



1128146

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

Efectos de la vinpocetina sobre la distribución de DA y
DOPAC en terminales nerviosas de estriado

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS

P R E S E N T A :
FRANCISCO TREJO ISLAS

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARIA SITGES BERRONDO

COMITÉ TUTORAL : DRA. CLORINDA ARIAS ALVAREZ

DR. CAMILO RIOS CASTAÑEDA

CIUDAD UNIVERSITARIA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

NOVIEMBRE 2002.



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 esta 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.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS**

**Efectos de la vincocetina sobre la distribución de DA y
DOPAC en terminales nerviosas de estriado**

TESIS

**Que para obtener el grado de
Doctor en Ciencias Biomédicas**

PRESENTA

FRANCISCO TREJO ISLAS

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARIA SITGES BERRONDO

**COMITÉ TUTORAL: DRA. CLORINDA ARIAS ALVAREZ
DR. CAMILO RIOS CASTAÑEDA**

Ciudad Universitaria

Noviembre de 2002

*Agradezco a la **Dra. María Sitges Berrondo**, Investigadora titular del departamento de Biología celular y Fisiología, del IIBM-UNAM la oportunidad de realizar la tesis de doctorado en su laboratorio, por su paciencia hacia mi persona y su capaz dirección de la tesis con la que me graduo. También agradezco a la Dra. Sitges haberme facilitado varios de sus esquemas para la ilustración de la presente tesis.*

Este proyecto de tesis fue financiado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación y de Innovación Tecnológica - PAPIIT (proyecto IN201300).

Agradezco a **Luz Ma. Chiu Velazquez** y particularmente a **Araceli Guarneros Lopez**, técnicas académicas titulares A del laboratorio donde realicé mi trabajo de tesis, por su apoyo en el desarrollo experimental de mi trabajo.

Agradezco también a mis compañeros de laboratorio, estudiantes del doctorado **Emilio Galván** y **Carlos Galindo**, su compañerismo y gentileza conmigo.

Agradezco al **Dr V. Nekrassov** del Instituto de la Comunicación Humana por ser un buen compañero durante este periodo de la tesis.

Agradezco a la **Dra. Clorinda Arias Alvarez** y al **Dr. Camilo Ríos Castañeda**, que fungieron como cotutores durante mi doctorado por sus críticas y comentarios durante el desarrollo de la tesis.

Agradezco los doctores **Miguel Morales Mendoza**, **Miguel Pérez de la Mora**, **Ana Ma. López Colomé**, **Elvira Galarraga Palacio**, **María Teresa Morales Guzmán**, y **Oscar Próspero García**, revisores de la presente tesis de grado, por sus valiosas sugerencias para mejorar la versión final de la tesis.

INDICE

Indice de Figuras... 10

Abreviaturas.....12

RESUMEN.....13

I. INTRODUCCION....15

II. OBJETIVOS 21

III. MATERIAL Y METODOS

III.1. Fármacos y reactivos químicos empleados.... 22

III.2. Preparación de sinaptosomas de estriado..... 22

III.3. Experimentos de liberación de catecolaminas endógenas..... 23

III.4. Determinación de las concentraciones de DA y DOPAC..... 24

III.5. Experimentos de liberación de [³H]DA..... 25

III.6. Estadística..... 25

IV. RESULTADOS

IV.1. Efectos de la vinpocetina sobre la liberación de DA y DOPAC evocada por veratridina..... 26

IV.2. Efecto de la vinpocetina sobre la liberación de DA y DOPAC evocada por K⁺ alto..... 28

IV.3. Efecto de la vinpocetina sobre la distribución de DA y DOPAC dentro y fuera de las terminales aisladas del estriado..... 29

IV.4. Efectos simples y combinados de la vinpocetina y la clorgilina sobre la distribución de DA y DOPAC dentro y fuera de los sinaptosomas del estriado..... 31

IV.5. Efectos simples y combinados de la reserpina y la clorgilina sobre la distribución de DA y DOPAC dentro y fuera de los sinaptosomas de estriado..... 32

IV.6. Efecto de la vincocetina sobre la liberación basal de [³H]DA y la liberación de [³H]DA inducida por veratridina..... 34

V. DISCUSION..... 35

VI. PERSPECTIVAS.... 43

Apéndice 1

NEUROTRANSMISION

1.1. Exocitosis de neurotransmisores..... 46

1.1.a. Hipótesis del Ca²⁺ 46

1.1.b. Hipótesis SNARE de la fusión vesicular..... 47

1.1.c. Transportadores vesiculares de neurotransmisores..... 53

1.2. Liberación mediada por reversión de los transportadores de neurotransmisores..... 59

1.2.a. Mecanismos de inactivación de neurotransmisores.... 60

1.2.b. El DAT..... 60

1.2.c. Canales de Na⁺ dependientes de voltaje.... 68

1.3. Modelos experimentales para estudiar la liberación de los neurotransmisores..... 73

1.3.a. La preparación de terminales nerviosas cerebrales aisladas..... 75

- 1.3.b. Liberación del neurotransmisor radioactivo precargado a los sinaptosomas..... 76
- 1.3.c. Liberación de neurotransmisores endógenos de los sinaptosomas..... 77
- 1.3.d. Estrategias para despolarizar los sinaptosomas..... 78

Apéndice 2.

MONOAMINAS CEREBRALES

- 2.1. Síntesis de las monoaminas cerebrales..... 80
- 2.2. Degradación de las monoaminas cerebrales..... 81
- 2.3. Inhibidores de la MAO..... 83
- 2.4. Liberación de DOPAC..... 83
- 2.5. Transporte de DOPAC al medio externo..... 89

Apéndice 3.

BLOQUEADORES DE LOS CANALES DE SODIO COMO NEUROPROTECTORES

- 3.1. Isquemia cerebral y epilepsia como modelos de daño neuronal..... 93
- 3.2. La isquemia cerebral y los canales de Na^+ 96
- 3.3. Mecanismo de acoplamiento del metabolismo energético con el transporte iónico transmembranal..... 97
- 3.4. Carga intracelular de Na^+ y homeostasis del Ca^{2+} 98
- 3.5. Carga intracelular de Na^+ y liberación de glutamato..... 99
- 3.6. Vinpocetina..... 101
 - 3.6.a. La vinpocetina y la isquemia cerebral..... 102
 - 3.6.b. La vinpocetina y los canales de Na^+ , Ca^{2+} y K^+ 104
 - 3.6.c. La vinpocetina como un agente neuroprotector de las respuestas asociadas a la

- activación de los receptores de glutamato..... 107
- 3.6.d. La vinpocetina y la memoria..... 109
- 3.6.e. Los efectos de la vinpocetina sobre el flujo cerebral..... 110
- 3.6.f. La farmacocinética de la vinpocetina..... 111
- 3.6.g. La vinpocetina y la actividad de las neuronas del locus coeruleus..... 112
- 3.6.h. El enlace de la vinpocetina a las proteínas del plasma sanguíneo..... 113
- 3.6.i. La vinpocetina como atrapador de radicales libres..... 113
- 3.6.j. La vinpocetina como inhibidor de fosfodiesterasas..... 114
- 3.6.k. La acción de la vinpocetina sobre la acumulación de iones en el cerebro y vasos sanguíneos..... 115
- 3.6.l. La vinpocetina y el comportamiento..... 116
- 3.6.m. La vinpocetina administrada en la vejez..... 116
- 3.6.n. Efectos de la vinpocetina sobre el estatus mental en pruebas psicológicas..... 117
- 3.6.o. Los estudios de tomografía de emisión de positrones en pacientes tratados con vinpocetina..... 118
- 3.6.p. Las alteraciones de la vinpocetina sobre el metabolismo de la DA..... 119

Apéndice 4.

