de inhibición de la cadena respiratoria producido por el MPP+.

Nuestros resultados coinciden con los reportados por Kucheryants et al. (1989) quienes encontraron un incremento en la cantidad de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico en ratas administradas intraestriatalmente con MPP+, sin embargo, este efecto puede considerarse poco específico en el trabajo de estos autores, debido a las elevadas concentraciones que administraron y que puede conducir a la muerte celular indiscriminada, la que a su vez causa la liberación de metales de transición del interior de las células que promueven la peroxidación de lípidos (Gutteridge, J. and Halliwell, B., 1990).

En nuestro diseño experimental, la administración de la toxina se realizó por otra vía, se evaluó la peroxidación de lípidos por dos métodos y la toxicidad de la droga simultáneamente, midiendo la cantidad de dopamina como índice de daño a las neuronas dopaminérgicas (Sayre, L. et al., 1986), descartando así la posibilidad de que nuestros resultados sean debido a la acción inespecífica de la droga.

En apoyo a esta hipótesis Adams y col. (1989) demostraron histológicamente que el daño subcelular se presenta hasta después de 2.5 h de la administración aguda de MPTP y que el daño se presenta preferencialmente en el retículo endoplásmico, mostrándose daños más consistentes en este organelo que en la

mitocondria, donde los cambios son transitorios y no pueden explicar los efectos a largo plazo. Estos hallazgos apoyan que la peroxidación de lípidos precede a la muerte neuronal y no es una consecuencia de esta como queda establecido en nuestros resultados.

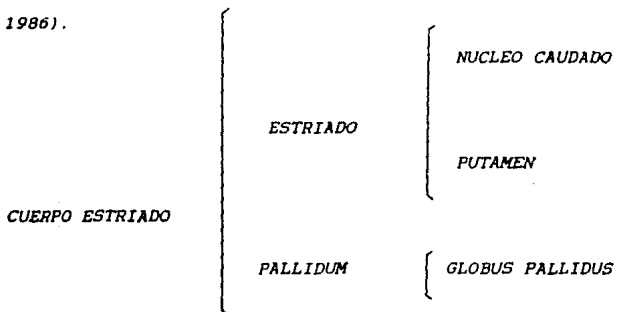
La posible participación de la peroxidación de lípidos y de los metales en la neurotoxicidad de la MPTP también es apoyada por los ensayos de la administración de manganeso que protegió de los efectos neurotóxicos de la MPTP, ya que este metal en su forma libre (Mn^{2+}) ha demostrado ser un agente antiperoxidante en el cerebro in vitro (Shukla, G. and Chandra, S., 1981) e in vivo (Donaldson, J. et al., 1982). El manganeso es captado por las terminales dopaminérgicas del cuerpo estriado (Daniels, A., et al., 1981) y se acumula en la mitocondria (Prohaska, J., 1987), de manera similar al MPP+. El efecto antiperoxidante del Mn^{2+} es más potente en el cuerpo estriado que en las demás regiones del cerebro, sugiriendo que la acción protectora del metal en la toxicidad inducida por la MPTP puede ser el resultado de un efecto antiperoxidante específico del manganeso. *

En conclusión, nuestros resultados indican que la peroxidación de lípidos puede estar involucrada como mecanismo de daño en este modelo de Parkinson. Esto puede ser de gran importancia ya que cabe esperar la posible existencia de este mecanismo en la enfermedad de Parkinson.

A P E N D I C E S

A.1. ANATOMIA DE LOS GANGLIOS BASALES

Se denominan ganglios basales al núcleo caudado, núcleo lentiforme (putamen y globus pallidus), claustrum, complejo amigdalino y se ha enfatizado que pertenece a este grupo la materia gris ventral del telencéfalo al caudado (Carpenter, M., 1986).



La sustantia nigra (constituida por la pars compacta y la pars reticulata) y el núcleo subtalámico son grupos celulares no telencefálicos que están estrechamente asociados con los ganglios basales.

Los ganglios basales están constituidos por grandes masas nucleares subcorticales derivadas en su mayor parte del telencéfalo. El cuerpo estriado desempeña diversas funciones que involucran la integración sensorial, la percepción y el aprendizaje (Divac, I and Oberg, R. 1982).

Las alteraciones producidas en el cuerpo estriado producen la discinesia, el balismo, la corea de Huntington y la enfermedad de Parkinson, entre otras. En la clínica, el término ganglios basales se restringe con frecuencia a los componentes del cuerpo

basales se restringe con frecuencia a los componentes del cuerpo estriado.

El cuerpo estriado tiene importantes fibras de proyección (figura 15) como son las aferencias corticoestriatales (Kemp and Powell, 1970; Goldman and Nauta, 1977; Kunzle, 1978), la amigdaloes-triatal (Jayaram, 1985), la talamoestriatal (Powell and Cowan, 1956; Mehler, 1966; Kalil, 1978) y la nigroestriatal (Szabo 1980; Parent and Debel lefeuille, 1983). Las principales eferencias son las que van al globus pallidus (Szabo, 1967) y a la sustantia nigra (Szabo, 1962, 1967, 1970).

A.2. ENFERMEDAD DE PARKINSON

A.2.1 SINTOMATOLOGIA

La enfermedad de Parkinson (EP) es un desorden neurodegenerativo, progresivo, con características patológicas y clínicas bien conocidas. Fue por descrita en detalle por James Parkinson en 1817 y se le conoció como parálisis agitante.

La EP, es el resultado del daño producido en la pars compacta de la sustantia nigra (McGeer, P.L. et al., 1989). Las células nerviosas de esta región mandan fibras ascendentes grandes y finas que se conectan con otras neuronas de la materia gris de los dos hemisferios cerebrales, (el cuerpo estriado) y que contienen el neurotransmisor dopamina (Dahlström y Fuxe, 1964; Fuxe y Andén, 1966; Bedard et al., 1969; Hökfelt y Ungerstedt, 1969), cuya deficiencia produce el parkinsonismo.

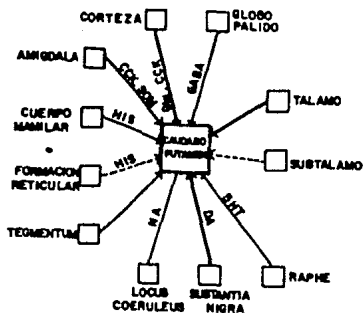


FIGURA 15. Aferencias principales al cuerpo estriado y sus neurotransmisores. Colecistocinina (CCK), somatostatina (SOM), histamina (HIS), noradrenalina (NA), dopamina (DA), serotonina (5-HT), ácido aminobutírico (GABA), glutamato (Glu) (tomado de McGeer, G. et al., 1984).

Experimentalmente las neuronas de la sustantia nigra pueden deteriorarse por agentes químicos: Drogas que causan parkinsonismo (por ejemplo la clorpromazina, la reserpina o el aldomet), o la exposición a metales como el manganeso que produce síntomas neurológicos semejantes a la EP (Mena, I. et al., 1967), por virus que causan infecciones que producen el parkinsonismo post-encefalítico, el arteriosclerótico, (Jellinger, K., 1986, 1987), entre otros.

De los principales tipos se encuentran los siguientes:

1) *Parkinsonismo senil*: Los pacientes clínicamente presentan signos de parkinsonismo y el tratamiento con L-dopa no hace desaparecer esta sintomatología. Además son dementes del tipo Alzheimer.

Las lesiones principales se encuentran en la sustantia nigra y en el locus coeruleus (Jellinger, K. et al., 1983; Jellinger, K. and Riederer, P., 1984).

2) *Parkinsonismo degenerativo en diferentes vías como en*: A) la *estriatonigral*, que produce lesiones en la sustantia nigra, en el locus coeruleus y en el putamen (Adams, R. et al., 1961; Koeppen, A. et al., 1971; Takei, Y. and Mirra, S., 1973); B) la *atrofia olivopontocerebelar*, con daños en la sustantia nigra (Lewis, P., 1971); C) la *enfermedad de Joseph*, que produce degeneraciones extrapiramidales y espinocerebelosas (Kaiya, H., 1974; Mizutani, T. et al., 1983).

3) *Postencefalítico*: Como resultado de la *encefalitis letárgica* y

de otras encefalitis virales, se presentan degeneraciones difusas bilaterales, gliosis en la sustantia nigra y en el locus coeruleus, dañandose otras partes del tallo cerebral (Ishii, T. and Nakamura, Y., 1981; Rail, D. et al., 1981).

4) Parkinsonismo vascular: la lesiones vasculares como la encefalopatía tipo Binswanger produce daño vascular a los ganglios basales y a la sustantia nigra (Lewis, P., 1971; Schwab, R. and England, a., 1968; Togi, H., 1977).

5) Parkinsonismo postraumático: en casos excepcionales se produce destrucción de la sustantia nigra (Morsier, G., 1960). Se puede originar por traumatismo o contusión directa en el tallo cerebral (Huhn, B. and Jakob, H., 1971), por daño secundario al mesencéfalo y a los ganglios basales debido a la compresión vascular (Jellinger, K., 1966). La demencia pugilística es otro ejemplo en el que los individuos presentan atrofia cortical, disminución del número de neuronas del locus coeruleus y otras lesiones difusas (Corseilis, J. et al., 1973).

6) Parkinsonismo tóxico: Puede presentarse debido al envenenamiento producido por monóxido de carbono, disulfuro de carbono o por barbitúricos (Jellinger, K., 1968), que dañan el globus pallidus y la sustantia nigra. La encefalopatía producida por la intoxicación con manganeso produce una disminución de las neuronas y gliosis, con mayor predominancia en el globus pallidus y en menor grado a la sustantia nigra (Bernheimer, H. et al., 1973). La patología del parkinsonismo inducido por drogas no esta bien entendido, debido a que solo se han observado pocos cambios

en la sustantia nigra y en el mesencéfalo (Christensen, E. et al., 1970).

7) *Parkinsonismo sintomático*: Se ha observado en una gran variedad de desórdenes (Fahn, S., 1977) como son los tumores que involucran directamente a la sustantia nigra, ejemplo de ello son los gliomas y los linfomas del tallo cerebral (Gherardi, R. et al., 1985), o tumores que causan daño a la sustantia nigra y a sus proyecciones dopaminérgicas (García, et al. 1982).

Por otro lado, la EP idiopática es un síndrome progresivo y lento que frecuentemente ocurre entre los 58 y 61 años, pero puede presentarse a cualquier edad. Clínicamente se caracteriza por cuatro signos y síntomas: temblor, rigidez, bradicinesia, marcha y postura anormales (Kanazawa, I., 1986).

El temblor generalmente ocurre mientras el paciente está en reposo y desaparece con un movimiento voluntario (Geraghty, J.J. et al., 1985), presentándose como síntoma inicial en el 60% a 70% de los pacientes y aproximadamente el 90% lo manifiestan durante el transcurso de la enfermedad. El temblor se presenta con frecuencia en las manos, pero puede manifestarse en las piernas, mandíbula y lengua. Este síntoma generalmente es unilateral en el comienzo de la enfermedad, pero con el tiempo se vuelve bilateral. La mano típicamente asume una postura de flexión de la unión metacarpo-falangeal con extensión de las uniones más distales.

Se presenta rigidez en el cuello y la espalda, manifestándose en el paciente como dolor muscular, que puede acompañarse de dolor de cabeza en la parte occipital.

La bradicinesia se define como lentitud o pobreza en los movimientos con disminución de los autónomos estereotipados. La lentitud se observa con la reducción en la capacidad para realizar actividades cotidianas como bañarse, vestirse y moverse en la cama. La incapacidad en la iniciación del movimiento y la fatiga son también caracteres distintivos de la bradicinesia. La lentitud de los movimientos incluye disminución en el columpiar de los brazos cuando se camina, en la deglución, provocando la acumulación de saliva en la boca, en la frecuencia del parpadeo y de la expresión facial. El paciente parkinsoniano presenta flexión de la cabeza, tronco y extremidades, postura encorvada hacia adelante. Los pacientes manifiestan incapacidad para levantar los pies del piso. Otros síntomas clínicos son las anomalías psiquiátricas, siendo frecuentes la demencia y la depresión (Brown and Marsden, 1984; Santamaria et al., 1986); la micrografía (escritura pequeña), la disartria, disminución del volumen de la voz, que puede estar asociado con la disartria, seborrea en el cuero cabelludo y en la frente. Se presentan con menos frecuencia la incontinencia urinaria y la impotencia (Goetz et al., 1986) y con mayor prevalencia síntomas sensoriales que incluyen el entumecimiento, frialdad, ardor y dolor (Lang and Johnson, 1987; Quinn et al., 1986; Goetz et al., 1986a; Koller, 1984) y disfunción olfatoria (Ward et al., 1983).

Aunque la EP es un desorden degenerativo progresivo el diagnóstico exacto es difícil de predecir. Schwab en 1960 presentó evidencias de pacientes con sintomatología progresiva lenta, casi imperceptible de año a año.

En algunos casos los pacientes muestran independencia en sus

actividades llegando a trabajar hasta 25 años después de presentada la enfermedad. Por otro lado, Mjones (1949) encontró que el 50% de los pacientes estaban incapacitados después de 4 años de presentada la EP.

A.2.2 NEUROLOGIA Y BIOQUIMICA.

La etiología y la patogénesis de la EP son un misterio desde que se describió por primera vez la enfermedad, pero se conoce su neuropatología. En la EP están lesionados los sistemas dopaminérgicos que incluyen el de la vía nigroestriatal (Bernheimer, H. et al., 1973; Ehringer, H. and Hornykiewicz, O., 1960), el mesocorticolímbico (Ploska, A. et al., 1982; Price, K. et al., 1978; Scatton, B. et al., 1983) y el hipotalámico (Javoy-Agid, F. et al., 1984a). Sin embargo, en la médula espinal la cantidad de dopamina no se afecta (Scatton, B. et al., 1984). Los datos bioquímicos indican que no todos los sistemas dopaminérgicos del sistema nervioso central están dañados en la EP. La cantidad de dopamina en los núcleos caudado y putamen están más disminuidos (80%-90%) que en el núcleo accumbens, corteza cerebral e hipotálamo (50-60%), indicando que la vía nigroestriatal es la más dañada. Esta severidad producida en la vía nigroestriatal (en particular el caudado es más afectado que el putamen), comparado con otros sistemas dopaminérgicos, puede explicar la sintomatología que se presenta cuando hay deficiencia de ese neurotransmisor. En esta vía, la lesión más importante es en las neuronas dopaminérgicas de la pars compacta de la sustantia nigra, que

degeneran con el tracto nigroestriatal causando una disminución severa de la dopamina en el cuerpo estriado.

El daño a las neuronas dopaminérgicas de la sustantia nigra se ha descrito mediante estudios cuantitativos (Parkkenberg, H. and Brody, H., 1965; Tolppanen, L., 1971; Togi, H., 1977; Mann, D. et al., 1983; Bogerts, B. et al., 1983) que indican la reducción del volumen celular (25%) (Bogerts, B. et al., 1983), nuclear y del pericarión (Mann, D. et al., 1983; Bogerts, B. et al., 1983), disminución (50 a 80%) del número de las neuronas pigmentadas (Parkkenberg, H. and Brody, H. 1965; Tolppanen, L. 1971; Togi, H., 1977; Mann, D. et al., 1983; Bogerts, B. et al., 1983) y de la melanina (88%) (Mann, D. et al. 1983).

Ha sido reconocido que para que se manifiesten los síntomas del parkinsonismo debe de presentarse una disminución de 70%-80% de las neuronas de la sustantia nigra y de la dopamina en en el cuerpo estriado (Bernheimer, H. et al., 1973; Birkmayer, W. and Riederer, P., 1983). Por otro lado, el ácido homovanílico, metabolito de la dopamina, se reduce en el el área tegmental ventral y en la vía estriopálidal, de manera que se correlaciona con la disminución de la neuronas de la sustantia nigra (Bernheimer, H. et al., 1973; Birkmayer, W. and Riederer, P., 1983; Riederer, P. and Jellinger, K., 1983).