LA ISQUEMIA CEREBRAL Y LA DA

- 4.1. La isquemia cerebral y la captura de DA en sinaptosomas..... 123
- 4.2. Los factores de transcripción en la isquemia cerebral..... 124
- 4.3. Los compuestos neuroprotectores de la isquemia cerebral..... 125
- 4.4. El estrés de calor como inductor de la isquemia cerebral..... 126
- 4.5. La alteración de los receptores de neurotransmisores por la isquemia cerebral..... 126

- 4.6. La síntesis de DA y la isquemia cerebral..... 130
- 4.7. Los factores tróficos neuronales y la isquemia cerebral..... 131
- 4.8. La DA como causante de daño neuronal en la isquemia cerebral..... 132
- 4.9. La remoción de la DA y el daño en la isquemia cerebral..... 134
- 4.10. Los canales de Ca^{2+} en la isquemia cerebral..... 135
- 4.11. El glutamato y la isquemia cerebral..... 136
- 4.12. La liberación de DA en la isquemia cerebral..... 138
- 4.13. El Lactato como un inductor de la liberación de DA en la isquemia cerebral..... 141
- 4.14. El óxido nítrico en la isquemia cerebral y la liberación de DA..... 142
- 4.15. Los receptores α 2-adrenérgicos y la protección contra la isquemia cerebral..... 144
- 4.16. Los anestésicos como neuroprotectores de la isquemia cerebral..... 144
- 4.17. Los bloqueadores de canales de Na^+ en la neuroprotección en la isquemia cerebral..... 145
- 4.18. Isquemia cerebral y el metabolismo de la DA en los sinaptosomas de estriado.... 146
- 4.19. Los cambios en el metabolismo de la DA en la isquemia cerebral.... 146
- 4.20. La MAO y la isquemia cerebral..... 147

VII. REFERENCIAS..... 149

ARTICULO PUBLICADO ANEXO

INDICE DE FIGURAS

- Fig. 1. Estructura química de la vinpocetina..... 15**
- Fig. 2. Efecto de la Vinpocetina sobre la concentración interna de sodio y sobre la liberación de Glu y Asp inducida por activación de los CSSV..... 16**
- Fig. 3. La vinpocetina no inhibe ni el aumento en el Ca^{2+} ni la liberación de los aminoácidos neurotransmisores excitadores inducidos por alto K^+ 17**
- Fig. 4. Efectos de la isquemia cerebral sobre la liberación de DA y Glu, sobre la liberación de DOPAC y la concentración de ATP en el estriado..... 18**
- Fig. 5. Liberación Na dependiente de DA inducida por isquemia..... 19**
- Fig. 6. La activación de los canales de Ca^{2+} induce la exocitosis de los neurotransmisores y el aumento excesivo en la concentración interna de Na^+ induce la liberación de neurotransmisores por reversión de sus transportadores..... 20**
- Fig. 7. Efecto de la vinpocetina sobre la liberación de DA y DOPAC en reposo y en condiciones de despolarización con veratridina..... 27**
- Fig. 8. Efecto de la vinpocetina sobre la liberación de DA y DOPAC en sinaptosomas despolarizados con K^+ alto..... 28**
- Fig. 9. El efecto progresivo de concentraciones crecientes de vinpocetina sobre el metabolismo de DA..... 30**
- Fig. 10. Efectos simples y combinados de vinpocetina y veratridina sobre la liberación de $[^3H]DA$ 34**
- Fig. 11. Vinpocetina inhibe selectivamente la liberación de DA mediada por el DAT.....40**
- Fig. 12. Interpretación de los efectos simples y combinados de la vinpocetina, y la clorgilina sobre las distribuciones internas y**

externas de la DA y el DOPAC. 42

Fig. 13. Proteínas de las vesículas sinápticas y su reciclamiento. ... 51

Fig. 14. Transporte vesicular de monoaminas..... 57

Fig. 15. Mecanismo propuesto para el transporte de la DA al interior de la vesícula sináptica..... 58

Fig. 16. El DAT..... 66

**Fig. 17. Mecanismo propuesto para la recaptura de la DA liberada.
El DAT es una proteína membranal que trabaja en un ciclo repetido que depende de la concentración de Na^+ y Cl^- y DA en el medio externo..... 67**

Fig. 18. Esquema que muestra los sitios del canal de sodio..... 70

Fig. 19. Metabolismo de la DA..... 82

Abreviaturas

AMPA	Acido Alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazole-4-propiónico.
COMT	Catecol-orto-metil-transferasa.
CSSV	Canal de sodio sensible a voltaje.
DA	Dopamina.
DARP32	Fosfoproteina relacionada a la DA de 32 Kd
DAT	Transportador de DA.
DDC	Dopa-descarboxilasa.
DOPAC	Acido dihidroxifenilacético.
EEG	Electroencefalograma.
GABA	Acido- γ -amino-butírico.
GluR2	Receptor de glutamato tipo 2.
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión.
HVA	Acido homovanílico.
IMAO	Inhibidor de la MAO.
LTP	Potenciación a largo plazo.
MAO	Monoamino-oxidasa.
NA	Noradrenalina.
NMDA	N-metil-d-aspartato.
NO	Oxido nítrico.
PET	Tomografía de emisión de positrones.
SCAMP	Fosfoproteina membranal acarreadora asociada a la v.s.
STX	Saxitoxina.
TBZ	Tetrabenazina.
TH	Tirosina-hidroxilasa.
TTX	Tetrodotoxina.
VMAT	Transportador vesicular de monoaminas.
3-MT	3-metil-DA.
5-HIAA	Acido 5-hidroxiindol-acético.

RESUMEN

El efecto de la vinpocetina, una droga con potencial antiisquémico, sobre la liberación de dopamina (DA) y su principal metabolito el ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) se investigaron en las terminales aisladas del estriado de la rata bajo condiciones de reposo y de despolarización. La vinpocetina no modifica la liberación basal de DA ó la liberación exocitótica de DA evocada por alto K^+ , pero inhibe la liberación de DA evocada por reversión del transportador de DA (DAT) inducida por veratridina. Además de estos resultados que confirman el bloqueo selectivo de los canales presinápticos de sodio sensibles a voltaje (CSSV) previamente reportado (Neurochem. Res., 1999, 24:1585), la vinpocetina incrementa la liberación de DOPAC bajo condiciones de reposo ó de despolarización con veratridina ó alto K^+ . Este último efecto que no involucra a los CSSV, fué caracterizado. La determinación paralela de las concentraciones de catecolaminas liberadas y retenidas revela que la vinpocetina incrementa la liberación de DOPAC a expensas de la DA interna de manera dependiente de dosis en el rango μM bajo. En contraste con la vinpocetina el inhibidor selectivo de la MAO A, clorgilina, incrementa la concentración de DA y decrece la formación de DOPAC. La acción combinada de vinpocetina y clorgilina no indica, sin embargo, que la activación de la MAO sea el mecanismo responsable del incremento en el DOPAC causado por la vinpocetina. La reserpina aunque más potente y eficiente que la vinpocetina ejerce el mismo patrón de cambios sobre las concentraciones de DA y DOPAC. Se concluye que, además de inhibir la permeabilidad de los CSSV presinápticos, que selectivamente inhiben la liberación mediada por los transportadores de neurotransmisores, la vinpocetina incrementa al DOPAC impidiendo su almacenamiento en las vesículas sinápticas. Nuestros resultados indican que mucho del DOPAC formado es exportado al medio extracelular.

La presente tesis incluye una revisión de la literatura relacionada con el papel de los antagonistas de los canales de Na^+ como neuroprotectores poniendo énfasis en la vinpocetina como una droga con potencial anti-isquémico.

ABSTRACT

The effect of vinpocetine, a nootropic drug with anti-ischemic potential, on the release of DA and its main metabolite, DOPAC, was investigated in isolated nerve endings under resting and depolarizing conditions. Vinpocetine does not modify DA baseline release or the exocytotic DA release evoked by high K^+ , but inhibits the release of DA evoked by veratridine-induced DA transporter reversal. In addition to these results which confirm the vinpocetine selective blockade of voltage-sensitive presynaptic Na^+ channels (VSCC) previously reported (Neurochem. Res., 1999, 24:1585), vinpocetine increases DOPAC release either under resting, veratridine or high K^+ depolarizing conditions. The later effect which does not involve VSCC, was characterized. The parallel determination of the released and retained catecholamine concentrations revealed that vinpocetine increases DOPAC release at the expense of internal DA in a dose-dependent manner (low μM range). In contrast to vinpocetine the selective MAO-A inhibitor, clorgyline, increases DA and decreases DOPAC formation. The combined action of vinpocetine and clorgyline does not indicate, however, that the activation of MAO is the mechanism responsible for the increase in DOPAC caused by vinpocetine. Reserpine, although more potent and efficient than vinpocetine, exerts the same pattern of changes on DA and DOPAC concentrations. It is concluded that in addition to the inhibition of presynaptic VSCC permeability, which selectively inhibits the transporter-mediated release of all neurotransmitters, vinpocetine increases DOPAC by impairing the vesicular storage of DA. Our results indicate that the cytoplasmic extravesicular DA is metabolized by MAO to DOPAC. Most of the DOPAC formed is exported to the extracellular medium.

In addition this thesis includes a review of the literature related with the role of Na^+ channels antagonists as neuroprotectors with emphasis in vinpocetine as a drug with anti-ischemic potential.

I. INTRODUCCION

La vinpocetina [(3 α ,16 α)-eburnamenina-14-carboxilico ácido-etil ester] es un alcaloide derivado de la planta *Vinca minor* Linne, es el etil-ester sintético de la apovincamina. Su fórmula semidesarrollada se ilustra a continuación (Fig. 1).

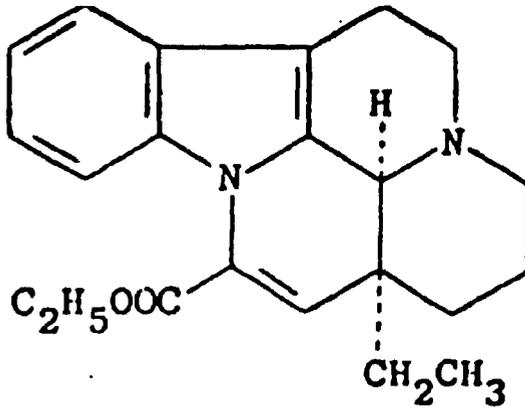


Fig. 1. Estructura química de la vinpocetina

Hay evidencia en pacientes y animales experimentales que sugieren que la droga nootrópica vinpocetina tiene un potencial protector contra el daño neuronal inducido por isquemia (Hadjiev y Yancheva, 1976; King, 1987; Balestreri y col. 1987; Sauer y col. 1988; Rischke y Krieglstein, 1990; Araki y col. 1991b). La modulación hacia abajo de los canales de Na⁺ sensibles a voltaje (CSSV) y la

consecuente supresión de las I_{Na^+} que se producen en condiciones patológicas como la anoxia se ha propuesto como una estrategia efectiva contra el daño neuronal inducido por la isquemia cerebral (Urenjak y Obrenovitch, 1996). En acuerdo con esta hipótesis la vinpocetina inhibe la elevación de Na^+ intracelular inducida por la activación de los CSSV y la liberación de glutamato y aspartato mediada por la reversión de los transportadores de glutamato y aspartato (Sitges y Nekrassov, 1999). En la siguiente Fig. (2) adaptada del trabajo de Sitges y Nekrassov (1999) se muestran los efectos de la vinpocetina a la concentración de $15 \mu M$ sobre el aumento en el Na^+ interno inducido por veratridina $20 \mu M$, así como sus efectos sobre la liberación de los neurotransmisores excitadores inducida por veratridina.

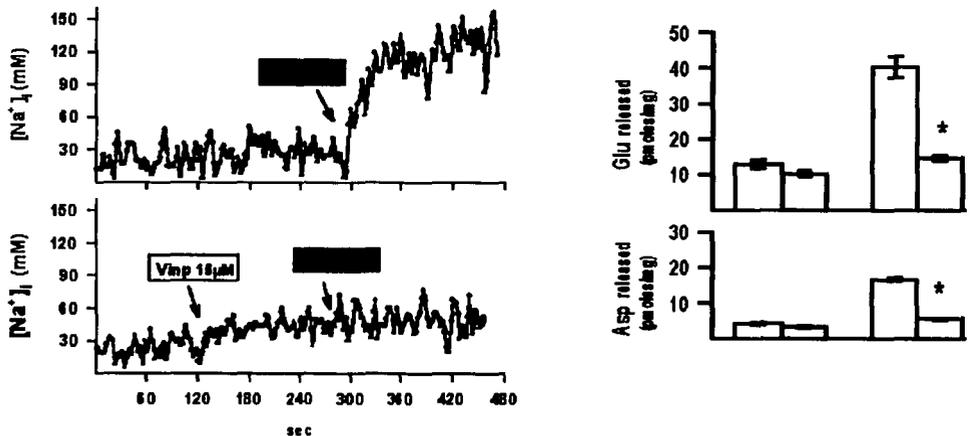


Fig. 2. Efecto de la Vinpocetina sobre la concentración interna de sodio y sobre la liberación de Glu y Asp inducida por activación de los CSSV.

Esta inhibición en la permeabilidad al Na^+ mediada por los CSSV que causa la vinpocetina, no es extensiva a los canales de calcio presinápticos, pues la

vinpocetina no inhibe el aumento en el Ca^{2+} interno ni la liberación de Glu y Asp inducida por K^+ alto, como se ilustra en la siguiente Fig. (3), que ha sido adaptada del trabajo de Sitges y Nekrassov (1999).