Junto con la degeneración de las terminales dopaminérgicas en el cuerpo estriado se ha sugerido que también se presenta degeneración sináptica (Mann, D. and Yates, P. 1983). También ocurre una degeneración en las neuronas del locus coeruleus que contiene noradrenalina. Este núcleo está localizado en la parte rostral, dorsolateral y tegmental del puente. El locus coeruleus es la

fuerza de inervación noradrenérgica de varias regiones como son: el núcleo supraóptico y el paraventricular del hipotálamo, el núcleo dorsal del vago, que forman sus mayores campos de proyección (Mann, D., et al., 1983; Moore, R and Bloom, F., 1979). En la EP hay una disminución de las neuronas pigmentadas del locus coeruleus del 50% al 80% (Mann, D. et al., 1983; Mann, D. and Yates, P., 1983). En la morfología sináptica de esta región hay pocos cambios, excepto porque se presenta una acumulación de vesículas de núcleo denso en los axones terminales y en sus dendritas, que pueden deberse a la acumulación de aminas biogénicas en las terminales aferentes privadas de sus componentes postsinápticos producida por la degeneración de las neuronas y de sus dendritas (Forno, L. and Norville, R., 1981). Otros sitios dañados son el núcleo motor del vago, la sustantia innominata, el núcleo basalis de Meynert y algunos núcleos del hipotálamo, regiones que Lewy (1913) describió.

En el núcleo dorsal del vago, en el núcleo paraventricular y en el núcleo supraóptico hay reducción en el número de neuronas, en el volumen nuclear y en el RNA del citoplasma. La degeneración de las neuronas en esos sitios forma inclusiones intraneuronales eosinófilas, conocidos como cuerpos de Lewy, con o sin disminución de las terminales nerviosas. Otros sitios que también se dañan incluyen la vía serotoninérgica los núcleos del rafe, especialmente el rafe dorsal, el núcleo central superior, el ganglio simpático, la amígdala, la corteza cerebral y estructuras límbicas más susceptibles que las regiones neocorticales. La médula espinal puede tener cuerpos de Lewy en

el asta anterior y como en la posterior.

La serotonina esta reducida en la EP (Birkmayer, W. and Riederer, P. 1983; Javoy-Agid, F. et al., 1984) debido a la disminucion de las neuronas del núcleo del rafe dorsal (Jellinger, K. et al., 1983; Yamamoto, T. and Hirano, A., 1985).

El núcleo Basalis de Meynert en la sustantia innominata es la fuente de inervación colinérgica de la neocorteza cerebral e hipocampo (Hedren, J. et al., 1984; Mesulam, M. et al., 1983), que es uno de los núcleos donde primero se observaron los cuerpos de Lewy en la EP (Foix, C. and Nicolesco, J., 1925; Lewy, F., 1913). Se han encontrado sólo pocos cambios en los neuropéptidos del sistema nigrostriatal (Cuello, A. et al., 1981), pero si un incremento de la sustancia P (Constantinidis, J et al., 1983).

Para el estudio de los mecanismos etiologicos de la EP se han utilizado varios modelos además del de la MPTP. A continuación se mencionan los más importantes que se han desarrollado.

A.3. MODELOS EXPERIMENTALES DE PARKINSON

El primer modelo animal de la EP fue desarrollado por Carlsson y col. (1957). En este modelo se administrò reserpina al ratón, observándose un comportamiento de hipocinesia y bioquímicamente una disminución de las monoaminas.

Estos cambios fueron antagonizados por la administración de L-DOPA, fármaco que se utiliza en el tratamiento de la EP. Con estas observaciones se contribuyó al rápido entendimiento de los cambios bioquímicos de esta enfermedad.

A.3.1. MODELO COLINERGICO

Uno de los síntomas de la EP, el temblor, puede inducirse en roedores por varios agentes colinérgicos, como la arecolina, la oxotremorina, la fisostigmina y la nicotina (Brimblecome and Pinder 1972). La tremorina y su metabolito, la oxotremorina, son los dos agentes más usados (Everett, 1964). Sin embargo, el temblor inducido por agonistas colinérgicos semeja más una condición de intoxicación colinérgica que el temblor parkinsonico (Duvoisin 1976). Otros síntomas que se presentan por la administración de drogas colinérgicas son la rigidez, la catalepsia y la acinesia.

A3.2. LESIONES NEURONALES NO SELECTIVAS

Se han realizado estudios de lesiones en animales de laboratorio. El primer estudio que se hizo fue con lesiones electrolíticas (electrocoagulación) en la vía nigroestriatal de monos, observándose disminución de la dopamina y presentándose el temblor, la bradicinesia y la rigidez (Poirier et al., 1966; Poirier and Sourkes, 1966; Goldstein et al., 1973). Estos síntomas se pudieron revertir con la aplicación de agonistas dopaminérgicos (Goldstein et al., 1975). El método no es selectivo porque se destruyen otras neuronas además de las dopaminérgicas, localizadas cerca del área lesionada, sin embargo, se ha utilizado para probar drogas dopaminérgicas (Goldstein et al., 1977). Si se lesionan la sustancia nigra y el núcleo rojo en el mono, se induce la rigidez (Pécharde et al., 1976), la hipocinesia pero no el temblor.

A3.3. METODOS QUIMICOS

RESERPINA: Esta droga interfiere con el almacenamiento de la dopamina (y también de la noradrenalina y la serotonina) en los gránulos intracelulares, conduciendo a la reducción de este neurotransmisor en las terminales nerviosas. Su acción central produce sedación, hipocinesia, rigidez (catalepsia) y con frecuencia temblor (Hornykiewicz, 1966). Una condición muy similar se puede inducir con tetrabenazina y alfa-metil-paratirosina, un inhibidor de la enzima tirosina hidroxilasa. Tanto el efecto de la reserpina como de la alfa-metil-paratirosina son reversibles, porque esos agentes no causan lesión neuronal permanente. La

condición inducida por esos agentes no semeja la EP en todos sus aspectos.

Varios neurolepticos son antagonistas de los receptores de la dopamina. La capacidad de estos fármacos de producir catalepsia en roedores es aguda, transitoria y no está relacionada con la lesión de las neuronas dopaminérgicas, pero puede correlacionarse por su capacidad de inducir parkinsonismo por drogas en el hombre (Bürki, 1979). Este es un modelo que puede inducir parkinsonismo en el hombre pero no como el de la EP idiopática.

A3.4. 6-HIDROXIDOPAMINA

Es el primer agente investigado que selectivamente destruyó sistemas catecolaminérgicos. Su selectividad esta basada en que la 6-hidroxi-dopamina entra a las neuronas através del sistema de captura de las catecolaminas (Sachs and Jonsson, 1975).

La 6-hidroxi-dopamina no atraviesa la barrera hematoencefálica, pero su administración directa en el parénquima o en los ventriculos cerebrales produce daño a las neuronas catecolaminérgicas (Ungerstedt, 1971b, Bloom et al., 1969). Se puede producir una destrucción selectiva y permanente de las neuronas dopaminérgicas por la inyección local de la neurotoxina en la sustantia nigra o en la parte anterior de ésta. Cuando se administra bilateralmente en la sustantia nigra de roedores, los animales presentan hipocinesia, afagia y adipsia (Ungerstedt, 1971 a) y con la inyección unilateral se produce afagia y adipsia.

Con la administración de apomorfina, un potente agonista dopaminérgico, los animales empiezan a rotar en dirección opuesta a la lesión (Ungerstedt 1971b). Este comportamiento esta

relacionado con el desarrollo de receptores dopaminérgicos en el lado lesionado.

La bromocriptina y otros fármacos que actúan directamente como agonistas dopaminérgicos, así como la L-DOPA, producen un comportamiento de rotación contralateral, similar al causado por la apomorfina. Sin embargo, hay variaciones cuantitativas entre esos compuestos, en tiempo de acción, potencia y eficacia (Fuxe and Ungerstedt, 1975). Por otro lado, la (+)- anfetamina causa rotación ipsilateral debido a un efecto presináptico indirecto. Este modelo es útil para probar nuevas drogas y predecir su actividad antiparkinsoniana (Ungerstedt et al., 1973) porque disminuye (90%) la cantidad de dopamina en cuerpo estriado (Heikkila et al., 1981). Esta reducción semeja a lo que se presenta en la EP cuando los síntomas clínicos aparecen (Bernheimer et al., 1973). La lesión dopaminérgica después de la inyección intranigral de 6-hidroxi-dopamina es estable, aunque hay incremento en la sensibilidad (por ejemplo: la apomorfina cuando es dada repetidamente (Ungerstedt, 1971b). La especificidad de la destrucción neuronal inducida por la administración cerebral de 6-hidroxi-dopamina es cuestionada (Poirier et al., 1972; Butcher et al., 1974), porque se ha demostrado que produce lesiones no específicas (Águd et al. 1973, Hökfelt and Ungerstedt 1973), además de la degeneración dopaminérgica después de su administración en la sustantia nigra. Recientemente se introdujo una modificación del modelo original de Ungerstedt, donde sólo las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales son destruidas por la 6-hidroxi-dopamina usando una técnica estereotáxica modificada

(Perese et al., 1989).

A3.5. MODELO DE LA EDAD

Se ha sugerido que en el proceso normal de la edad las neuronas de la vía nigroestriatal producen neurotoxinas específicas del metabolismo dopaminérgico, por lo que la EP puede ser producida por toxinas de origen desconocido (Knoll, 1987). Tanto las toxinas endógenas, como los radicales libres, las quinonas y las toxinas exógenas, pueden contribuir a la patogénesis de esta enfermedad (Shoulson, 1989).

Los cambios que se observan con la edad y que incluyen modificaciones del comportamiento (Knoll 1988) se han utilizado como un modelo animal, pero no explican porque hay degeneración específica de las neuronas dopaminérgicas de la vía nigroestriatal en la EP (Scherman et al., 1989).

A.4. RADICALES LIBRES

A.4.1 TOXICIDAD DEL OXIGENO

Aunque el oxígeno (O_2) es necesario para los organismos aerobios, se conoce que las concentraciones superiores a las encontradas en el aire producen efectos dafinos (Balentine, J., 1982). Los signos de intoxicación debidos al O_2 dependen de la especie, edad, estado fisiológico y dieta. Por ejemplo, el oxígeno puro es menos tóxico en humanos adultos que en ratas adultas y menos tóxico en ratas recién nacidas que en ratas adultas (Halliwell, B. and Gutteridge, J., 1985).

Las presiones elevadas del O_2 producen toxicidad aguda al sistema nervioso central, llegando a producir convulsiones. Se ha propuesto que los efectos agudos del O_2 hiperbárico es por inactivación directa de algunas enzimas (Balentine, J., 1982) y los efectos a largo plazo, a los radicales del oxígeno (Balentine, J., 1982; Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C., 1985; Fridovich, I., 1978). Sin embargo, éstos pueden participar en los efectos agudos producidos por presiones elevadas del O_2 (Turrens, J.F. et al., 1984).

En 1981 Daniel L. Gilbert propuso que la mayoría de los efectos dafinos generados por el O_2 pueden atribuirse a la formación de radicales del O_2 (Gilbert, 1981).

Los radicales libres pueden formarse en las células y en los tejidos por actividad enzimática o sin ésta. Por ejemplo, la

formación de radicales libres por las reacciones enzimáticas se realiza en la cadena respiratoria (Chance, B. et al. 1979; Harman, D., 1972; Nohl, H. and Hegner, D., 1978), en la fagocitosis (Klebanoff, S., 1980; Rossi, F. et al., 1982), en la síntesis de prostaglandinas (Porter, N., 1980) y en el sistema citocromo P-450 (Sato, R. and Omura, T., 1978). Los radicales libres originados por las reacciones no-enzimáticas del oxígeno con compuestos orgánicos puede iniciarse, por ejemplo, con la radiación ionizante.

A.4.2. RADICALES LIBRES DEL OXIGENO

Los átomos están formados por un núcleo constituido de neutrones y protones cargados positivamente y rodeando al núcleo están los electrones cargados negativamente. Esas partículas subatómicas, los electrones, en los átomos y en las moléculas, ocupan regiones en el espacio conocidas como orbitales y en los que cada uno puede tener dos electrones. Por ejemplo, los que forman un enlace covalente ocupan el mismo orbital (molecular), pero tienen espines opuestos. Si un orbital tiene un sólo electrón, se dice que el electrón está desapareado.

Un radical es definido como aquella especie que tiene uno o más electrones desapareados. Esta definición incluye el átomo de hidrógeno (un electrón desapareado), metales de transición y la molécula de oxígeno.

En el caso del oxígeno, éste tiene dos electrones desapareados, cada uno localizado en diferente orbital (Halliwell, 1981b), por lo tanto es un radical. De acuerdo a la

termodinámica, los compuestos orgánicos del cuerpo humano son casi totalmente especies no radicales, que pueden reaccionar inmediatamente con el O_2 del aire y oxidar una molécula por aceptar un par de electrones en los espacios vacíos de los orbitales del O_2 .

A.4.2.1. Oxígeno singulete

Es una forma reactiva del oxígeno que no tiene electrones desapareados y por lo tanto no es un radical (figura 16). La formación del oxígeno singulete ocurre *in vivo* en cloroplastos iluminados (Halliwell, 1981a), en el cristalino y en la retina de los mamíferos (Kirschfeld, 1982).

A.4.2.2. Superóxido

Si la molécula de O_2 acepta un electrón, se forma el radical superóxido, O_2^- , con un electrón desapareado (figura 16). El oxígeno por sí mismo es un radical, pero con dos electrones desapareados, comparado con un solo electrón del superóxido.

McCord and Fridovich (1969) descubrieron las enzimas que están encargadas de atrapar el radical O_2^- en las células (superóxido dismutasas) y concluyeron que este radical es el mayor agente responsable de la toxicidad del O_2 .

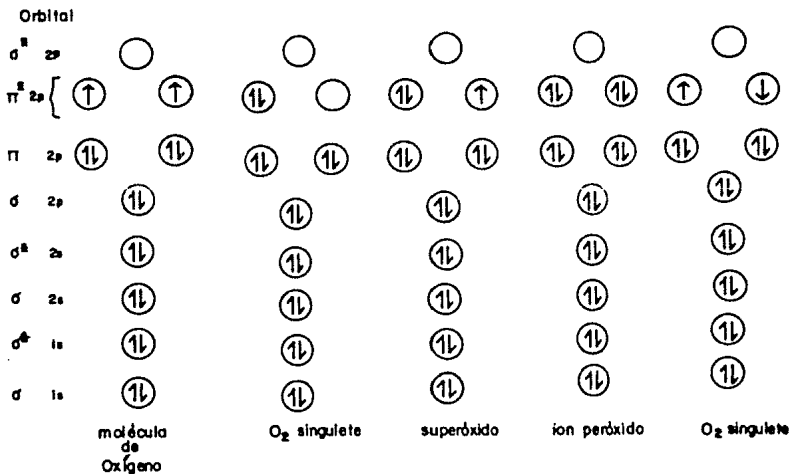


FIGURA 16. Representación esquemática de la formación de especies reactivas de la molécula diatómica de oxígeno. O-orbital. I.I electrones (tomado de Halliwell and Gutteridge, 1984a).

El radical O_2^- se forma in vivo en una gran variedad de células aeróbicas (Fridovich, 1975, 1978; Halliwell, 1981b), debido a la actividad producida por la cadena de transporte de electrones de la mitocondria y del retículo endoplasmico, que son sus principales fuentes. Las células fagocíticas también producen el radical O_2^- , y participan en el mecanismo de destrucción de las bacterias (Curnutte, J.T and Babior, B.M., 1987). Los fagocitos capaces de producir el radical O_2^- son los monocitos, los neutrófilos, los eosinófilos y los macrófagos de varios tipos (Curnutte, J.T and Babior, B.M., 1987), incluyendo las células microgliales del cerebro (Colton, C.A. and Gilbert, D.L., 1987).

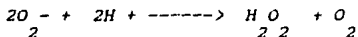
Se ha sugerido que la generación del radical O_2^- en la microglia puede servir de protección contra organismos que intentan infectar el sistema nervioso central (Colton, C.A. and Gilbert, D.L., 1987).

El radical O_2^- es poco reactivo, aunque puede inactivar directamente algunas enzimas (McCord, J.M. and Russell, W.J., 1988).

A.4.2.3. Peróxido de hidrógeno

La adición de un segundo electrón al radical O_2^- produce el ión peróxido, O_2^{2-} , que no tiene electrones desapareados y por lo tanto no es un radical. Una vez formado el O_2^{2-} a pH

fisiológico, inmediatamente se protona y se produce el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). En solución acuosa, el O_2^- lleva a cabo la reacción de dismutación a través de la enzima superóxido dismutasa que remueve el radical O_2^- convirtiéndolo en peróxido de hidrógeno por medio de la siguiente reacción:



Existen otras enzimas que producen H_2O_2 en los tejidos humanos, como la L-amino oxidasa y, de manera muy importante, la monoamino oxidasa.

La desaminación oxidativa de la dopamina por la monoamina oxidasa es la vía catabólica más importante en las terminales dopaminérgicas (Cohen, G., 1988). Cohen (1988) ha sugerido que en la enfermedad de Parkinson hay un recambio acelerado de la dopamina que produce un incremento en la formación de H_2O_2 , que puede provocar una fuerza oxidante en las terminales dopaminérgicas que sobreviven y así acelerar su destrucción.