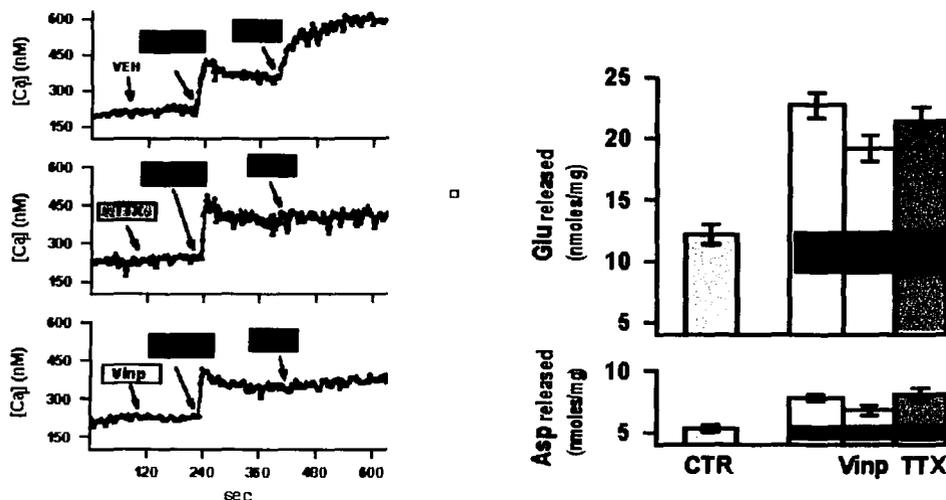


Fig. 3. La vinpocetina no inhibe ni el aumento en el Ca^{2+} ni la liberación de los aminoácidos neurotransmisores excitadores inducidos por alto K^+ .

Se ha reportado una relación entre la liberación de glutamato y aspartato, la sobreestimulación de los receptores NMDA y el daño neuronal inducido por isquemia (Martin y col. 1994; Szatkowski y Attwell, 1994). Sin embargo, en varios modelos de isquemia experimental ocurre una liberación masiva del neurotransmisor DA acompañada por un decremento de DOPAC y HVA (Kawano y col. 1988; Yao y col. 1988; Slivka y col. 1988; Hillered y col. 1989; Toner y Stamford, 1999). Estas relaciones entre los niveles de distintos neurotransmisores y la isquemia se esquematiza a continuación (Fig. 4).

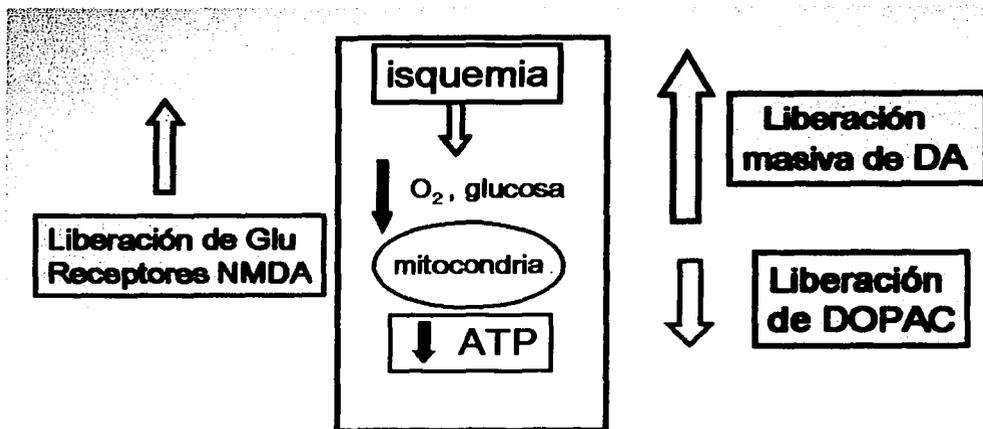


Fig. 4. Efectos de la isquemia cerebral sobre la liberación de DA y Glu, sobre la liberación de DOPAC y la concentración de ATP en el estriado.

Es de esperarse que la reducción en los niveles de ATP causada por isquemia (Santos y col. 1996) se acompañe de un aumento en el Na⁺ intracelular, pues la falta de ATP inactivaría a la ATP-asa de Na⁺/K⁺, que en las terminales nerviosas estriatales aisladas en reposo está muy activa. Esta actividad se manifiesta en una disminución de la concentración interna de K⁺ y un aumento en la concentración interna de Na⁺ cuando se para dicha ATPasa con el inhibidor de la misma, ouabaina (datos no publicados del laboratorio). Consistentemente, la inhibición directa de la ATP-asa de Na⁺/K⁺ por ouabaina ha demostrado aumentar la liberación de neurotransmisores (Meyer y Cooper, 1981; Fairbrother y col. 1990). Ya que el decremento ó reversión del gradiente electroquímico de Na⁺ también dispara la liberación de DA mediada por el DAT (Raiteri y col. 1978; Sitges y col. 1994), así como de otros transportadores de neurotransmisores (NT-

t) es razonable postular que la DA liberada por este medio después de la isquemia cerebral pudiera contribuir al daño isquémico. Este razonamiento se ilustra esquemáticamente en la Fig. 5.

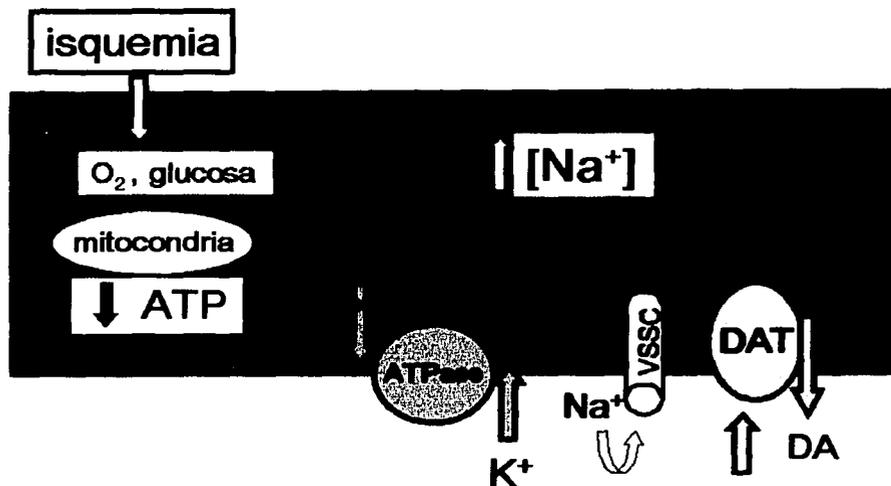


Fig. 5. Liberación Na⁺ dependiente de DA inducida por isquemia. La reducción de ATP causada por la isquemia se espera que aumente al Na⁺ interno por inactivación de la ATPasa de Na⁺/K⁺. Como un decremento o reversión del gradiente electroquímico de Na⁺ propicia la liberación de DA a través del transportador, es muy probable que la isquemia aumente la liberación de DA por este mecanismo.

Es ampliamente documentado que la liberación de un neurotransmisor está compuesta de una fracción Ca²⁺-dependiente liberada por exocitosis y una fracción Na⁺ dependiente liberada del citosol por reversión de los transportadores de neurotransmisores. La liberación de la fracción excitotóxica puede ser inducida selectivamente por el K⁺ alto y la liberación mediada por reversión de los transportadores de neurotransmisor puede ser inducida por veratridina ó ouabaina (Nicholls, 1989; Sitges, 1989; Adam-Vizi, 1992; Sitges y col. 1993; Sitges y Chiu, 1995a; Sitges y Chiu, 1995b), como se esquematiza en la Fig. 6.

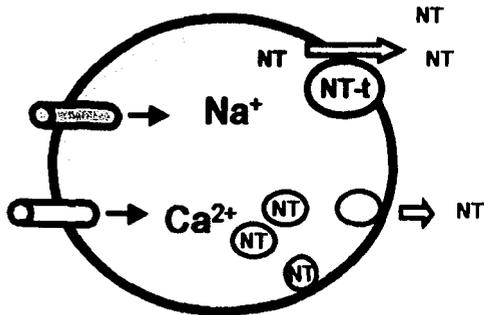


Fig. 6. La activación de los canales de Ca^{2+} induce la exocitosis de los neurotransmisores y el aumento excesivo en la concentración interna de Na^+ induce la liberación de neurotransmisores por reversión de sus transportadores.

Por tanto es de interés investigar los efectos de la vinpocetina sobre la liberación basal y estimulada (con K^+ alto y con veratridina) de DA y sus efectos sobre el DOPAC en las terminales nerviosas de estriado.

A continuación enumeramos de manera puntual los objetivos de la presente tesis.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

II. OBJETIVOS

Los objetivos de la presente investigación fueron:

1). Explorar los efectos de la vinpocetina sobre la liberación basal de DA y la liberación mediada por reversión del DAT, la cual es dependiente de entrada de Na^+ y es inducida experimentalmente por la aplicación de la VRTD un activador de canales de Na^+ .

2). Investigar los efectos de la vinpocetina sobre la liberación de DA exocitótica (dependiente de la entrada de Ca^{2+} a la terminal sináptica) inducida por la aplicación de concentraciones elevadas de un agente despolarizante como KCl 30 mM (K^+ alto).

3). Como nuestro método experimental nos permite determinar simultáneamente las concentraciones internas y externas de DA y DOPAC que se presentan en los sinaptosomas, exploramos el efecto de la vinpocetina sobre las concentraciones de DA y DOPAC liberado y retenido en los sinaptosomas de estriado así como de las concentraciones totales de dichas catecolaminas.

4). El objetivo final de la presente investigación es proponer a partir de los datos experimentales hallados, un posible mecanismo por el cual la aplicación de vinpocetina a los sinaptosomas eleva la concentración de DOPAC en las terminales sinápticas aisladas del estriado.

III. MATERIAL Y METODOS

III.1. Fármacos y reactivos químicos empleados

Vinpocetina, ((3 α ,16 α)-eburnamenina-14-carboxílico ácido-etil ester), Clorgilina (N-metil-N-propargil-3-(2,4,diclorofenoxi)-propilamina-hidrocloruro), veratridina, VRTD; ácido 1-octanosulfónico y pargilina (N-metil-N-2-propinil-benzilamina-hidrocloruro) fueron de SIGMA (San Luis Missouri, USA). Reserpina, TTX, y deprenil (R(-)-N- α -dimetil-N-2-propinil-bencen-hidrocloruro), fueron comprados a Research Biochemicals International. La DA radioactiva, 3,4-cadena-2,5,6[³H]-Dopamina-HCl (con actividad específica de 40 Ci/ mmol) se obtuvo de New England Nuclear (Boston, Massachussets, USA). Todos los otros reactivos fueron de grado analítico.

III.2. Preparación de sinaptosomas de estriado

Los estriados disecados de 4 ratas Wistar machos (250-300 g) fueron puestos inmediatamente en sacarosa isotónica fría 0.32 M (1:10 peso/vol). y homogenizados (6 golpes a 2000 rpm, 0.15 mm de espacio pistilo-vaso). Las suspensiones resultantes fueron centrifugadas a 1500 x g por 10 min, y los sobrenadantes obtenidos de esta centrifugación fueron centrifugados por otros 20 min a 9000 x g, para obtener la fracción sinaptosomal cruda, P2. La pastilla resultante conteniendo sinaptosomas striatales fueron resuspendidas en buffer HEPES (KRH) oxigenado. La composición del KRH es en mM: 127NaCl, 1.18

KH₂PO₄, 3.73 KCl, 1 CaCl₂, 1.18 MgSO₄, 20 HEPES y 5.6 mM dextrosa, pH 7.4, burbujeado con una mezcla de O₂/CO₂.

III.3. Experimentos de liberación de catecolaminas endógenas

Los sinaptosomas de estriado de rata (391 ± 21 μ g de proteína) que se resuspendieron en 500 μ l de KRH fueron preincubados a 37 °C por 5 min y entonces incubados a 37 °C por 10 min bajo las condiciones experimentales a ser investigadas. La incubación fue detenida por centrifugación. Los sobrenadantes resultantes de esta centrifugación (conteniendo la DA y el DOPAC liberados) fueron transferidos a viales limpios, tratados con una alícuota de una mezcla de ácido perclórico (PCA)/EDTA para obtener 0.1M y 0.1mM respectivamente y almacenados a -40°C para análisis posterior. Las pastillas resultantes fueron resuspendidas en 500 μ l de una solución de 0.1M PCA/0.1mM EDTA pH 1.4 y vigorosamente mezclados en vortex. Estas condiciones drásticas garantizan una descarga completa de las catecolaminas que estuvieran dentro de los sinaptosomas. Con objeto de estandarizar las concentraciones de catecolaminas por mg de proteína sinaptosomal, la suspensión mezclada en vortex conteniendo los sinaptosomas rotos fue centrifugada. Los sobrenadantes resultantes de esta centrifugación (conteniendo las catecolaminas que estuvieron dentro de cada muestra de sinaptosomas) fueron guardados a -40 °C para análisis posterior y las pastillas fueron usadas para la determinación de proteína por el método de Lowry después de resuspensión en solución de 1 ml of NaOH 5 mM. Las muestras conteniendo catecolaminas fueron inyectadas en el sistema HPLC dentro de la

semana siguiente después del experimento. Los resultados se expresaron como la concentración en pmol/mg de proteína sinaptosomal de catecolamina (DA ó DOPAC) liberado ó retenido dentro de los sinaptosomas. La liberación de DA endógena se refiere al balance entre la DA liberada y la DA recapturada de nuevo en 10 min, la DA total (ó el DOPAC total) se refiere a la suma de la DA (ó DOPAC) liberado más la DA (ó DOPAC) retenido por una alícuota de sinaptosomas expuestos a una condición experimental específica.