El H_2O_2 es un agente oxidante, no muy reactivo (Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C., 1985), sin embargo, atraviesa las membranas celulares fácilmente ((Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C., 1985).

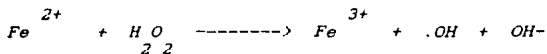
El H_2O_2 no es un radical porque no tiene electrones desapareados (figura 16) y puede ser removido de las células humanas

por la acción de 2 enzimas. la catalasa y la glutatión peroxidasa dependiente de selenio (Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C., 1985).

A.4.2.4. Radical hidroxilo

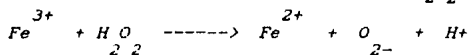
Se conoce que el H_2O_2 es tóxico a las células, pero la toxicidad no se mide por el efecto directo del H_2O_2 , excepto a concentraciones elevadas.

El H_2O_2 a su vez forma 2 radicales hidroxilo (OH.), debido a la fisión homolítica de enlace O-O de la molécula. La homólisis puede ser por calentamiento o por radiación ionizante. Si el H_2O_2 se combina con los iones de Fe^{2+} se forma el radical .OH, por la reacción de Fenton:



El producto inicial de la reacción del Fe^{2+} con el H_2O_2 es una especie altamente oxidante, como es el complejo de hierro llamado ferril, que se descompone para formar radicales .OH (Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C., 1988).

Pueden reaccionar trazas de Fe^{3+} con el H_2O_2 :



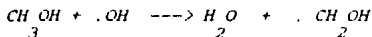
dependiente de este metal.

En la ecuación de Haber-Weiss está implícito que la toxicidad del radical O_2^- y el H_2O_2 in vivo es debido a su reacción con los iones hierro para formar radicales $\cdot OH$ y otras especies oxidantes como el ferril y el perferril. Existen muchas evidencias que apoyan esta sugerencia (Halliwell, B., and Gutteridge, 1985; Fridovich, I., 1978; Halliwell, B. and Gutteridge, J., 1988; Halliwell, B., 1987; Kyle, M. et al., 1988; Imlay, J. and Linn, S., 1988; Meneghini, R., 1988; Halliwell, B. and Gutteridge, J., 1986; Puppo, A. and Halliwell, B., 1989). En esta reacción el daño producido a las células por el H_2O_2 y el radical O_2^- está relacionado con la localización del hierro que cataliza la reacción (Curnutte, J.T. and Babior, B.M., 1987) en las células.

En general los iones de hierro convierten especies pobremente reactivas (O_2^- , H_2O_2 , tioles, lípido- O_2H) en otras más reactivas.

Los radicales $\cdot OH$ reaccionan con casi cualquier biomolécula de las células, incluyendo el DNA (causando alteraciones químicas a las bases púricas y pirimidicas), los lípidos de las membranas y los carbohidratos. La acción citotóxica del H_2O_2 en las células de los mamíferos involucra daño al DNA mediado por la reacción del H_2O_2 con los iones Fe^{2+} , unidos al DNA, para formar radicales $\cdot OH$ (Halliwell, B., 1987; Imlay, J.A. and Linn, S., 1988). Las reacciones de los radicales $\cdot OH$ son de tres tipos (Willson, 1978a):

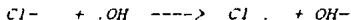
1) Abstracción del átomo de hidrógeno (ejemplo el metanol)



O bien su acción sobre las membranas lipídicas. Llevándose a cabo el proceso de PL por la abstracción de un átomo de hidrógeno de un ácido graso poliinsaturado (lípidos-H) en una membrana fosfolipídica.

2) Otra forma de que el radical $\cdot\text{OH}$ actúe, es por adición de estructuras de anillo aromático como las bases puricas y pirimidicas del DNA.

3) Transferencia de electrones. Por ejemplo con el ión Cl^- :



A.4.3. FUENTES DE RADICALES LIBRES IN VIVO

Numerosos agentes y procesos endógenos son capaces de generar radicales libres in vivo:

a) las especies reactivas del oxígeno como el radical superóxido, el H_2O_2 y el radical $\text{OH}\cdot$. se generan in vivo como consecuencia

del metabolismo normal, así como agentes que dañan el DNA como la irradiación (Ames, B., 1983; Autor, A., 1982; Nygaard, O. and Simic, M. 1983; Pryor, W. ed., 1982). La interacción de algunos componentes celulares con esas especies del oxígeno pueden contribuir a las enfermedades dependientes de la edad como el cáncer (Ames, B. 1983; Cerutti, P., 1985). En el caso de los radicales $\cdot\text{OH}$ se ha demostrado que producen daño al DNA (Nygaard, O. and Simic, M. 1983; Pryor, W. ed., 1982).

b) Los oxidantes en la presencia de iones metálicos inician la peroxidación de lípidos (Nygaard, O. and Simic, M. 1983; Pryor, W., 1982) que produce hidroperóxidos lipídicos como son los hidroperóxidos de ácidos grasos (Cutler, M. and Schneider, R., 1974), el hidroperóxido de colesterol (Bischoff, F., 1969), endoperóxidos de colesterol, epóxidos de ácidos grasos (Bischoff, F., 1969; Black, H. and Douglas, D., 1972; Imai, H. et al., 1980; Petrakis, N. et al., 1981) y aldehídos (Bird, R., 1982; Campbell, M. and Fantel, A., 1981; Ferrali, M. et al., 1980; Levin, D. et al., 1982), así como los radicales hidroperoxil y alcoxil (Levin, D. et al., 1982; Pryor, W., 1982) que son mutágenos y carcinógenos.

c) los peroxisomas que oxidan cantidades considerables de ácidos grasos de la dieta, generando una molécula de H_2O_2 de cada 2

unidades de carbono (Hirota, N. and Yokoyama, T., 1981; Ito, A. et al., 1982; Plaine, H., 1955; Reddy J. and Lalwani, N., 1983; Reddy, J. et al., 1982; Speit, G. et al., 1982; Tsuda, H., 1981). Niveles bajos de H_2O_2 no son atrapados por la catalasa en el

peroxisoma (Chance, B. et al., 1979; Horie, S. et al., 1981; Plaine, H., 1955; Reddy J. and Lalwani, N., 1983; Reddy, J. et al., 1982; Speit, G. et al., 1982; Tsuda, H., 1981), por lo que contribuyen a la poza de radicales del oxígeno, que también van a otras fuentes metabólicas. Las especies reactivas pueden dañar el DNA e iniciar una reacción en cadena que conduce a la producción de mutágenos y carcinógenos (Pryor, W., 1982).

d) los leucocitos en la respuesta inmune celular generan el H_2O_2

asi como los radicales O e .OH (Autor. A. 1982).

2-

e) La exposición a la luz puede excitar el oxígeno molecular y producir el oxígeno singulete, que es un potente mutageno e inductor de la oxidación de lípidos y proteínas.

Existen mecanismos de defensa que limitan los niveles de especies reactivas del oxígeno y así se previenen el daño celular (Ames. B., 1983; Autor. A. 1982; Hollstein, M. et al., 1984; Nygaard, O. and Simic, M., 1983; Pryor, W. 1982). Los mecanismos de defensa celular son las enzimas superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa (Ames. B., 1983; Autor. A. 1982; Nygaard, O. and Simic, M., 1983; Pryor, W., 1982), así como los antioxidantes beta-carotenos (Ames, B., 1983; Autor. A. 1982; Nygaard, O. and Simic, M., 1983; Pryor, W. 1982), los tocoferoles (Porter, R. and Whelan J. , 1983) y el ácido úrico (Ames, B. et al., 1981). Sin embargo, no existen defensas celulares específicas contra especies altamente reactivas como los radicales .OH.

A.4.4. DAÑO INDUCIDO POR LAS REACCIONES DE LOS RADICALES LIBRES

La defensa contra las reacciones de los radicales libres no es completa, ocurriendo una serie de cambios que incluyen:

a) Alteraciones generadas por la oxidación de moléculas grandes como la colágena (LaBella, F. and Paul, G., 1965), la elastina (LaBella, F. et al., 1966) y el material cromosómico (Harman, D. 1967; Tzs, S. and Walford, R., 1982).

b) Ruptura de los mucopolisacáridos (Matsumura, G. et al., 1966).

c) Acumulación de material metabólicamente inerte, como el cerenoide 26 y el pigmento de la edad (Miquel, J. et al., 1977).

d) Alteración en las características de las membranas de la mitocondria y lisosomas por peroxidación de lípidos (Hegner, D., 1980; Robinson, J. 1965; Witting, L., 1980).

e) Fibrosis arteriocapilar (Casarett, G., 1964; Harman, D. and Piette, L., 1966).

f) Disminución en la actividad enzimática (Fucci, L. et al., 1983). Los cambios inducidos por los radicales libres producen alteraciones que probablemente están relacionadas con la enfermedad y la muerte.

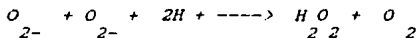
A.5. PROTECCION CONTRA LOS RADICALES LIBRES EN LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS

A.5.1. ENZIMAS

Varios tipos celulares contienen proteínas capaces de remover las especies reactivas del oxígeno que pueden iniciar la PL.

A.5.1.1. Superóxido dismutasa

La enzima superóxido dismutasa atrapa los radicales O_{2-} por medio de la siguiente reacción (McCord, J. and Fridovich, I., 1969):



Esta enzima participa en gran medida en la protección celular contra la peroxidación de lípidos.

El radical O_{2-} puede participar en la reducción del hierro y en la formación de H_2O_2 . Aún cuando el O_{2-} actúa como donador de un electrón, otros reductores citosólicos, como el ascorbato, reducen el hierro con mayor rapidez y quizás esas reacciones son más importantes en la célula que la del radical O_{2-} (Winterbourn, C., 1979). La enzima superóxido dismutasa puede producir H_2O_2 y participar así en la reacción de Fenton.

Hasta el momento no se ha obtenido la inhibición de la peroxidación de lípidos microsomal mediada por la enzima superóxido dismutasa (Pederson T. and Aust, S., 1975; Koster, J. and Slee, R., 1980; King, M. et al., 1975; Wriqth, J. et al., 1981), excep-

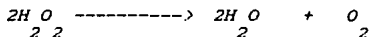
to cuando se utiliza un sistema de reducción como es el hierro que es absolutamente dependiente de O_2 .

El radical O_2^- puede producir otros efectos tóxicos en la células, porque reacciona con los grupos catecoles, con las catecolaminas, los tioles, el ascorbato y con proteínas que unen metales.

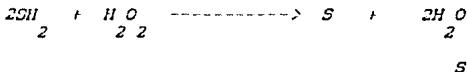
A.5.1.2. Catalasa y glutation peroxidasa

El H_2O_2 es dañino a los sistemas vivientes porque forma los radicales libres $\cdot OH$.

Sin embargo, existen dos tipos de enzimas para remover el H_2O_2 de las células. Las catalasas, que catalizan la reacción:



y las peroxidasas, por medio de la siguiente reacción:



donde el SH_2 es el sustrato de la oxidación.

Catalasa

La catalasa esta presente en la mayor parte de los órganos de los animales, pero se concentra en mayor proporción en el hígado y en los eritrocitos (Marklund, 1982). El cerebro, el corazón y

el musculo esquelético contienen pequeñas cantidades (Marklund, 1982). Se ha demostrado que la enzima tiene 4 subunidades de proteínas y cada una contiene un grupo hemo (Fe (III)-protoporfirina) unido a su sitio activo.

La catalasa esta localizada casi exclusivamente en los peroxisomas (DeDuve, C. and Baudhuin, P., 1966) además de que contiene algunas de las enzimas generantes del H_2O_2 , como es la enzima glicolato oxidasa. La mitocondria (al menos la del hígado), los cloroplastos y el retículo endoplásmico tienen pocas cantidades.

Glutation peroxidasa

En 1957 se identifico la actividad de la enzima glutacion peroxidasa en los eritrocitos y en el citosol de las células de los mamíferos y se demostró que su actividad es dependiente de glutacion reducido. Su reacción metaboliza el H_2O_2 (Mills, G., 1957; Mills, G., 1960).

Se ha descrito que la glutacion peroxidasa es una enzima dependiente de selenio (Rotruck, J. et al., 1972, 1973), constituyente esencial de la dieta (Schwartz, K. and Foltz, C., 1957).

Al selenio se le ha atribuido una actividad antioxidante (Zalkin, H. et al., 1960; Bieri, J. et al., 1961), porque una deficiencia de este en la dieta produce disminución en la actividad de glutacion (Chow, C. and Tappel, A., 1974; Hafeman, D. et al., 1974) e incremento de la peroxidación de lípidos in vivo (Kivitis, G. et al., 1982).

Con lo mencionado anteriormente se propuso que la enzima glutatión peroxidasa dependiente de selenio, presente en el citosol y en la matriz mitocondrial (Wendel, A., 1981) puede actuar como antiperoxidante en las células de los mamíferos.

Se ha postulado que esta enzima puede reducir los hidroperóxidos lipídicos a hidroxilípidos estables (Wendel, A., 1981) y así prevenir el rompimiento de los hidroperóxidos lipídicos que generan más radicales libres. La acción de esta enzima puede disminuir el número de radicales generados en la membrana y disminuir la peroxidación de lípidos (Flohé, L. et al., 1976).

El glutatión reducido es oxidado como resultado de su actividad antiperoxidante. El glutatión oxidado (GSSG) puede cambiar a su forma reducida a través de la enzima glutatión reductasa (Beutler, E., 1974; Carlberg, I. and Mennervik, B., 1985)



En condiciones normales, el glutatión está presente en las células como glutatión reducido libre. En el hígado de la rata, su concentración citosólica es alrededor de 5 mM (Krebs, H. et al., 1978), aunque varía en las diferentes áreas del lóbulo (Smith, M. et al., 1979) y está en el rango de 1 a 5 mM en varios tipos celulares (Kosower, N. and Kosower, E., 1978). La cantidad de glutatión oxidado en el citosol es muy baja, generalmente sólo de 1% a 3% del contenido total de glutatión reducido (Hazelton, G. and Lang, A., 1980; Tietze, F., 1969; Anderson, M., 1985).

El glutatión reducido es el más importante y abundante tiol no proteínico en sistemas vivos y está unido a los grupos sulfhidrilo (SH) de las proteínas intracelulares por puentes

disulfuro. Se ha reportado que en el hígado de la rata cerca del 30% del glutatión intracelular está presente en forma de mezclas de disulfuros (Harrap, K. et al., 1973).

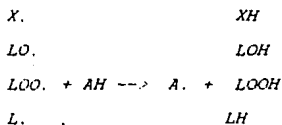
Existen diferentes pozos de glutatión reducido, el de la mitocondria y el del citosol (Jocelyn P. and Kamminga, A., 1974).

7.2. ANTIOXIDANTES

Los tocoferoles son componentes de las membranas de las células de los mamíferos, siendo el alfa-tocoferol (vitamina E) la forma más común.

Desde hace varios años se ha propuesto que la vitamina E es un buen antioxidante biológico (Mattill, H., 1947) que inhibe la peroxidación de lípidos *in vitro* (Tappel, A. and Zalkin, H., 1960).

Como se muestra en la siguiente reacción, los antioxidantes representados como AH, actúan dejando que los radicales libres sustraigan un átomo de hidrógeno de la molécula antioxidante y no de los ácidos grasos poliinsaturados, rompiendo la cadena de reacciones de los radicales libres y produciendo un radical antioxidante (A.) que es una especie relativamente no reactiva.



En el caso de la vitamina E, el grupo .OH en el anillo aromático actúa como donador del hidrógeno formándose los radicales cromanoxy y fenoxil (Tappel, A., 1962; Boguth, W. and Niemann.

1971). El radical O_2^- generado en estos sistemas reacciona con el grupo -OH de los antioxidantes biológicos fenólicos (ejemplo: la vitamina E) para formar los radicales fenoxil (Bruch, R. and Thayer, W., 1983; Capdevila, J. et al., 1982; Tajima, K. et al., 1983).

La vitamina E está localizada en las membranas intracelulares (Diplock, A., 1983; Buttriss, J. and Diplock, A., 1984), particularmente en el retículo endoplásmico y en la mitocondria.

La deficiencia de esta vitamina produce peroxidación in vitro en diferentes órganos, incluyendo el cerebro (Zalkin, H. and Tappel, A., 1960; Bieri, J. and Anderson, A., 1960; Kitabchi, A. and Williams, R., 1968), y su administración en la dieta protege contra la peroxidación de lípidos in vitro.