III.4. Determinación de las concentraciones de DA y DOPAC

Veinte μ l de las muestras conteniendo catecolaminas en PCA/EDTA fueron inyectadas directamente en el sistema HPLC de Waters para análisis. El sistema HPLC consiste de una bomba de suministro (modelo 600), un inyector Rheodyne, una columna analítica (resolve, C18, 150 x 3.9 mm de diámetro interno, tamaño de partícula de 5 μ m, controlado a 30 °C) y un detector electroquímico (modelo DECADE), con carbón vidriado usado a un voltaje de +0.8V contra un electrodo de Ag/AgCl de referencia (rango 1 nA). Una fase móvil compuesta de 50 mM de ácido orto-fosfórico / 50mM de buffer ácido cítrico, pH 3.1 ajustado con KOH, conteniendo metanol 5% (v/v), ácido octanosulfónico 100 mg/l y 20 mg/l EDTA, a una tasa de flujo de 1 ml/min, fue aplicada para la elución de las catecolaminas. Las concentraciones de DA y DOPAC en las muestras experimentales fueron calculadas con curvas de calibración obtenidas de la inyección de concentraciones crecientes de mezclas de monoaminas standard en el sistema de HPLC .

III.5. Experimentos de liberación de [³H]DA

Los experimentos de liberación de [³H]DA se efectuaron de acuerdo al método descrito por Sitges y colaboradores, (1990). Brevemente, 5 mg de sinaptosomas estriatales suspendidos en buffer KRH (1mg/ml) se incuban con [³H]-DA (4 μ Ci, 0.1 pmol) a 37 °C por 25 min. Aliquotas (600 μ l) de los sinaptosomas precargados con [³H]DA se transfieren a filtros milipore que quedan sobre cámaras multiperforadas. La radioactividad no incorporada en la preparación se remueve por perfusión con buffer KRH. Después de ajustar la tasa de flujo a 0.5ml /min las fracciones fueron colectadas a intervalos de 1 min. Después de 6 min el buffer KRH (control) ó el buffer KRH conteniendo 15 μ M vinpocetina es rapidamente substituido por el respectivo medio de perfusión también conteniendo 20 μ M VRTD y fracciones adicionales de perfusado (min 7-12) se colectan. La radioactividad liberada en cada fracción colectada y la remanente en los filtros al final de la perfusión se cuenta. Los resultados se expresan como el porcentaje de radioactividad liberada por minuto de radioactividad total. La radioactividad total iguala la radioactividad liberada durante los 12 min de perfusión más el remanente en el filtro al final del experimento.

III.6. Estadística

La prueba t de Student fue usada para evaluaciones estadísticas. Las diferencias entre datos de $p < 0.05$ fueron consideradas estadísticamente significativas.

IV. RESULTADOS

IV.1. Efectos de la vinpocetina sobre la liberación de DA endógena y DOPAC endógeno evocada por veratridina

La vinpocetina no modifica la liberación basal de DA endógena pero abole la liberación de DA evocada por veratridina, es decir la liberación mediada por la reversión del DAT. La despolarización con veratridina incrementa la liberación de DA de 10 ± 1 pmol/mg (control) a 122 ± 10 pmol/mg (veratridina). En presencia de vinpocetina esta liberación de DA evocada por veratridina cae a 18 ± 1 pmol /mg (Fig. 7a). En la presencia de TTX un bloqueador selectivo del canal de Na^+ a una concentración $1 \mu\text{M}$, la liberación de DA evocada por veratridina cae a 14 ± 2 pmol/mg (datos no mostrados en la Fig. 7a). Además de la liberación de DA, el principal metabolito de la DA, el DOPAC, es liberado a altas concentraciones mientras que los metabolitos de la DA, el HVA y 3-MT fueron indetectables. En sinaptosomas control y tratados con veratridina la liberación de DOPAC es comparable, pero en los sinaptosomas control ó tratados con veratridina también tratados con vinpocetina se incrementa significativamente (Fig. 7b). La liberación de DOPAC inducida por vinpocetina y la inhibición de la liberación inducida por veratridina son evidentes en los cromatogramas, lo que es ilustrado en las Fig. 7c y 7d, que muestran que en los sinaptosomas expuestos a veratridina (Fig. 7c) el pico de DA es mayor que en sinaptosomas expuestos a veratridina más vinpocetina (Fig. 7d) y que el pico de DOPAC se eleva cuando la vinpocetina está presente (Fig. 7d).

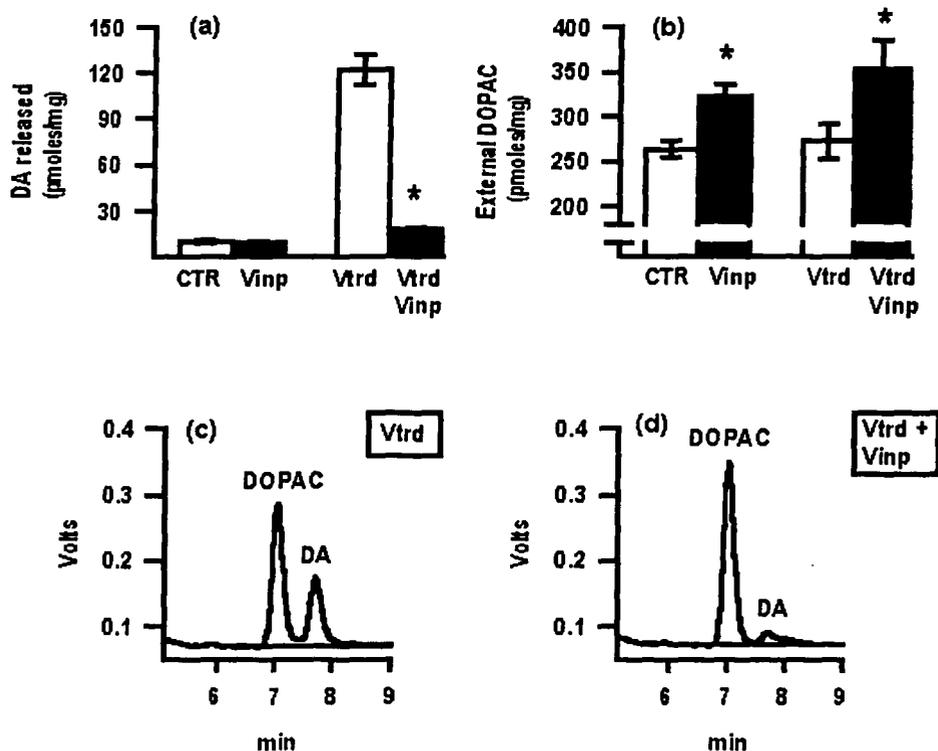


Fig. 7. Efecto de la vinpocetina sobre la liberación de DA y DOPAC en reposo y en condiciones de despolarización con veratridina. Los sinaptosomas de estriado fueron incubados (37°C) por 10 min en buffer Krebs-H, Krebs con vinpocetina 15 μ M (Vinp), Krebs con veratridina 20 μ M (Vtrd), ó Krebs con Vtrd 20 μ M y Vinp 15 μ M (Vtrd, Vinp). La incubación fue detenida por centrifugación. Los sobrenadantes conteniendo la DA y el DOPAC liberado fueron preparados para análisis de HPLC y las pastillas fueron empleadas para la determinación de proteína. (a) DA liberada, * $p < 0.00001$ entre Vtrd y Vtrd + Vinp. (b) DOPAC liberado, * $p < 0.01$ entre el control (CTR) y Vinp y * $p < 0.02$ entre Vtrd y Vtrd + Vinp. Los resultados son la media \pm ESM. Valores de 22, 6, 10 y 5 experimentos independientes para CTR, Vinp, Vtrd, Vtrd + Vinp respectivamente (c) cromatograma obtenido de la inyección de 20 μ l del sobrenadante de una muestra experimental representativa tratada con Vtrd y (d) cromatograma obtenido del sobrenadante de una muestra experimental representativa tratada con Vtrd + Vinp.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IV.2. Efecto de la vinpocetina sobre la liberación de DA endógena y DOPAC endógeno evocada por K^+ alto

El K^+ alto (30 mM) eleva la liberación de DA dos veces sobre su valor de reposo (de 10 a 35 ± 3 pmol/mg) este incremento de la liberación de DA por K^+ alto no es cambiado por vinpocetina ó TTX (Fig 8a). La liberación de DOPAC en sinaptosomas despolarizados con K^+ alto sólo ó en combinación con TTX no cambian pero en sinaptosomas despolarizados con K^+ alto más vinpocetina un incremento de la liberación de DOPAC se observa de nuevo (Fig. 8b).

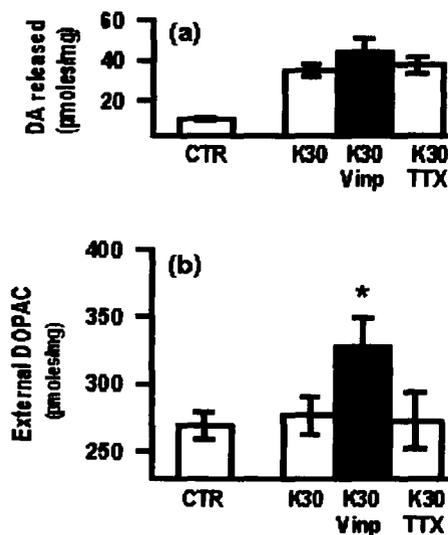


Fig. 8. Efecto de la vinpocetina sobre la liberación de DA y DOPAC en sinaptosomas despolarizados con K^+ alto. Los sinaptosomas estriatales fueron incubados por 10 min en : buffer Krebs-H. (CTR), buffer de K^+ alto 30mM (K30), buffer de alto K^+ con vinpocetina $15 \mu\text{M}$ (K30, Vinp) ó buffer de alto K^+ con TTX $1 \mu\text{M}$ (K30, TTX) (a) DA liberada, (b) DOPAC liberado, * $p < 0.03$ entre K30 y K30 + Vinp. Los resultados son expresados como la media \pm ESM de los valores de 22, 9, 7, y 5 experimentos independientes para el CTR, K30, K30 + Vinp, K30 + TTX respectivamente.

IV.3. Efecto de la vinpocetina sobre la distribución de DA Y DOPAC dentro y fuera de las terminales aisladas del estriado

El efecto de la vinpocetina sobre las concentraciones de DA y DOPAC dentro de los sinaptosomas se midieron en paralelo con las catecolaminas liberadas. La vinpocetina a concentraciones crecientes (1.5, 5, 15, 50 μM) decreció progresivamente la DA interna e incremento la liberación de DOPAC pero no cambió la liberación basal de DA ó la concentración de DOPAC interno significativamente (Fig. 9a, 9b). La comparación de la DA total y el DOPAC total en los sinaptosomas expuestos a la vinpocetina en dosis crecientes muestra una relación dosis-respuesta entre la pérdida de DA y la formación de DOPAC (Fig. 9c). Los valores de DA total más DOPAC total no son cambiados significativamente por vinpocetina en ninguna concentración probada. (Fig. 9d).

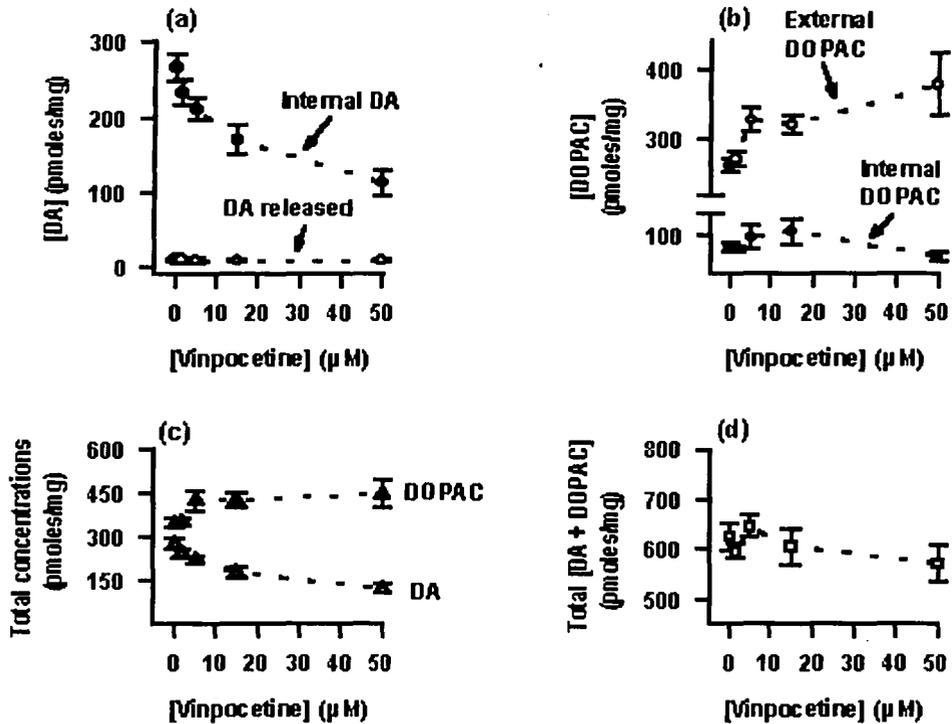


Fig. 9. El efecto progresivo de concentraciones crecientes de vinpocetina sobre el metabolismo de DA. Los resultados son la media \pm ESM de los valores de 22, 3, 3, 6, y 7 experimentos independientes para 0 (control), 1.5, 5, 15, 50 μM de vinpocetina respectivamente. * $P < 0.05$. (a) concentración de DA interna (\bullet) y externa (\circ) en las terminales nerviosas aisladas del estriado. (b) concentración de DOPAC dentro (\bullet) y fuera (\circ) de las terminales nerviosas aisladas del estriado. (c) DOPAC interno más externo (Δ) y DA interna más liberada (Δ). (d) suma de catecolaminas interna y externa (cuadrados).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IV.4. Efectos simples y combinados de la vinpocetina y la clorgilina sobre la distribución de DA y DOPAC dentro y fuera de los sinaptosomas del estriado

La MAO A es la enzima responsable de la generación de DOPAC (Shih y col. 1999). El inhibidor selectivo de la MAO A, clorgilina fue probada a una baja concentración (0.1 μ M) en su capacidad para inhibir el metabolismo de la DA en sinaptosomas de estriado. La clorgilina incrementa la DA, particularmente dentro de los sinaptosomas (100 pmol DA/mg en 10 min) y causa un modesto pero significativo incremento de la liberación basal de DA. Este incremento en la DA es acompañado por un decremento del DOPAC liberado y el DOPAC dentro de los sinaptosomas (Tabla 1, fila 2). Estos efectos resultan en un pronunciado incremento de la DA total y un pronunciado decremento en el DOPAC total (Tabla 2, fila 2). En contraste a la clorgilina, la vinpocetina decrece la DA interna, y en sinaptosomas tratados con vinpocetina más clorgilina sus efectos son cancelados (Tabla 1, columna 1). La vinpocetina incrementa la liberación de DOPAC pero es incapaz de revertir el decremento en la liberación de DOPAC inducida por clorgilina (Tabla 1, columna 2, primeros 4 valores). La vinpocetina tampoco cambia el decremento en DOPAC interno causado por clorgilina (Tabla 1, columna 3, primeros 4 valores).