Se ha encontrado que los pigmentos carotenoides que están presentes en las membranas de las bacterias, las plantas y en la piel de los animales (Goodwin, T., 1984) son capaces de atrapar el radical O_2^- y así prevenir la peroxidación de lípidos en caso de que el oxígeno singulete estuviese involucrado (Mathews, M., 1964).

Los beta-carotenos tienen la capacidad de atrapar los radicales libres solo a presiones parciales del oxígeno que sean más bajas que en el aire normal y semejantes a las presiones parciales encontradas en muchos tejidos en condiciones fisiológicas.

A presiones elevadas del oxígeno, los beta-carotenos pierden su actividad antioxidante y presentan un efecto autocatalítico, prooxidante (Burton, G. and Ingold, K., 1984).

El ácido ascórbico citosólico, tiene un efecto prooxidante debido a la reducción de hierro (Fairhurst, s., 1983), pero también actúa como un antioxidante bajo ciertas condiciones.

10. REFERENCIAS

- Adams, R.D., Bogaert, L. avn. and van der Eecken, H. (1961). *Dégénéresces nigrostriés et cérébello-nigro-striés*. Psychiatr. neurol. (Basel). 142: 219-259.
- Adams, J.D., Kalivas, P.W. and Miller, C.W. (1989). The acute histopathology of MPTP in the mouse CNS. Brain Res. Bull. 23: 1-17.
- Agid, Y., Javoy, F., Glowinski, J., Bouvet, D. and Sotelo C. (1973). Injection of 6-hydroxydopamine into the substantia nigra of the rat: II. Diffusion and specificity. Brain Res. 58: 291-301.
- Ames, B.N., Cathcart, R., Schiviers, E. and Hochstein, P. (1981). Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant-an radical- caused ageing and cancer: A hypothesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78: 6858-6862.
- Ames, B.N. (1983). Dietary carcinogens and anticarcinogens (oxygen radicals and degenerative diseases. Science. 221: 1256-1264.
- Anderson, M.E. (1985). *Methods in Enzymology*, Vol. 113, Meister, A., Ed., Academic Press, Orlando, Fla. 548.
- Archibald, F.S. and Fridovich, I. (1981). in *Free Radicals in Biology* (Pryor, W.A., ed.), vol 5, pp. 1-28, Academic Press, New York.
- Arora, P.K., Riachi, N.J., Harik, S.I. and Sayre, L.M. (1988). Chemical oxidation of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and its *in vivo* metabolism in rat brain and liver. Biochem. Biophys. Res. Commun. 152: 1339-1347.
- Aruoma, o.I., Halliwell, B., Laughton, M.J. Quinlan, G.J. and Gutteridge, J.M.C. (1989). The mechanism of initiation of lipid peroxidation. Evidence against a requirement for an iron (II)-iron (III) complex. Biochem. J. 258: 617-620.
- Aust, S.D. and Svingen, B.A. (1982) in *Free Radicals in Biology* (Pryor, W.A., ed), vol. 5, pp 1-28, Academic Press, New York.
- Autor, A. (ed) (1982). *Pathology of Oxygen*. Academic Press, New York.
- Baker, J.K., Borne, R.F., Davis, W.M. and Waters, I.W. (1984). Metabolism of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in mouse liver preparations. Biochem. Biophys. Res. Commun. 125: 484-490.
- Baldry, P.A. and Swan, G.A. (1977). Studies related to the

chemistry of melanins.15. The electron transfer and free radicals properties of dopamelanin. *J. Chem.Soc. Perkin. Trans.II.* 1346-1350.

-Balentine, J.D. (1982). *Pathology of Oxygen Toxicity*. New York: Academic Press.

-Ballard, P.A., Tetrad, J.W. and Langston, J.W. (1985). Permanent human parkinsonism due to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): Seven cases. *Neurology* 35: 949-956.

-Barden, H. and Levine, S. (1983). Histochemical observations on rodent brain melanin. *Brain Res. Bull.* 10: 847-851.

-Bedard, P., Larochele, L., Parent, A. and Poirier, L.J. (1969). The nigrostriatal pathway: A correlative study based upon neuroanatomical and neurochemical criteria in the cat and monkey. *Exp. Neurol.* 25: 365-377.

-Benedetti, A., Comporti, M. and Esterbauer, H. (1980). Identification of 4-hydroxynonenal as a cytotoxic product originating from the peroxidation of liver microsomal lipids. *Biochim. Biophys. Acta.* 620: 281-296.

-Bernheimer, H., Birkmayer, W., Hornykiewicz, O., Jellinger, K. and Seitelberger, F. (1973). Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. *J. Neurol. Sci.* 20: 415-455.

-Beutler, E. (1974). Glutathione. *Proc. 16th Conf. German Soc. Mol. Chem., Flohe, L., Benohr, H. Ch., Waller, H.D. and Wendel, A., Eds., George Thieme, Stuttgart.* 109.

-Bieri, J.G. and Anderson, A.A. (1960). Peroxidation of lipids in tissue homogenates as related to vitamin E. *Arch. Biochem. Biophys.* 90: 105-110.

-Bieri, J.G., Lam, H., Prange, J. and Sondergaard, E. (1961). Effect of dietary selenium dioxide, cystine, ethoxyquin and vitamin E on lipid peroxidation in chick tissues. *Acta Physiol. Scand.* 52:36-43.

-Bird, R.P., Draper, H.H. and Basrur, P.K. (1982). Effect of malonaldehyde and acetaldehyde on cultured mammalian cells. Production of micronuclei and chromosomal aberrations. *Mutat. Res.* 101: 237-246.

-Birkmayer, W. and Riederer, P. (1983). *Parkinson's disease*. Springer, Vienna and New York.

-Bischoff, f. (1969). Carcinogenic effects of steroids. In: *Advances in Lipid Research*, edited by R. Paoletti and D. Kritchevsky, pp. 164-244. Academic Press, New York.

-Black, H.S. and Douglas, D.R. (1972). Model system for the

evaluation of the role of cholesterol alfa oxide in ultraviolet carcinogenesis. *Cancer Res.* 32: 2630.

-Blake, D.R., Winyard, P., Lunec, J., Williams, A., Good, P.A., Gutteridge, J.M.C., Rowley, D., Halliwell, B. and Hider, R.C. (1985). Cerebral and ocular toxicity induced by desferrioxamine. *Q.J. Med.* 219: 345-355.

-Bloom, F.E., Algeria, S., Gropetti, A., Revuelta, A. and Costa, E. (1969). Lesions of central norepinephrine terminals 6-OH dopamine: Biochemistry and fine structure. *Science.* 166: 1284-1286.

-Boguth, W. and Niemann, H. (1971). Electron spin resonance of chromanoxo free radicals from alfa-, beta-, gamma, tocopherol and tocol. *Biochim. Biophys. Acta.* 248: 121-130.

-Bonilla, E. (1978). Flameless atomic absorption spectrophotometric determination of manganese in rat brain and other tissues. *Clin. Chem.* 24: 471-474.

-Bradbury, A.J., Costall, B., Domeney, A.M., Jenner, P., Kelly, M.E., Marsden, C.D. and Naylor, R.J. (1986). 1-Methyl-4-phenylpyridine is neurotoxic to the nigrostriatal dopamine pathway. *Nature.* 319: 56-57.

-Bradbury, A.J., Brossi, A., Costall, B., Domeney, A.M., Gessner, W. and Naylor, R.J. (1986a). Biochemical changes caused by the infusion into the substantia nigra of the rat of MPTP and related compounds which antagonise dihydropteridine reductase. *Neuropharmacology.* 25: 583-586.

-Brimblecombe, R. W. and Pinder, R. M. (1972). Tremors and tremorogenic agents. *Scientifica, Bristol.*

-Brooks, B.R. and Klammer, O.C. (1968). Interaction of DNA with bifunctional aldehydes. *Eur. J. Biochem.* 5: 178-182.

-Brown, R.G. and Marden, C.D. (1984). How common is dementia in Parkinson's disease? *Lancet.* 2: 1262-1265.

-Bruch, R.C. and Thayer, W.S. (1983). Differential effect of lipid peroxidation on membrane fluidity as determined by electron spin resonance probes. *Biochim. Biophys. Acta.* 733: 216-222.

-Buege, J. and Aust, S. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 51: 302-310.

-Burk, R.F. and Ludden, T.M. (1989). Exhaled alkanes as indices of in vivo lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.* 38: 1029-1032.

-Bürki, H.R. (1974). Extrapyramidal side-effects. *Pharmacol. Therap.* 5: 525-534.

-Burns, R.S., Chiueh, C.C., Markey, S.P., Ebert, M.H., Jacobo-

- witz, 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-1,2,3,4-tetrahydropyridine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80: 4546-4550.
- Burton, G.W. and Ingold, K.U. (1984). B-carotene, an unusual type of lipid antioxidant. *Science*. 224: 569-573.
- Burton, G. and Ingold, K. (1986). Vitamin E: Application of the principles of physical organics chemistry to the exploration of its structure and function. *Acc. Chem. Res.* 19: 194-201.
- Bus, J.S., Cogen, S., Olgaard, M., Gibson, J.E. (1976). A mechanism of paraquat. II: Intermediates in the oxidation and reduction reactions of the 1-methyl-4-phenyl-2,3-dihydropyridinium ion and its deprotonated form. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 158: 63-71.
- Bus, J.S. and Gibson, J.E. (1979). *Reviews in Biochemical Toxicology*, Vol. 1, Hodgson, E., Bend, J.R., and Phipot, R.M., Eds., Elsevier/North-Holland, Amsterdam, 125.
- Butcher, L., Eastgate, M. and Hodge, G. (1974). Evidence that punctate intracerebral administration of 6-hydroxydopamine fails to produce selective neuronal degeneration. Comparison with copper sulfate and factors governing the department of fluids injected into brain. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 285: 31-70.
- Buttriss, J.L. and Diplock, A.T. (1984). *Methods in Enzymology*, Vol. 105, Packer, L., Ed., Academic Press, New York, 131.
- Calne, D.B. and Langston, J.W. (1983). Etiology of Parkinson's disease. *Lancet* 2: 1457-1459.
- Calne, D.B., Langston, J.S., Martin, W.R., Stoessl, A.J., Ruth, T.J., Adam, M.J., Pate, B.D., Schulzer, M. (1985). Positron emission tomography after MPTP: Observations relating to the cause of Parkinson's disease. *Nature*. 317: 246-248.
- Campbell, M.A. and Fantel, A.G. (1983). Teratogenicity of acetaldehyde *in vitro*: Relevance to the fetal alcohol syndrome. *Life Sci.* 32: 2641-2647.
- Capdevila, J., Marnett, L.J., Chacos, N., Prough, R.A. and Estabrook, R.W. (1982). Cytochrome P-450-dependent oxygenation of arachidonic acid to hydroxyicosa tetraenoic acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 79: 767-770.
- Carlsson, A., Lindqvist, M. and Magnusson, T. (1957). 3, 4-dihydroxyphenylamine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. *Nature*. 180: 1200.
- Carpenter, M.B. (1986). Anatomy of the ganglia basal. In: *Handbook of clinical neurology*, vol. 49, pp 1-18. Vinken, P.J. et

-Carpenter, K.L., Ball, R.Y., Ardeschna, K., Bindman, J., Enright, J., Hartley, S.L., Nicholson, S. and Mitchinson, M. (1987). in *Lipofuscin: State of the Art* (Nagy, Z.S., ed, pp 245-268, Elsevier.

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

-Cashman, J.R. and Ziegler, D.M. (1986). Contribution of N-oxidation to the metabolism of MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) by various liver preparations. *Mol. Pharmacol.* 29: 163-167.

-Cerutti, P.A. (1985). Prooxidant states and tumor promotion. *Science*. 227: 375-380.

-Chacón, J.N., Chedekel, M.R., Land, E.J. and Truscott, T.G. (1987). Chemically induced Parkinson's disease: intermediates in the oxidation of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine to the 1-methyl-4-phenyl-pyridinium ion. *Biochem. Biophys. res. Commun.* 144: 957-964.

-Chance, B., Sies, H. and Boveris, A. (1979). Hidroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 59: 527-605.

-Chang, G.D. and Ramirez, V.D. (1987). Effects on dopamine metabolism of MPTP and MPP+ infused through a push-pull cannula into the caudate nucleus of awake adult male rats. *Brain Res.* 424: 49-57.

-Cheeseman, A.J. and Clark, J.B. (1987). Effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine and its metabolite 1-methyl-4-phenylpyridine on acetylcholine synthesis in synaptosomes from rat forebrain. *J. Neurochem.* 48: 1209-1214.

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

-Chiba, K., Trevor, A.J. and Castagnoli Jr., N. (1985). Active uptake of MPP+, a metabolite of MPTP by brain synaptosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 128: 1228-1232.

-Chiba, K., Peterson, L.A., Castagnoli, K.P., Trevor, A.J. and Castagnoli, N. (1985a). Studies on the molecular mechanism of bioactivation of the selective nigrostriatal toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Drug. Metab. Dispos.* 13: 342-347.

-Chiba, K., Kubota, E., Miyakawa, T., Kato, Y. and Ishizaki, T. (1988). Characterization of hepatic microsomal metabolism as an

in *VIVO* detoxication pathway of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 246: 1108-1115.

-Chio, K.S. and Tappel, A.L. (1969). Inactivation of ribonuclease and other enzymes by peroxidizing lipids and by malonaldehyde. *Biochemistry.* 8: 2827.

-Chinstensen, E., Moller, J.E., and Faurbye, A. (1970). Neuro-pathological investigation of 28 brains from patients with dyskinesias. *Acta Psychiatr. Scand.* 46: 14-23.

-Chiueh, C.C., Markey, S.P., Burns, R.S., Johannessen, J.N., Pert, A. and Kopin, I.J. (1984). Neurochemical and behavioral effects of systemic and intranigral administration of N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 100: 189-194.

-Chiueh, C.C., Markey, S.P., Burns, R.S., Johannessen, J. N., Jacobowitz, D.M. and Kopin, I.J. (1984a). Neurochemical and behavioral effects of in rat, guinea pig, and monkey. *Psychopharmacol. Bull.* 20: 548-553.

-Chow, C.K. and Tappel, A.L. (1974). Response of glutathione peroxidase to dietary selenium in rats. *J. Nutr.* 104: 444-451.

-Cochrane, C.G., Schrautstatter, I., Hyslop, P. and Jackson, J. (1988) in *Oxygen Radicals and Tissue Injury* (Halliwell, B. ed.) pp. 49-54. FASEB.

-Cohen, G. (1985). Oxidative stress in the nervous system. In: *Oxidative Stress* (Ed. Sies H), pp. 383-402.

-Cohen, G. (1988). Oxygen radicals and Parkinson's disease. In: *Halliwell B. ed. Oxygen Radicals and Tissue Injury.* FASEB. 130-135.

-Colton, C.A., Gilbert, D.L. (1987). Production of superoxide anions by a CNS macrophage, the microglia. *FEBS LETT.* 223: 284-288.

-Comporti, M. (1987). Glutathione depleting and lipid peroxidation. *Chem. Phys. Lipids.* 45: 143-169.

-Constantinidis, J., Bouras, C. and Richard, J. (1983). Putative peptide neurotransmitters in human neuropathology: a review of topography and clinical implications. *Clin. Neuropathol.* 2: 47-54.

-Corongiu, F.P. and Milia, A. (1983). An improved and simple method for determining diene conjugation in autoxidized polyunsaturated fatty acids. *Chem. Biol. Interact.* 44: 289-297.

-Corangiu, 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. Pharmacol.* 36: 225-2253.
- Corseilis, J.A.N., Bruton, C.J. and Freeman-Browne, D. (1973). The aftermath of boxing. *Psychol. Med.* 3: 270-303.
- 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 neurotoxicity in mice is enhanced by pretreatment with diethylthiocarbamate. *Eur. J. Pharmacol.* 119: 127-128.
- Crippa, P.R. and Mazzinni, A. (1983). Involvement of superoxide ions in the oxidation of NADH by melanins. *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR* 15: 51-56.
- Cuello, A.C., Fiacco, M. del, Paxinos, G., Somogyi, P. and Priestley, J.V. (1981). Neuropeptides in striato-nigral pathways. *J. Neural. Transm.* 51: 93-96.
- Curnutte, J.T., Babor, B. (1987). Chronic granulomatous disease. *Adv. Hum. Genet.* 16: 229-297.
- Curtis, M.T. (1984). Lipid peroxidation increases the molecular order of microsomal membranes. *Arch. Biochem. Biophys.* 235: 644-649.
- Cutler, M.G. and Schneider, R. (1974). Tumours and hormonal changes produced in rats by subcutaneous injections of linoleic acid hydroperoxide. *Food Cosmet. Toxicol.* 12: 451-459.
- Dahle, L.K., Hill, E.G. and Holman, R.T. (1962). The thiobarbituric acid reaction and the autoxidations of polyunsaturated fatty acid methyl esters. *Arch. Biochem. Biophys.* 98: 253-261.
- Dahlström, A. and Fuxe, K. (1964). Evidence for the existence of monoamine containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol. Scand.* 62: 1-55.
- D'Amato, R.J., Lipman, Z.P. and Snyder, S.H. (1986). Selectivity of the parkinsonian neurotoxin MPTP: toxic metabolite MPP+ binds to neuromelanin. *Science.* 231: 987-989.
- D'Amato, R.J., Alexander, G.M., Schwartzman, R.J., Kitt, C.A., Price, D.L. and Snyder, S.H. (1987). Evidence of neuromelanin involvement in MPTP-induced neurotoxicity. *Nature.* 327: 324-326.
- D'Amato, R.J., Benham, D.F. and Snyder, S.H. (1987a). Characterization of the binding of N-methyl-4-phenylpyridine, the toxic metabolite of the parkinsonian neurotoxin N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, to neuromelanin. *J. Neurochem.* 48: 653-658.
- Daniels, a.J., Gysling, K. ad Abarca, J. (1981). Uptake and

- release of manganese by rat striatal slices. *Biochem. Pharmacol.* 30: 1833-1837.
- Davies, M. (1987). Applications of electron spin resonance spectroscopy to the identification of radicals produced during lipid peroxidation. 44: 149-173.
- Davis, G.C., Williams, A.C., Markey, S.P., Ebert, M.H., Caine, F.D., Reichert, C.M. and Kopin, I.J. (1979). Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry Res.* 1: 249-254.
- de Groot, H., Noll, T. and Toll, T. (1985). Loss of latent activity of liver microsomal membrane enzymes evoked by lipid peroxidation. Studies of nucleoside diphosphatase, glucose-6-phosphatase, and UDP glucuronyltransferase. *Biochim. Biophys. Acta.* 815: 91.
- DeDuve, C. and Baudhuin, P. (1966). Peroxisomes, microbodies and related particle. *Physiol. Rev.* 46: 323-327.
- Demopoulos, H.B., (1973). The basis of free radical pathology. *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 32: 1859-1861.
- Dexter, D., Carter, C. and Wells, F. (1989). Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 52: 381-389.
- Dexter, D.T., Wells, F.R., Lees, A.J., Agid, F.Y., Jenner, P. and Marsen, C.D. (1989a). Increased nigral iron content and alterations in other metal ions occurring in brain in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 52: 1830-1836.
- Diggory, G. and Buckett, W. (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.
- Dillard, C.J. and Tappel, A.L. (1984). *Methods in Enzymology*, Vol. 105, Packer, L., Eds., Academic Press, New York. 337.
- Di Monte, D., Sandy, M.S., Ekström, G. and Smith, M.T. (1986). Comparative studies on the mechanisms of paraquat and 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP+) cytotoxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 137: 303-309.
- Di Monte, D., Jewell, S.A., Ekström, G., Sandy, M.S. and Smith, M.T. (1986a). 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP+) cause rapid ATP depletion in isolated hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 137: 310-315.
- Di Monte, D., Ekström, G., Shinka, T., Smith, M.T., Trevor, A.J. and Castagnoli Jr., N. (1987). Role of 1-methyl-4-phenylpyridini-

um ion formation and accumulation in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity to isolated hepatocytes. *Chem. Biol. Interact.* 62: 105-116.

-DiMonte, D., Sandy, M.S., Blank, L. and Smith, M.T. (1988). Fructose prevents 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced ATP depletion and toxicity in isolated hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153: 734-740.

-Diplock, A.T. (1983). *Biology of Vitamin E*. CIBA Found. Symp. No. 101. Porter, R. and Whelan, J. Eds., Pitman, London. 49.

-Divac, I. and Oberg, R. (1982). *The neostriatum*. (Eds) Oxford, Pergamon Press. 215-230.

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

-Donaldson J. and Barbeau, A. (1985). Manganese neurotoxicity: possible clues to the etiology of human brain disorders. in *Neurology and Neurobiology*. Vol. 15: Metal Ions Neurology and Psychiatry (Gabay S., Harris, J. and Ho B.T., eds). Alan R. Liss, New York. pp 259-285.

-Duvoisin, R.C. (1976). Parkinsonism: animal analogues of the human disorder. In: *The basal ganglia* Ed.: M.D. Yahr. Raven Press, New York. pp 293-303.

-Ehringer, H. and Hornykiewicz, O. (1960). Verteilung von nora-drenalin und dopamin (3-hydroxytyramin) im Gehirn des Menschen und ihr Verhalten bei Erkrankungen des extrapyramidalen systems. *Wien Klin. Wochenschr.* 38: 1235-1239.

-Eichenberger, K., Böhm, P., Winterhalter, K.H., Kawato, S. and Richter, C. (1982). Microsomal lipid peroxidation causes an increase in the order of the membrane lipid domain. *FEBS Lett.* 142: 59-62.

-Elstner, E.F., Fischer, H.P., Osswald, W. and Kwiatkowski, G. (1980). Superoxide and ethane formation in subchloroplast particles: catalysis by pyridinium derivatives. *Z. Naturforsch.* 35 c: 770-775.

-Elstworth, J.D., Deutch, A.Y., Redmond, D.E. Jr., Sladek, J.R. Jr. and Roth, R.H. (1987). Differential responsiveness to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity in sub-regions of the primate substantia nigra and striatum. *Life Sci.* 40: 193-202.

-Everett, G. M. (1964). Animal and clinical techniques for evaluating antiparkinson agents. In: *Animal and Clinical pharmacologic techniques in drug evaluation*. Eds.: J.H. Nodine and P.E. Sieglar. Year Book Medical Publ., Chicago. pp 359-468.

-Fairhurst, S. Ph.D. thesis (1983). University of Birmingham, Birmingham, England.

-Fahn, S. (1977). secondary parkinsonism. In: *Scientific Approaches to Clinical Neurology*, edited by E.S. Goldensohn, and S.H.Appel, pp. 1159-1189. Lea & Febiger, Philadelphia.

-Fee, J.A. (1981). Oxygen and Oxy-radicals in Chemistry and biology. Rodgers, M.A.J. and Powers, E.L., Eds., Academic Press, New York, 205.

-Ferrari, M., Fulceri, R., Benedetti, A. and Comporti, M. (1980). Effects of carbonyl compounds (4-hydroxyalkenals) originating from the peroxidation of liver microsomal lipids on various microsomal enzyme activities of the liver. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 30: 99-112.

-Ferraro, T.N., Golden, G.T., De Mattei, M., Hare, T.A. and Fariello, R.G. (1986). Effect of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on levels of glutathione in the extrapyramidal system of the mouse. *Neuropharmacology*, 25: 1071-1074.

-Finean, J.B., Coleman, R. and Michell, R.H. (1979). *Membranes and Their Cellular Functions*. Blackwell Scientific, Oxford.

-Fischer, F. and Summers, L.A. (1980). Synthesis, polarography and herbicidal activity of quaternary salts of 2-(4-pyridyl)-1,3,5-triazene-5-(4-pyridyl)pyrimidine, 2-(4-pyridyl)pyrimidine and related compounds. *J. Heterocycl. Chem.* 17: 333-336.

-Fletcher, B.L., Dillard, C.J. and Tappel, A.L. (1973). Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological systems and tissues. *Anal. Biochem.* 52: 1-9.

-Foix, C. and Nicolesco, J. (1925). *Les noyaux gris centraux et la région mésencéphalo-sousaptique*. Masson, Paris.

-Fong, K.L., McCay, F.B., Foyer, J.L., Keele, B.B. and Mista, H. (1973). Evidence that peroxidation of lysosomal membrane is initiated by hydroxyl free radicals produced during flavin enzyme activity. *J. Biol. Chem.* 248: 7792-7797.

-Forno, L.S. and Norville, R.L. (1981). Synaptic morphology of the human locus coeruleus. *Acta Neuropathol.* (Berl.) 53: 7-14.

-Forno, L.S., Langston, J.W., Delaney, L.E., Irwin, B.S. and Ricuarte, G.A. (1986). Locus coeruleus lesions and eosinophilic inclusion in MPTP-treated monkeys. *Ann. Neurol.* 20: 449-455.

-Forno, L.S., Langston, J.W., Del Lanney, L.E., Irwin, I. (1988). An electron microscopic study of MPTP-induced inclusion bodies in an old monkey. *Brain. Res.* 448: 150-157.

-Frank, D.M., Arora, P.K., Blumer, J.L. and Sayre, L.M. (1987). Model study on the bioreduction of paraquat, MPP+, and analogs. Evidence against a redox cycling mechanism in MPTP neurotoxicity.

-Frei, B. and Richter, C. (1986). N-methyl-4-phenylpyridine (MPP+) together with 6-hydroxydopamine or dopamine stimulates Ca²⁺ release from mitochondria. FEBS Lett. 198: 99-102.

-Fridovich, I. (1975). Superoxide dismutases. Annu. Rev. Biochem. 44: 147-159.

-Fridovich, I. (1978). The biology of oxygen radicals. Science. 209: 875-877.

-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.

-Fujimoto, K., Neff, W.E. and Frankel, E.N. (1984). The reaction of DNA with lipid peroxidation products, metals and reducing agents. Biochim. Biophys. Acta. 795: 100-107.

-Fuller, R.W., Hahn, R.A., Snoddy, H.D. and Wikel, J.H. (1984). Depletion of cardiac norepinephrine in rats and mice by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). Biochem. Pharmacol. 33: 2957-2960.

-Fuller, R.W. and Hemrick-Leucke, S.K. (1985). Inhibition of types A and B monoamine oxidase by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. J. Pharmacol. Exp. Ther. 232: 696-701.

-Fuxe, K. and Anden N-E. (1966). Studies on the central monoamine neurons with special reference to the nigro-striatal dopamine neuron system. In: E. Costa et al. (Eds.) Biochemistry and Pharmacology of the Basal Ganglia. New York. Raven Press. 123-129.

-Fuxe, K. and Ungerstedt, U. (1976). Antiparkinsonian drugs and dopaminergic neostriatal mechanisms: studies in rats with unilateral 6-hydroxydopamine (6-OH-DA)-induced degeneration of the nigro-striatal DA pathway and quantitative recording of rotational behaviour. Pharmacol. Therap. B. 2: 41-77.

-García De Yébenes, J., Gervas, J.J., Iglesias, J., Mena, J., Martín del Río, R., and Somoza, E. (1982). Biochemical finding in a case of parkinsonism secondary to brain tumor. Annu. Neurol. 11: 313-316.

-Geraghty, J.J., Jankovic, J., Zetuský, W.J. (1985). Association between essential tremor and Parkinson's disease. Ann. Neurol. 17: 329-333.

-Gerlach, M., Riederer, P., Przuntek, H. and Youdim, M. (1991). MPTP mechanism of neurotoxicity and their implications for Parkinson's disease. Eur. J. Pharmacol. 208: 273-286.

-Gherardi, R., Rouades, B., Fleury, J., Probst, C., Poirier, J.

and Degos, J. D. (1985). Parkinsonian syndrome and central nervous system lymphoma involving the substantia nigra. *Acta Neuropathol (Berl.)*. 65: 338-343.

-Gibb, W.R.G., Costall, B., Domenech, A.M., Kelley, M.E. and Naylor, R.J. (1988). The histological effects of intracerebral injection or infusion of MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) and MPP+ (1-methyl-4-phenylpyridinium) in rat and mouse. *Brain Res.* 461: 361-366.

-Gilbert, D.L. (ed.) (1981). *Oxygen and Living Processes: An Interdisciplinary Approach*. Springer Verlag, New York.

-Glover, V., Gibb, C. and Sandler, M. (1986). Monoamine oxidase B (MAO-B) is the major catalyst for 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) oxidation in human brain and other tissues. *Neurosci. Lett.* 64: 216-220.

-Glowinski, J. and Iversen, 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.

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

-Goetz, C.G., Tanner, C.M., Levy, M., Wilson, R.S., and Garron, D.C. (1986a). Pain in Parkinson's disease. *Movement Disorders* 1: 45-49.

-Goldman, P. and Nauta, W. (1977). An intricately patterned prefrontocaudate projection in the rhesus monkey. *J. Comp. Neurol.* 171: 369-386.

-Goldstein, M., Battista, A.F., Ohmoto, T., Anagnoste, B. and Fuxe, K. (1973). Tremor and involuntary movements in monkeys: effect of L-DOPA and of a dopamine receptor stimulating agent. *Science.* 179: 816-817.

-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.: I. Hanin and E. Usdin. Pergamon Press. Oxford, 1977. pp 331-337.

-Goodchild, N.T., Kwock, L. and Lin, P.S. (1981). Melanin: a possible cellular superoxide scavenger. *Oxygen Oxy-Radicals Chem. Biol.* 645-648.

-Goodwin, T.W. (1984). *The Biochemistry of the Carotenoids*. 2nd ed., Vols. 1 and 2, Chapman and Hall, London, 1980 and 1984.

-Graham, D.G. (1978). Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones. *Mol. Pharmacol.* 14: 633-643.

- Graham, D.G. (1979). On the origin and significance of neuromelanin. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 103: 359-362.
- Graham, D.G. (1984). Catecholamine toxicity: a proposal for the molecular pathogenesis of manganese neurotoxicity and Parkinson's disease. *Neurotoxicology.* 5: 83-96.
- Gutteridge, J.M.C. (1977). The protective action of superoxide dismutase on metal-ion catalysed peroxidation of phospholipids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 77: 379-386.
- Gutteridge, J.M.C., Richmond, R. and Halliwell, B. (1979). Inhibition of the iron-catalysed formation of hydroxyl radicals from superoxide and of lipid peroxidation by desferrioxamine. *Biochem. J.* 184: 469-472.
- Gutteridge, J.M.C., Paterson, S.K., Segal, A.W. and Halliwell, B. (1981). Inhibition of lipid peroxidation by the iron-binding protein lactoferrin. *Biochem. J.* 199: 259-261.
- Gutteridge, J.M.C., Halliwell, B., Treffry, A., Harrison, P.M. and Blake, D. (1983). Effect of ferritin-containing fractions with different iron loading on lipid peroxidation. *Biochem. J.* 209: 557-560.
- Gutteridge, J.M.C. and Quinlan, G.J. (1983). Malondialdehyde formation from lipid peroxides in the thiobarbituric acid test: the role of lipid radicals, iron salts, and metal chelators. *J. Appl. Biochem.* 5: 293-299.
- Gutteridge, J.M.C. (1988) in *Oxygen Radicals and Tissue Injury* (Halliwell, B. ed). pp. 9-19, FASEB.
- Gutteridge, J. and Halliwell, B. (1990). The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *TIBS* 15: 129-135.
- Hafeman, D.G., Sunde, R.A. and Horekstra, W.G. (1974). Effect of dietary selenium on erythrocyte and liver glutathione peroxidase in the rat. 104: 580-587.
- Haley, T. and McCormick, W. (1957). Pharmacological effects produced by intracerebral injections of drugs in conscious mouse. *Br. J. Pharmacol.* 12: 12-15.
- Halliwell, B. (1981a). *Chloroplast Metabolism: the structure and Function of Chloroplasts in Green Leaf Cells*, Oxford University Press, Oxford.
- Halliwell, B. (1981b). In *Age Pigments* (Sohal, R.S., ed.). pp. 1-62. Elsevier/North-Holland, Amsterdam
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1984). Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy. *Lancet*:

- Halliwell, B. and Gutteridge, M. (1984a). Oxygen, toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219: 1-14
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1985). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Clarendon Press.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1986). Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch. Biochem. Biophys.* 246: 501-514.
- Halliwell, B. (1987). Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB J.* 358-364.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C.. (1988). Iron as a biological pro-oxidant. *ISI Atlas Sci Biochem.* 1: 48-52.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. (1989) *Free Radicals in Biology and Medicine*, 2nd edn. Clarendon Press.
- Halliwell, B. (1989). Oxidants and the central nervous system: some fundamental questions. *Acta Neurol. Scand.* 126: 23-33.
- Hallman, H., Olson, L. and Jonsson, G. (1984). Neurotoxicity of the meperidine analogue N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine on brain catecholamine neurones in the mouse. *Eur. J. Pharmacol.* 97: 133-136.
- Hallman, H., Lange, J., Olson, L., Strömberg, I. and Jonsson, G. (1985). Neurochemical and histochemical characterization of neurotoxic effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine on brain catecholamine neurones in the mouse. *J. Neurochem.* 44: 310-313.
- Harik, S.I., Schmidley, J.W., Lacofano, L.A., Blue, P., Arora, P.K. and Sayre, L.M. (1987). On the mechanisms underlying 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity: the effect of perinigral infusion of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, its metabolite and their analogs in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 241: 669-676.
- Harik, S.I., Mitchell, M.I. and Kalaria, R.N. (1987a). Human susceptibility and rat resistance to systemic 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) neurotoxicity correlate with blood brain barrier monoamine oxidase B activity. *Neurology.* 37: 338-339.
- Harman, D. and Piette, L.H. (1966). Free radical theory of aging: Free radical reactions in serum. *J. Gerontol.* 21: 560-565.
- Harman, D. (1967). Chromatin template capacity: Effect of oxygen. *Gerontologist* 7(3) (part 2): 29 (abstract).

- Harman, D. (1972). The biological clock: The mitochondria. *J. Am. Geriatr. Soc.* 20: 145-147.
- Harrap, K.R., Jackson, R.C., Riches, P.G., Smith, C.A. and Hill, B.T. (1973). The occurrence of protein-bound mixed disulfides in rat tissues. *Biochim. Biophys. Acta.* 310: 104-110.
- Hasegawa, E., Takeshige, K., Oishi, T., Murai, Y. and Minakami, S. (1990). 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) induces NADH-dependent superoxide formation and enhances NADH-dependent lipid peroxidation in bovine heart submitochondrial particles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 170: 1049-1055
- Hazelton, G.A. and Lang, C.A. (1980). Glutathione contents on tissues in the aging mouse. *Biochem. J.* 188: 25-30.
- Hedren, J.C., Struble, R.G., Whitehouse, P.J. and Price, D.L. (1984). Topography of the magnocellular basal forebrain system in human brain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 43: 1-21.
- Hefti, F. (1988). *Progress in Parkinson research.* Plenum Press, New York. pp 225.
- Hegner, D. (1980). Age-dependence of molecular and functional changes in biological membranes properties. *Mech. Ageing Dev.* 14: 101-118.
- Heikkilä, R.E., Shapiro, B.S. and Duvoisin, R.C. (1981). The relationship between loss of dopamine nerve terminals striatal 3H-spiroperidol binding and rotational behavior in unilaterally 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Brain Res.* 211: 285-292.
- Heikkilä, R.E., Hess, A. and Duvoisin, R.C. (1984). Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mice. *Science* 224: 1451-1453.
- Heikkilä, R.E., Manzano, L., Cabbat, F.S. and Duvoisin, R.C. (1984a). Protection against the dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine by monoamine oxidase inhibitors. *Nature.* 311: 467-469.
- Heikkilä, R.E., Nicklas, W.J. and Duvoisin, R.C. (1985). Dopaminergic toxicity after the stereotaxic administration of the 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+) to rats. *Neurosci. Lett.* 59: 135-140.
- Heikkilä, R.E., Nicklas, W.J., Vyas, I. and Duvoisin, R.C. (1985a). Dopaminergic toxicity of rotenone and the 1-methyl-4-phenylpyridinium ion after their stereotaxic administration to rats: implication for the mechanism of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity. *Neurosci. Lett.* 62: 389-394.
- Hirota, N. and Yokoyama, T. (1981). Enhancing effect of hydrogen

peroxide upon duodenal and upper jejunal carcinogenesis in rats. *Gann*. 72: 811-812.

-Hirsch. E., Graybiel, A.M. and Agid, Y.A. (1988). Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. *Nature*. 334: 345-348.

-Hochstein, P. and Ernster, L. (1963). ADP-activated lipid peroxidation coupled to the TPNH oxidase system of microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 12: 388-401.

-Högberg. J., Bergstrand, A. and Jakobsson, S.V. (1973). Lipid peroxidation of rat-liver microsomes its effect on the microsomal membrane and some membrane-bound microsomal enzymes. *Eur. J. Biochem.* 37: 51-59.

-Hollstein, M.C., Brooks, P., Linn, S. and Ames, B.N. (1984). Hydroxymethyluracil DNA glycosylase in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 81: 4003-4007.

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

-Horton, A. and Fairhurst, S. (1987). Lipid peroxidation and mechanisms of toxicity. *CRR Critical Reviews in Toxicology*. 18: 1-79.

-Hökfelt, T. and Ungerstedt, U. (1969). Electron and fluorescence microscopical studies on the nucleus caudatus nigro-neostriatal dopamine neurons. *Acta Physiol. Scan.* 76: 415-426.

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

-Horie, S., Ishii, H. and Suga, T. (1981). Changes in peroxisomal fatty acid oxidation in the diabetic rat liver. *J. Biochem.* 90: 1691.

-Hughes, H., Smith, C.V., Tsokos-Kuhn, J.O. and Mitchell, J.R. (1986). Quantitation of lipid peroxidation products by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 152: 107-112.

-Huhn, B. and Jakob, H. (1971). Traumatische Hirnstammläsionen mit vieljähriger Überlebensdauer. Beitrag zur Pathologie der Substantia nigra und der oralen Brückenhaube. *Nervenarzt.* 41: 326-334.

-Hunter, F.E., Jr., Gebicki, J.M., Hoffsten, P.I., Weinstein, J. and Scott, A. (1963). Swelling and lysis of rat liver mitochondria induced by ferrous ions. *J. Biol. Chem.* 238: 828-835.

- Imai, H., Werthessen, N.T., Subramanyam, V., LeQuessne, P.W., Soloway, A.H. and Kanisawa, M. (1980). Angiotoxicity of oxygenated sterols and possible precursors. *Science*. 207: 651-653.
- Imlay, J.A., Linn, S. (1988). DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science*. 240: 1302-1309.
- Irwin, I. and Langston, J.W. (1985). Selective accumulation of MPP+ in the substantia nigra: A key to neurotoxicity? *Life Sci*. 36: 213-218.
- Irwin, I., Wu, E.Y., DeLanney, L.E., Trevor, A.J. and Langston, J.W. (1987). The effect of diethylditiocarbamate on the biodisposition of MPTP: An explanation for enhanced neurotoxicity. *Eur. J. Pharmacol.* 141: 209-217.
- Ishii, T. and Nakamura, Y. (1981). Distribution and ultrastructure of Alzheimer's neurofibrillary tangles in postencephalitic parkinsonism of Economo type. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 55: 59-62.
- 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.
- Jacobowitz, D. M., Burns, R.S., Chiueh, C.C. and Kopin, I.J. (1984). N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine causes destruction of the nigrostriatal but not the mesolimbic dopamine system in the monkey. *Psychopharmacol. Bull.* 20: 416-422.
- Jain, S.K., Yip, R., Hoesch, R.M., Pramanik, A.K., Dallman, P.R. and Shohet, S.B. (1983). Evidence of peroxidative damage to the erythrocyte membrane in iron deficiency. *Am. J. Clin. Nutr.* 37: 26-36.
- Jain, S.K. (1984). The accumulation of malonyldialdehyde, a product of fatty acid peroxidation can disturb aminophospholipid organization in the membrane bilayer of human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 259: 3391-3394
- Javitch, J.A. and Snyder, S.H. (1984). Uptake of MPP (+) by dopamine neurons explains selectivity of parkinsonism-inducing neurotoxin, MPTP. *Eur. J. Pharmacol.* 106: 455-456.
- Javitch, J.A., D'Amato, R.J., Strittmatter, S.M. and 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.
- Javoy-Agid, F., Ruberg, M., Taquer, H., Bobobza, B., Agid, Y., Gaspar, P., Berger, B., N'gyuesn-Legros, J., Alvarez, C., Gray, F., Escourrolle, R., Scatton, B. and Rouquier, L. (1984). Biochemical neuropathology of Parkinson's disease. *Adv. Neurol.* 40:

- Javoy-Agid, F., Ruberg, M., Pique, L., Bertagna, X., Taquet, H., Studer, J.M., Cesselin, F., Epelbaum, J. and Agid, Y. (1984a). Biochemistry of the hypothalamus in Parkinson's disease. *Neurology*. 34: 672-676.
- Jayaram, A. (1985). Organization of thalamic projections in the nucleus accumbens and caudate nucleus in cats its relation with hippocampal and other subcortical afferents. *J. Comp. Neurol.* 231: 396-420.
- Jellinger, K. (1966). Läsionen des extrapyramidalem Systems bei akuten und protrahierten Komatzuständen. *Wie. Z. Nervenheilk.* 23: 40-73.
- Jellinger, K. (1969). Degenerations and exogenous lesions of the globus pallidus, caudate and lenticular nucleus. In: *Handbook of Clinical Neurology*, edited by P. Vinken and G.W. Bruyn, Vol. 6 pp. 632-693. North Holland, Amsterdam.
- Jellinger, K., Grisold, W. and Vollmer, R. (1983). Hirnatrophie bei Morbus Parkinson und (prä)seniler Demenz. In: *Fortschritte der klinischen Neurologie*, edited by G. Schreiberth and K. Patschky, pp 151-164. G. Thieme, Stuttgart and New York.
- Jellinger, K. and Riederer, P. (1984). Dementia in Parkinson's disease (pre) senile dementia of Alzheimer type: morphological aspects and changes in the intracerebral MAO activity. *Adv. Neurol.* 40: 199-210.
- Jellinger, K. (1986). Pathology of parkinsonism. In: *Recent developments in Parkinson's disease*. pp 33-54. Fahn, S., et al. (Eds.). Raven Press.
- Jellinger, K. (1987). Overview of morphological changes in Parkinson's disease. In: *Advances in Neurology*. Vol. 45 pp 1-18. Yahr, M.D., and Bergmann, K.J., (Eds.). Raven Press.
- Jenner, P., Rupniak, N.M., Rose, S., Kelly, E., Kilpatrick, G., Lees, A. and Marsden, C.D. (1984). 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinsonism in the common marmoset. *Neurosci. Lett.* 50: 85-90.
- Jocelyn, P.C. and Kamminga, A. (1974). The non-protein thiol of rat liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* 343: 356-362.
- Johannessen, J.N., Chiueh, C.C., Burns, R.S. and Markey, S.P. (1985). Differences in the metabolism of MPTP in the rodent and primate parallel differences in sensitivity to its neurotoxic effects. *Life Sci.* 36: 219-224.
- Jones, D.P., Thor, H., Smith, M.T., Jewell, S.A. and Orrenius, S. (1983). Inhibition of ATP-dependent microsomal Ca²⁺ sequestration during oxidative stress and its prevention by

glutathione *J. Biol. Chem.* 258: 6390-6393.

-Kaiya, H. (1974). Spino-olivo-ponto--cerebello-nigral atrophy with Lewy bodies and binucleated nerve cells. A case report. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 30: 263-269.

-Kilil, K. (1978). Patch-like terminations of thalamic fibers in the putamen of the rhesus monkey: an autoradiographic study. *Brain Res.* 140: 333-339.

-Kanazawa, I. (1986). Clinical pathophysiology of basal ganglia disease. In: *Handbook of Clinical Neurology*, Vol. 19. pp 65-. Vinken, P.J., et al. (Eds). Elsevier Science Publishers Co.

-Kaschnitz, P.M. and Hatofi, Y. (1975). Lipid oxidation in biological membranes. Electron transfer proteins as initiators of lipid autoxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 171: 292-304.

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

-Keller, H.H. and Da Prada, M. (1985). Evidence for the release of 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) from rat striatal neurons in vitro. *Eur. J. Pharmacol.* 114: 247-250.

-Kemp, J.M. and Powell, T. (1970). The corticostriate projection in the monkey. *Brain* 93: 525-546.

-Kindt, M.V., Heikkilä, R.E. and Nicklas, W.J. (1987). Mitochondrial and metabolic toxicity of 1-methyl-4-(2-methylphenyl)-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 242: 858-863.

-King, M.M., Lai, E.K. and McCay, P.B. (1975). Singlex oxygen production associated with enzyme-catalyzed lipid peroxidation in liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 250: 6496-6502.

-Kirschfeld, K. (1982). Carotenoid pigments: their possible role in protecting against photooxidation in eyes and photoreceptor cells. *Proc. R. Soc. London Ser. B.* 216: 71-85.

-Kitabchi, A.E. and Williams, R.H. (1968). Adrenal gland in vitamin E deficiency. Lipid peroxidation and malonaldehyde production in vitro. *J. Biol. Chem.* 243: 3248-3254.

-Kivitis, G.A.A., Ganguli-Swarttouw, M.A.C.R. and Christ, E.J. (1982). Influence of a low-selenium diet on erythrocyte glutathione peroxidase and alkane production in exhaled air of rats as a measure of lipid peroxidation in vivo during growth. *Biochim. Biophys. Acta.* 719: 329-333.

-Klebanoff, S.J. (1980). Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes. *Ann. Inter. Med.* 93: 480-489.

- Knoll, J.R. (1987). (-) Deprenyl (selegiline, Muvergan) facilitates the activity of the nigrostriatal dopaminergic neuron. *J. Neural. Transm. Suppl.* 25: 45-66.
- Knoll, J. (1988). The striatal dopamine dependency of life span in male rats. Longevity study with (-) deprenyl. *Mech. Ageing Dev.* 46: 237-262.
- Koeppen, A.H., Barron, K. and Cox, G. (1971). Striato-nigral degeneration. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 19: 10-19.
- Koller, W.C. (1984). Sensory symptoms in Parkinson's disease. *Neurology.* 34: 957-959.
- Kopin, I.J., Markey, S.F., Burns, R.S., Johannessen, J.N., Chiueh, C.C. (1985). Mechanisms of neurotoxicity of MPTP. In *Recent Developments in Parkinson's disease*, ed. S. Fahn, C.D. Marsden, P. Jenner, P. Teychenne, pp 165-173. New York; Raven.
- Kopin, I.J. (1986). Toxins and Parkinson's disease: MPTP parkinsonism in humans and animals. *Adv. Neurol.* 45: 137-144.
- Kopin, I. (1986a). MPTP effects on dopamine neurons. *Ann. New York Sci.* 451-461.
- Korytowski, W., Hintz, P., Sealy, R.C. and Kalyanaram, B. (1985). Mechanism of dismutation of superoxide produced during autoxidation of melanin pigments. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 131: 659-665.
- Korytowski, W., Felix, C.C. and Kalyanaram, B. (1987). Evidence for the one electron oxidation of 1-methyl-4-phenyl-2,3,-dihydropyridinium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 147: 354-360.
- Korytowski, W., Felix, C.C. and Kalyanaraman, B. (1989). Oxygen activation during the interaction between MPTP metabolites and synthetic neuromelanin: ESR-spin trapping, optical and oxidase electrode study. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 154: 781-788.
- Kosower, N.S. and Kosower, E.M. (1978). The glutathione status of cells. *Int. Rev. Cytol.* 54: 110-160.
- Koster, J.F. and Slee, R.G. (1960). Lipid peroxidation on rat liver microsomes. *Biochim. Biophys. Acta.* 620: 489-499.
- Krebs, H.A., Hems, R. and Vina, J. (1978). Functions of Glutathione in Liver and Kidney. Sies, H. and Wendel, A., Eds., Springer-Verlag, Heidelberg. 8.
- Kucheryants, V.G., Atadzhanov, M.A., Nikushin, E.V., Zagorevskii, V.A. and Sharkova, L.M. (1989). Lipid peroxidation in the caudate nuclei in experimental Parkinsonian syndrome. *Bull. Exp. Biol. Med.* 197: 45-48.

- Kunzle, H. (1978). An autoradiographic analysis of the efferent connections from premotor and adjacent prefrontal regions (areas 6 and 9) in *Macaca fascicularis*. *Brain Behav. Evol.* 15: 185-234.
- Kyle, M.E., Nakae, D., Sakaida, I., Miccadei, S., Faiber, J.L. (1988). Endocytosis of superoxide dismutase is required in order for the enzyme to protect hepatocytes from the cytotoxicity of hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 263: 3784-3789.
- LaBella, F.S. and Paul, G. (1965). Structure of collagen from human tendon as influenced by age and sex. *J. Gerontol.* 20: 54-59.
- LaBella, F.S., Vivian, S. and Thornhill, D.P. (1966). Amino acid composition of human aortic elastin as influenced by age. *J. Gerontol.* 21: 550-555.
- Lambert, C.E. and Bondy, C. (1989). Effects of MPTP, MPP+ and paraquat on mitochondrial potential and oxidative stress. *Life Sci.* 44: 1277-1284.
- Lang, A.E. and Johnson, K. (1987). Akathisia in idiopathic Parkinson's disease. *Neurology.* 37: 477-481.
- 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.
- Langston, J.W., Forno, L.S., Robert, C.S. and Irwin, I. (1984). Selective nigral toxicity after systemic administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the squirrel monkey. *Brain Res.* 292: 390-394.
- Langston, J.W., Irwin, I., Langston, E.B. and Forno, L.S. (1984a). Pargyline prevents MPTP-induced parkinsonism in primates. *Science.* 225: 1480-1482.
- Langston, J.W., Irwin, I., Langston, E.B. and Forno, L.S. (1984b). 1-Methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+): identification of a metabolite of MPTP, a toxin selective to the substantia nigra. *Neurosci. Lett.* 48: 87-92.
- Langston, J.W., Irwin, I. and Ricaurte, G.A. (1987). Neurotoxins. Parkinsonism and Parkinson's disease. *Pharmac. Ther.* 32: 19-49.
- Largillierre, C. and Melacon, S.B. (1988). Free malondialdehyde determination in human plasma by high-performance liquid chromatography. 170: 123-126.
- LeBel, C.P., Odunze, I.N., Adams, J.D. and Bondy, S.C. (1989). Perturbations in cerebral oxygen radical formation and membrane order following vitamin E deficiency. *Biochem. Res. Commun.* 163: 860-866.

-Levin, D.E., Hollstein, M., Christman, M.F., Schwiers, E. and Ames, B.N. (1982). A new salmonella tester strain (TA 102), with A: T base pairs at the site of mutation, detects oxidative mutagens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79: 7445-7449.

-Lewis, P.D. (1971). Parkinsonism-neuropathology. *Br. Med. J.* 3: 690-697.

-Lewy, F. H. (1913). Zur pathologischen Anatomie der Paralysis agitans. *Dtsch. Z. Nervenheilk.* 50: 50-55.

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

-Mann, D.M.A., Yates, P.O. and Hawkes, J. (1983). The pathology of the human locus coeruleus. *Clin. Neuropathol.* 2:1-7.

-Mann, D.M.A. and Yates, P.O. (1983). Pathological basis for neurotransmitter changes in Parkinson's disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 9: 3-19.

-Mann, D.M. and Yates, P.O. (1983). Possible role of neuromelanin in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Mech. Ageing. Dev.* 21: 193-203.

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

-Markey, S.P. and Schmuft, N.R. (1986). The pharmacology of the parkinsonian syndrome producing neurotoxin MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) and structurally related compounds. *Med. Res. Rev.* 6: 389-429.

-Marklund, et al. (1982). Copper and zinc-containing superoxide dismutase, manganese-containing superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in normal and neoplastic human cell lines and normal human tissues. *Cancer Res.* 42: 1955-1961.

-Marnett, L.J. and Tuttle, M.A. (1980). Comparison of the mutagenicities of malondialdehyde and the side products formed during its chemical synthesis. *Cancer Res.* 40: 276-282.

-Marshall, P.J., Warso, M.A. and Lands, W.E.M. (1985). Selective microdetermination of lipid hydroperoxides. *Anal. Biochem.* 145: 192-199.

-Martinovits, G., Melamed, E., Cohen, O., Rosenthal, J. and Uzzan, A. (1986). Systemic administration of oxidants does not protect mice against the dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Neurosci. Lett.* 69: 192-197.

- Mathews. M.M. (1964). Protective effect of B-carotene against lethal photosensitization by haematoporphyrin. *Nature* (London). 203: 1052.
- Matsumura, G., Herp, A. and Pigmon, W. (1966). Depolymerization of hyaluronic acid by antioxidants and radiations. *Radiat. Res.* 28: 735-752.
- Mattill, H.A. (1947). Antioxidants. *Ann. Rev. Biochem.* 16: 177-192.
- McCay, P.B. and Poyer, J.L. (1976). *The Enzymes of Biological Membranes*, Vol. 4, Martinosi, A., Ed., Plenum Press, New York. 239.
- McCay, P.B. (1985). Vitamin E. Interactions with free radicals and ascorbate. *Annu. Rev. Nutr.* 5: 325-340.
- McCord, J.M. and Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte cytochrome c. *J. Biol. Chem.* 244: 6049-6055.
- McCord, J.M., Russell, W.J. (1988). Superoxide inactivates creatine phosphokinase during reperfusion of ischemic heart. In: Cerutti, P.A., Fridovich, I., McCord, J.M., eds. *Oxy-Radicals in Molecular Biology and Pathology*. New York: AR Liss Inc. 27-35.
- McGeer, S., William, A. and McGeer, P. (1984). Neurotransmitters in the Basal Ganglia. *Can. J. Neurol. Sci.* 11: 89-99.
- Mead, J.F. (1976). *Free Radicals in Biology*. Vol. 1, Pryor, W.A., Ed., Academic Press, New York, 51.
- Mead, J.F., Sevanian, A., Stein, R.A. and Wu, G.S. (1979). *Biochemical and Clinical Aspects of Oxygen*. Caughey, W.S., Ed., Academic Press, New York, 699.
- Mehler, W. (1966). Further notes on the center median nucleus of Luys. In: D.P. Purpura and M.D. Yahr (Eds). *The thalamus*. New York. Columbia University Press. 109-127.
- Melamed, E., Youdim, M.B., Rosenthal, J., Spanier, I., Uzzan, A. and Globus, M. (1985). IN VIVO effect of MPTP on monoamine oxidase activity in mouse striatum. *Brain Res.* 359: 360-363.
- Melamed, E., Rosenthal, J., Globus, M., Cohen, O., Frucht, Y. and Uzzan, A. (1985a). Mesolimbic dopaminergic neurons are not spared by MPTP neurotoxicity in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 114: 97-100.
- Mena, I., Marin, O., Fuenzalida, S. and Cotzias, G.C. (1967). Chronic manganese poisoning. *Neurology*. 17: 1123-1129.
- Meneghini, R. (1988). Genotoxicity of active oxygen species in

-Mesulam, M. M., Mufson, E.J., Levey, A.L. and Wainer, B.H. (1983). Cholinergic innervation of cortex by the basal forebrain. *J. Comp. Neurol.* 34: 1-8.

-Mihatsch, W., Russ, H. and Przuntek, H. (1988). Intracerebroventricular administration of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion in mice: effects of simultaneously administered nomifensine, deprenyl, and 1-t-butyl-4,4-diphenylpiperidine. *J. Neural. Transm.* 71: 177-188.

-Mills, G.C. (1960). Glutathione peroxidase and the destruction of hydrogen peroxide in animal tissues. *Arch. Biochem. Biophys.* 86: 1-5

-Minotti, G. and Aust, S. (1987). The role of iron in the initiation of lipid peroxidation. *Chem. Phys. Lipids.* 44: 191-208.

-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 W.A. Pryor, pp. 133-182. Academic Press, New York.

-Mizuno, Y., Suzuki K., Sone N. and Saitoh, T. (1988). Inhibition of mitochondrial respiration by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mouse brain *in vivo*. *Neurosci. Lett.* 91: 349-353.

-Mizuno, Y., Suzuki, K., Sone, N. and Saitoh, T. (1987). Inhibition of ATP synthesis by 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+) in isolated mitochondria from mouse brains. *Neurosci. Lett.* 81: 204-208.

-Mizutani, T., Oda, M., Abe, H., Fukuda, S., Oikawa, H. and Kosaka, K. (1983). Hereditary multisystemic degeneration with unusual combination of cerebellipetal, denato-rubral, and nigro-subthalamo-pallidal degeneration. *Clin. Neuropathol.* 2: 147-153.

-Mjones, H. (1949). Paralysis agitans: a clinical and genetical study. *Acta Psychiatrica Scan Supplementum.* 54: 1

-Moore, R.Y. and Bloom, F.E. (1979). Central catecholamine system: anatomy and physiology of norepinephrine and epinephrine systems. *Annu. Rev. Neurosci.* 2: 113-168.

-Morsier, G. de (1960). Parkinsonism consecutif à une lesion traumatique du noyau rouge et du locus niger. *Psychiatr. Neurol. (Basel).* 139: 60-84.

-Mukai, F.H. and Goldstein, B.D. (1976). Mutagenicity of malonaldehyde, a decomposition product of peroxidized polyunsaturated fatty acids. *Science.* 191: 868-869.

-Mytilineou, C. and Cohen, G. (1984). 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-

tetrahydropyridine destroys dopamine neurons in explants of rat embryo mesencephalon. *Science*. 225: 529-531.

-Mytilineou, C., Cohen, G. and Heikkila, R.E. (1985). 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) but not 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) selectively destroys dopaminergic neurons in cultures of dissociated rat mesencephalic neurons. *Neurosci. Lett.* 72: 215-220.

-Mytilineou, C. and Friedman, L. (1988). Studies on the metabolism and toxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in cultures of embryonic rat mesencephalon. *J. Neurochem.* 51: 750-755.

-Mytilineou, C., Friedman, L.K. and Eanias, P. (1988). Studies on the toxicity of MPTP to dopamine neurons in tissue and cell cultures. In: *Progress in Parkinson Research* (Ed. Hefta F), pp 127-136. Plenum, New York.

-Nakamura, S. and Vincent, S.R. (1986). Histochemistry of MPTP oxidation in the rat: sites of synthesis of the parkinsonism-inducing toxin MPP+. *Neurosci. Lett.* 65: 321-325.

-Nakamura, H., Kato, S. and Tanaka, J. (1989). Mitochondria covered with a net of parallel and latticed filaments in nigral neurons of monkeys with experimental parkinsonism. *Acta Neuropathol.* 77: 489-493.

-Namura, I., Douillet, P., Sun, C.J., Pert, A., Cohen, R.M. and Chueh, C.C. (1987). MPP+ (1-methyl-4-phenylpyridine) is a neurotoxin to dopamine, norepinephrine and serotonin-containing neurons. *Eur. J. Pharmacol.* 136: 31-37.

-Nicklas, W.J., Vyas, I. and Heikkila, R. E. (1985). Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6,-tetrahydropyridine. *Life Sci.* 36: 2503-2508.

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

-Nohl, H. and Hgner, D. (1978). Do mitochondria produce oxygen radicals in vivo? *Eur. J. Biochem.* 82: 863-867.

-Nygard, O.F. and Simic, M.G. (eds.) (1983). *Radioprotectors and Anticarcinogens*. Academic Press, New York.

-O'Brien, P.J. (1969). Intracellular mechanisms for the decomposition of a lipid peroxide. I. decomposition of a lipid peroxide by metal ions, hemecompounds, and nucleophiles. *Can. J. Biochem.* 47: 485-492.

-Oduze, I.N., Klaidman, L.K. and Adams, J.D. (1990). MPTP toxicity in the mouse brain and vitamin E. *Neurosci. Lett.* 108: 346-

- Orrenius, S., McConkey, D.J., Bellomo, G. and Nicotera, P. (1989). Role of Ca (II) in toxic cell killing. *Trends Pharmacol. Sci.* 10: 281-285.
- Palmer, D.N., Rabin, B.R. and Williams, D.J. (1978). A subpopulation of rat liver membrane-bound ribosomes that are detached in vitro by carcinogens and centrifugation. *Biochem. J.* 176: 9.
- Pall, H.S., Williams, A.C., Blase, D.R., Wiyard, P., Lunec, J. (1986). Lipid peroxidation and Parkinson's disease. *Lancet* 11: 870-871.
- Pall, H.S., Williams, A. C., Blake, D.R., Lunec, J., Gutteridge, J.M.C., Hall, M. and Taylor, A. (1987). Raised cerebrospinal-fluid copper concentrations in Parkinson's disease. *Lancet*. 11: 238-241.
- Parkinson, J. (1817). *An essay on the shaking palsy.* London, Wittingham and Rowland.
- Parkkenberg, H and Brody, H. (1965). The number of nerve cells in the substantia nigra in paralysis agitans. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 5: 320-324.
- Péchadre, J.C., Larochele, L. and Poirier, L.J. (1976). Parkinsonian akinesia, rigidity and tremor in the monkey. *J. Neurol. Sci.* 28: 147-157.
- Pederson, T.C. and Aust, S.D. (1975). The mechanism of liver microsomal lipid peroxidation. *Biochim. Biophys. Acta.* 385: 232-241.
- Perese, D.A., Ullman, J., Viola, J., Ewing, S.F. and Bankiewicz, K.S.: (1989). A 6-hydroxydopamine-induced selective parkinsonian rat model. *Brain Res.* 494: 285-293.
- Perry, T.L., Godin, Dv., Hansen, S. (1982). Parkinson's disease: A disorder due to nigral glutathione deficiency?. *Neurosci. Lett.* 33: 305-310.
- 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.
- Perry, T.L., Yong, V.W., Jones, K., Wriqth, 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.

- Petrakis, N.L., Gruenke, L.D. and Craig, J.C. (1981). Cholesterol and cholesterol epoxides in nipple aspirates of human breast fluid. *Cancer Res.* 41: 2563-2565.
- Pikarsky, E., Melamed, E., Rosenthal, J., Uzzan, A. and Michowitz, S.D. (1987). The neurotoxin MPTP does not affect striatal superoxide dismutase activity in mice. *Neurosci. Lett.* 82: 327-331.
- 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.
- Ploska, A., Taquet, H., Javoy-Agid, F., Gaspar, P., Cesselin, F., Berger, B., Hamon, M., LeGrand, J.C. and Agid, Y. (1982). Dopamine and methionine-enkephalin in human brain. *Neurosci. Lett.* 33: 191-196.
- 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.
- Poirier, L.J., Langellier, 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.
- Poirier, J. and Barbeau, A. (1985). 1-Methyl-4-phenyl-pyridinium-induced inhibition of nicotinamide adenosine dinucleotide cytochrome c reductase. *Neurosci. Lett.* 62: 7-11.
- 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. Commun.* 128: 25-33.
- Poirier, J. and Barbeau, A. (1987). MPTP potentiates iron induced lipid peroxidation without the involvement of free radicals derived from oxygen. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 56: 387-399.
- Porter, N.H. (1980). Prostaglandin endoperoxides. In: *Free Radicals in Biology*, Vol. 4, edited by W. Pryor, pp 261-294. Academic Press, New York.
- Powell, T. and Cowan, W. (1956). A study of thalamostriate relations in the monkey. *Brain* 79: 364-390.
- Price, K.S., Farley, I.J. and Hornykiewicz, O. (1978). Neurochemistry of Parkinson's disease: relation between and limbic dopamine. In: *Advances in Biochemical Psychopharmacology*, Vol. 19 edited by P.J. Roberts and G. N. Woodruff, pp 293-300. Raven Press, New York.
- Prohaska, J.R. (1987). Functions of trace elements in brain

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

-Puppo, A., Halliwell, B. (1989). Oxidation of dimethylsulphoxide to formaldehyde by oxyhaemoglobin and oxleghaemoglobin in the presence of hydrogen peroxide is not mediated by "free" hydroxyl radicals. *Free Radical Res. Commun.* 5: 277-281.

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

-Rail, D., Scholtz, C., and Swash, M. (1981). Post-encephalitic parkinsonism: current experience. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 44: 670-676.

-Ramsay, 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.

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

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

-Ramsay, R.R., Kowal, A.T., Johnson, M.K., Salach, J.I. and Singer, T.P. (1987). The inhibition site of MPP⁺, the neurotoxic bioactivation product of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine is near the Q-binding site of NADH dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* 259: 645-649.

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

-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.

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

-Rehncrona, S., Smith, D.S., Akesson, B., Westenberg, E. and Siesjo, B.K. (1980). Peroxidative changes in brain cortical fatty acids and phospholipids, as characterized during Fe²⁺ and ascor-

bic acid-stimulated lipid peroxidation *in vitro*. *J. Neurochem.* 34: 1630-1638.

-Riederer, P. and Jellinger, K. (1983). Morphologie und Pathobiologie der Parkinson-Krankheit. In: Pathophysiologie, Klinik und Therapie des Parkinsonismus, edited by H. Ganshirt, pp 31-50. Editions Roche, Basel.

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

-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.

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

-Rodgers, A.D. and Curzon, G. (1975). Melanin formation by human brain *in vitro*. *J. Neurochem.* 24: 1123-1129.

-Rossetti, Z.L., Sotgiu, A., Sharp, D.E., Hadjiconstantinou, M. and Neff, N.H. (1988). 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and free radicals *in vitro*. *Biochem. Pharmacol.* 37: 4573-4574.

-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, edited by F. Rossi and P. Patriarca, pp. 283-320. Plenum, New York.

-Rotruck, J.T., Hoekstra, W.G., Pope, A.L., Ganther, H., Swanson, A. and Hafeman, D. (1972). Trace Minerals-selenium. *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 31: 691-692.

-Rotruck, J.T., Pope, A.L., Ganther, H.A., Swanson, A.B., Hafeman, D. and Hoekstra, W.G. (1973). Selenium: Biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science.* 179: 588-590.

-Roy, S. and Wolman, L. (1969). Ultrastructural observations in parkinsonism. *J. Pathol.* 99: 39-44.

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

-Salach, J.I., Singer, T.P., Castagnoli, N. and Trevor, A. (1984). Oxidation of the neurotoxic amine by monoamine oxidases A and B and suicide inactivation of the enzymes by MPTP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 125: 831-835.

- Saldívar, A., Ríos, C. and Fernández-Guasti. (1991). Differential role of serotonin and noradrenaline on anxiety reduction after ejaculation in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 38: 807-812.
- Sanchez-Ramos, J.R., Hefti, F., Hollinden, D.E., Jasick, T. and Rosenthal, M. (1988). Oxyradicals and mitochondrial inhibition hypotheses. In: *Progress in Parkinson Research* (Ed. Hefti, F. pp 145-152. Plenum Press, New York.
- Sanchez-Ramos, J.R., Hollinden, G.E., Sick, T.J. and Rosenthal, M. (1988a). 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) increases oxidation of cytochrome-b in rat striatal slices. *Brain Res.* 443: 183-189.
- Santamaria, J. Tolosa, E., Valles, A. (1986). Parkinson's disease with depression: a possible subgroup of idiopathic parkinsonism. *Neurology.* 36: 1130-1133.
- Sato, R. and Omura, T. (eds) (1978). *Cytochrome P-450*. Academic Press, New York.
- Sayre, L.M., Arora, P.K., Lacofano, L.A. and Harik, S.I. (1986). Comparative toxicity of MPTP, MPP+ and 3,3-dimethyl-MPDP+ to dopaminergic neurons of the rat substantia nigra. *Eur. J. Pharmacol.* 124: 171-174.
- Sayre, L. (1989). Biochemical mechanism of action of the dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Toxicology Lett.* 48: 121-149.
- Scatton, B., Javoy-Agid, F., Rouquier, L., Dubois, B. and Agid, Y. (1983). Reduction of cortical dopamine, noradrenaline, serotonin and their metabolites in Parkinson's disease. *Brain Res.* 275: 321-328.
- Scatton, B., Monfort, J.C., Javoy-Agid and Agid, Y. (1984). Amine deficiencies in Parkinson's disease. In: *Catecholamines: Neuropharmacology and Central Nervous System-Therapeutic Aspects*, pp 43-52. Alan R. Liss, New York.
- Schramm, V.L. (1982). Metabolic regulation: could Mn²⁺ be involved?. *Trends Biochem. Sci.* 7: 369-371.
- Schwab, R.S. (1960). Progression and prognosis of Parkinson's disease. *J. nervous & Mental disease.* 130: 556-566.
- Schwab, R. and England, a. D. (1968). Parkinsonism syndromes due to various specific causes. In: *Handbook of Clinical Neurology*, edited by P. Vinken and G. W. Bruyn Vol. 6 pp. 227-247. North Holland, Amsterdam.
- Scherman, 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.

- Schinelli, S., Zuddas, A., Kopin, I.J., Barker, J.L. and Di Porzio, U. (1988). 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine metabolism and 1-methyl-4-phenylpyridinium uptake in dissociated cell cultures from the embryonic mesencephalon. *J. Neurochem.* 50: 1900-1907.
- Schmidt, C.J., Matsuda, L.A. and Gibb, J.W. (1984). *In vitro* release of tritiated monoamines from rat CNS tissue by the neurotoxic compound 1-methyl-1-phenyl-tetrahydropyridine. *Eur. J. Pharmacol.* 103: 255-260.
- Schwartz, K. and Foltz, C.M. (1957). Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *J. Am. Chem. Soc.* 79: 3292-3293.
- Sealy, R.C., Hyde, J.S., Felix, C.C., Menon, I.A., Protta, G., Swartz, H.M., Persad, S. and Haberman, H.F. (1982). Novel free radicals in synthetic and natural pheomelanins: distinction between dopa melanins and cysteinyl-dopa melanins by ESR spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79: 2885-2889.
- Sershen, H., Reith, M.E.A., Hashim, A. and Lajtha, A. (1985). Protection against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity by the antioxidant ascorbic acid. *Neuropharmacology.* 24: 1257-1259.
- Shen, R.S., Abell, C.W., Gessner, W. and Brossi, A. (1985). Serotonergic conversion of MPTP and dopaminergic accumulation of MPP+. *FEBS Lett.* 189: 225-230.
- Shimasaki, H., Ueta, N., Mowri, R.M. and Inoue, K. (1984). Formation of age pigment-like fluorescent substances during peroxidation of lipids in model membranes. *Biochem. Biophys. Acta.* 792: 123-129.
- 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.
- Shukla, G.S. and Chandra, S.V. (1981). Manganese toxicity: lipid peroxidation rat brain. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 48: 95-100.
- 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: 583-588.
- Singer, T.P., Trevor, A.J. and Castagnoli, N. Jr. (1987). Biochemistry of the neurotoxic action of MPTP. *Trends Biochem. Sci.* 12: 266-270.
- Singer, T.P., Castagnoli, Jr., Ramsay, N. and Trevor, A.J.

- (1987a). Biochemical events in the development of parkinsonism induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *J. Neurochem.* 49: 1-8.
- Sirinathsinghji, D.J.S., Heavens, R.P., Richards, S.J., Beresford, I.J.M. and Hall, M.D. (1988). Experimental hemiparkinsonism in the rat following chronic unilateral infusion of MPP+ into the nigrostriatal dopamine pathway. I. Behavioural, neurochemical and histological characterization of the lesion. *Neuroscience*, 27: 117-128.
- Slater T. and Sawyer, B. (1971). The stimulatory effects of carbon tetrachloride and other halogenoalkanes on peroxidative reactions in rat liver fractions *in vitro*. *Biochem. J.* 123: 805-814.
- Smith, M.T., Ekström, G., Sandy, M.S. and Di Monte, D. (1987). Studies on the mechanism of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine cytotoxicity in isolated hepatocytes. *Life Sci.* 40: 741-748.
- Smith M., Loverding, N. (1979). The distribution of glutathione in rat liver lobule. *Biochem. J.* 182: 103-108.
- Snyder, S.H. and D Amato, R.J. (1986). MPTP: a neurotoxin relevant to the pathophysiology of Parkinson's disease. *Neurology*, 36: 250-258.
- Speit, G., Vogel, W. and Wolf, M. (1982). Characterization of sister chromatid exchange induction by hydrogen peroxide. *Environ. Mutagen.* 4: 135.
- Sree Kumar K., Rowse C. and Hochstein P. (1978). Copper-induced generation of superoxide in human red cell membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 83: 587-592.
- Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T.E., Khoo, J.C. and Witztum, J.L. (1989). Mechanisms of disease. Beyond cholesterol: modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N. Engl. J. Med.* 320: 915-924.
- Stern, Y., Langston, J.W. (1985). Intellectual changes in patients with MPTP-induced parkinsonism. *Neurology*, 35: 1506-1509.
- Stern, Y., Tetrad, J., Langston, J.W. (1986). Intellectual changes in asymptomatic MPTP-exposed subjects. *Ann. Neurol.* 20 (1): 170.
- Summerfield, F.W. and Tappel, A.L. (1984). Protection and measurement by high-performance liquid chromatography of malondialdehyde crosslinks in DNA. *Anal. Biochem.* 143: 265-271.
- Sundstrom, E., Goldstein, M. and Jonsson, G. (1986). Uptake inhibition protects nigro-striatal dopamine neurons from the neurotoxicity of 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP+) in mice. *Eur.*

-Sundstrom, E., Strömberg, I., Tsutsumi, T., Olson, L. and Jonnson, G. (1987). Studies of the effect of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) on central catecholamine neurons in C57 BL/6 mice. Comparison with three other strains of mice.

-Swan, G.A., and Waggott, A. (1970). Studies relates to the chemistry of melanins X. Quantitative assessment of different types of units present in dopa-melanin. J. Chem. Soc. (C). 1409-1422).

-Szabo, J. (1962). Topical distribution of striatal efferents in the monkey. Exp. Neurol. 5: 21-36.

-Szabo, J. (1967). The efferent projections of the putamen in the monkey. Exp. Neurol. 19: 463-476.

-Szabo, J. (1970). Projections from the body of the caudate nucleus in the rhesus monkey. Exp. Neurol. 27: 1-15.

-Szabo, J. (1980). Organization of the ascending striatly afferents in monkeys. J.Comp. Neurol. 189: 307-321.

-Tadano, T., Satoh, N., Sakuma, I., Matsumura, T., Kisara, K., Arai, Y. and Kinemuchi, H. (1987). Behavioral and biochemical changes following acute administration of MPTP and MPP+. Life Sci. 40: 1309-1318.

-Tajima, K., Sakamoto, M., Okada, K., Mukai, K., Ishizita, K., Sakurai, H. and Mori, H. (1983). Reaction of biological phenolic antioxidants with superoxide generated by cytochrome P-450B model system. Biochem. Biophys. Res. Commun. 115: 1002.

-Takei, Y., and Mirra, S. (1973). Striatonigral degeneration: a form of multiple system atrophy with clinical parkinsonism. Prog. Neuropathol. 2: 217-251.

-Tappel, A.L. and Zalkin, H. (1960). Inhibition of lipid peroxidation in microsomes by vitamin E. Nature (London). 185: 35.

-Tappel, A.L. (1962). Vitamin E as the biological lipid antioxidant. Vitam. Horm. 20: 493-510.

-Tappel, A.L. (1965). Free-radical lipid peroxidation damage and its inhibition by vitamin E and selenium. Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 24: 73-78.

-Tappel, A.L. (1973). Lipid peroxidation damage to cell components. Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 32: 1870-1874.

-Tappel, A.L. (1982). Free Radicals in Biology. Vol. 4. Pryor, W.A., Ed. Academic Press, New York. 5.

- Tanner, C.M. (1989). The role of environmental toxins in the etiology of Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* 12: 49-53.
- Tas, S. and Wallford, R.L. (1982). Increased disulfide mediated condensation of the nuclear DNA-protein complex in lymphocytes during postnatal development and aging. *Mech. Ageing Dev.* 19: 73-84.
- Tetrud, J.W., Langston, J.W., Redmond, Jr. D.E., Roth, R.H., Sladek, J.R., Angel, R.W. (1986). MPTP-induced tremor in human and non-human primates. *Neurology*, 36 (Suppl 1): 308.
- Thomas, M.J., Mehl, K.S. and Pryor, W.A. (1982). The role of superoxide in xantine oxidase-induced autooxidation of linoleic acid. *J.Biol.Chem.* 257: 8343-8347
- Thomas, S.M., Jessup, W., Gebicki, J.M. and Dean, R.T. (1989). A continuous-flow automated assay for iodometric estimation of hydroperoxides. *Anal. Biochem.* 176: 353-359.
- Tieze, F. (1969). Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.* 27: 502-522.
- Togi, H. (1977). Arteriosclerotic parkinsonism: a reassessment. *Eleventh World Congress on Neurology, International Congress Series, Vol. 427, p.200. Excerpta Medica, Amsterdam and New York.*
- Tolppanen, L. (1971). quantitative-mikroskopische Untersuchungen an der Substantia nigra des Menschen. Fa en a -lle ohne Bewegungssto-en o-rungen in Vergleich mit Fa-en a-llen von Parkinson-Syndrom. [Dissertation]. University of Go-en o-ttingen. Go-en o-ttingen.
- Triggs, W. and Willmore, L. (1984). *In vivo* lipid peroxidation in rat brain following intracortical Fe²⁺ injection. *J.Neurochem.* 42: 976-979.
- Trush, M.A., Minnaugh, E.G., 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.
- Tsuda, H. (1961). Chromosomal aberrations induced by hydrogen peroxide in cultured mammalian cells. *Jpn. J. genet.* 56: 1-8.
- Turrens, J., Alexandre, A., Lehninger, A.L. (1985). Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by Complex III of heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 237: 408-414.
- Ungerstedt, U. (1971a). Adipsia and aphagia after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta Physiol. Scand.* 82 (Suppl. 367): 95-122.

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

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

-Van Kujik, F.J.G.M., Thomas, D.W., Stephens, R. J. and Dratz, E. A. (1986). Occurrence of 4-hydroxyalkenals in rat tissues determined as pentafluorobenzyl oxime derivatives by gas chromatography-mass spectrometry. *Biochem. Biophys. res. Commun.* 139: 144-149

-Vyas, I., Heikkilä, R.E. and Nicklas, W.J. (1986). Studies on the neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: inhibition of NAD-linked substrate oxidation by its metabolite, 1-methyl-4-phenylpyridinium. *J. Neurochem.* 46: 1501-1507.

-Wagner, G.C., Jarvis, M.F. and Carelli, R.M. (1985). Ascorbic acid reduces the dopamine depletion induced by MPTP. *Neuropharmacology.* 24: 1261-1262.

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

-Ward, C.D., Hess, W.A., Calne, D.B. (1983). Olfactory impairment in Parkinson's disease. *Neurology.* 33: 943-946.

-Wegner, G.C., Jarvis, M.F. and Carelli, R.M. (1985). Ascorbic acid reduces the dopamine depletion induced by MPTP. *Neuropharmacology.* 24: 1261-1262.

-Weiner, W.J., Nausieda, P.A. and Klawans, H.L. (1977). Effect of chlorpromazine on central nervous system concentrations of manganese, iron and copper. *Life Sci.* 20: 1181-1186.

-Weissman, J., Trevor, A., Chiba, K., Peterson, L.A., Caldera, P., Castagnoli Jr., N. and Baillie, T. (1985). Metabolism of the nigrostriatal toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine by liver homogenate fractions. *J. Med. Chem.* 28: 997-1001.

-Wendel, A. (1981). *Methods in Enzymology.* Vol. 77, Jakoby, W.B., Ed. Academic Press, New York. 325.

-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.

-Wiener, H.L., Hashim, A., Lajtha, A. and Sershen H. (1988). (-)-2-Oxo-4-thiazolidine carboxylic acid attenuates 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine induced neurotoxicity. *Res.*

-Willmore, L.J., Triggs, W.J. and Gray, J.D. (1986). The role of iron-induced hippocampal peroxidation in acute epileptogenesis. *Brain Res.* 382: 422-426.

-Wills, E. (1969). Mechanisms of lipid peroxide formation in tissues. Role of metals and haematin proteins in the catalysis of the oxidation of unsaturated fatty acids. *Biochem. Biophys. Acta* 98: 238-251.

-Wills, E.D. and Wilkinson, A.E. (1966). Release of enzymes from lysosomes by irradiation and the relation of lipid peroxide formation to enzyme release. *Biochem. J.* 99: 657-676.

-Willson, R.L. (1978a) in *Biochemical Mechanisms of Liver Injury* (Slater, T.F., ed.) pp. 123-224. Academic Press, London.

-Winterbourn, C.C. (1979). Comparison of superoxide with other reducing agents in the biological production of hydroxyl radicals. *Biochem. J.* 182: 625.

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

-Wright, J.R., Colby, H.d. and Milles, P.R. (1981). Cytosolic factors which affect microsomal lipid peroxidation in lung and liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 206: 296.

-Wu, E., Shinka, T., Caldera-Muñoz, P., Yoshizumi, H., Trevor, A. and Castagnoli Jr., N. (1988). Metabolic studies on the nigrostriatal toxin MPTP and its MAO B generated dihydropyridinium metabolite MPDP+. *Chem. Res. Toxicol.* 1: 186-194.

-Yang, S., Johannessen, J.N. and Markey, S.P. (1988). metabolism of ¹⁴C-MPTP in mouse and monkey implicates MPP+, and not bound metabolites, as the operative neurotoxin. *Chem. Res. Toxicol.* 1: 228-233.

-Yong, V., Pery, T. 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.

-Youdim M.B. (1985). Brain iron metabolism: biochemical and behavioural aspects in relation to dopaminergic neurotransmission. in *Handbook of neurochemistry*, Vol. 10 (Lajtha, A. ed). Plenum Press, New York, pp. 731-755.

-Youdim, M.B.H. (1988). *Brain Iron, Neurochemical and Behavioural Aspects*. London, New York and Philadelphia: Taylor and Francis.

-Zalkin, H. and Tappel, A.L. (1960). Studies of the mechanism of vitamin E action. IV. Lipide peroxidation in the vitamin E-

deficient rabbit. *Arch. Biochem. Biophys.* 88: 113-117.

-Zalkin, H., Tappel, A.L. and Jordan, J.P. (1960). Studies of the mechanism of vitamin E action.V. Selenite and tocopherol inhibition of lipid peroxidation in the chick. *Arch. Biochem. Biophys.* 91:117-122.