La vinpocetina no cambia la liberación basal de DA y la clorgilina sólo incrementa la liberación basal de DA moderadamente, sin embargo, en sinaptosomas tratados con ambas drogas simultáneamente la liberación de DA inducida por clorgilina es facilitada (Tabla 1, columna 4, primeros 4 valores).

IV.5. Efectos simples y combinados de la reserpina y la clorgilina sobre la distribución de DA y DOPAC dentro y fuera de los sinaptosomas de estriado

Puesto que es ampliamente documentado que la reserpina induce un incremento en la formación de DOPAC, el efecto de la reserpina sólo ó en combinación con clorgilina, fue probado. La reserpina 1 μ M marcadamente decrece la DA interna, más aún decrece la liberación basal de DA e incrementa la liberación de DOPAC sin cambiar el DOPAC interno significativamente (Tabla 1, fila 5). Como en el caso de la vinpocetina estos efectos resultan en un pronunciado decremento en la DA total y un pronunciado incremento en el DOPAC total (Tabla 2, fila 5). La reserpina no cambia la concentración de DA total más DOPAC total.

El decremento de la DA interna inducido por reserpina y el incremento en la DA interna inducido por clorgilina se cancelan uno al otro en sinaptosomas tratados con ambas drogas (Tabla 1, columna 1). También de manera similar a la vinpocetina, la reserpina incrementa la liberación de DOPAC, no cambia el DOPAC interno de manera significativa y es incapaz de revertir el decremento en ambos la liberación de DOPAC y DOPAC interno inducido por clorgilina (Tabla 1, columnas 2 y 3).

Interesantemente, la moderada facilitación causada por la vinpocetina sobre la liberación de DA inducida por clorgilina, resulta en una dramática potenciación en el caso de la reserpina. Los 17 ± 2 pmol/mg de DA liberada en los sinaptosomas tratados con clorgilina se incrementan a 112 ± 3 pmol/mg cuando 1

μM de reserpina está presente y sólo a 35 ± 8 pmol/mg cuando vinpocetina esta también presente (Tabla 1, columna 4).

Tabla 1. Efectos simples y combinados de clorgilina y vinpocetina (ó reserpina) sobre las concentraciones de DA y DOPAC liberado y retenido en los sinaptosomas de estriado.

n	Condiciones Experimentales	DA interna	DOPAC Liberado	DOPAC Interno	DA liberada
21	Control	267 ± 18	264 ± 9	83 ± 6	10 ± 1
5	Clorg	$367 \pm 30^*$	$200 \pm 14^*$	$15 \pm 3^*$	$17 \pm 2^*$
7	Vinp	$113 \pm 17^*$	$379 \pm 43^*$	70 ± 6	9 ± 2
4	Vinp + clorg	272 ± 25	$220 \pm 14^*$	$12 \pm 5^*$	$35 \pm 8^*$
4	Reserp	$51 \pm 3^*$	$375 \pm 11^*$	94 ± 5	$3 \pm 1^*$
4	Reserp + clorg	268 ± 3	$208 \pm 9^*$	$3 \pm 1^*$	$112 \pm 3^*$

Las concentraciones de DA y DOPAC están en pmol/mg. Clorg, clorgilina $0.1 \mu\text{M}$, Vinp, vinpocetina $15 \mu\text{M}$, reserp, reserpina $1 \mu\text{M}$. Los resultados son la media \pm ESM del número indicado (n) de experimentos independientes.

* $p < 0.05$, entre sinaptosomas control y tratados con drogas.

Tabla 2. Acciones simples y combinadas de clorgilina y vinpocetina (ó reserpina) sobre las concentraciones de totales de DA y DOPAC.

n	Condiciones experimentales	DA total	DOPAC total
21	control	277 ± 18	349 ± 13
5	clorg	$384 \pm 30^*$	$215 \pm 17^*$
7	vinp	$122 \pm 16^*$	$449 \pm 45^*$
4	vinp + clorg	308 ± 27	$232 \pm 16^*$
4	reserp	$53 \pm 2^*$	$469 \pm 13^*$
4	reserp + clorg	$380 \pm 5^*$	$211 \pm 9^*$

Las concentraciones de DA y DOPAC estan en pmol/mg. Clorg, clorgilina $0.1 \mu\text{M}$, Vinp, vinpocetina $15 \mu\text{M}$, reserp, reserpina $1 \mu\text{M}$. Los resultados son la media \pm ESM del número indicado (n) de experimentos independientes.

* $p < 0.05$, entre sinaptosomas control y tratados con drogas.

IV.6. Efecto de la vincopocetina sobre la liberación basal de [³H]DA y la liberación de [³H]DA inducida por veratridina

Los efectos simples y combinados de la vincopocetina (15 μ M) y veratridina (20 μ M) fueron probados sobre la liberación de [³H]DA en sinaptosomas de estriado perfundidos con buffer conteniendo 100 μ M de pargilina, aunque la vincopocetina eleva la liberación basal de [³H]DA, disminuye la subsecuente liberación de [³H]DA evocada por veratridina 20 μ M (Fig. 10).

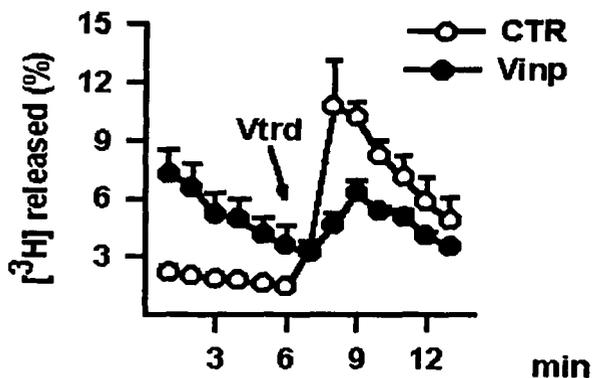


Fig. 10. Efectos simples y combinados de vincopocetina y veratridina sobre la liberación de [³H]DA. Los sinaptosomas de estriado precargados con [³H]DA fueron perfundidos con buffer Krebs en ausencia (°) ó en presencia de vincopocetina 15 μ M (Vinp) (•) las fracciones de perfusado fueron colectadas a intervalos de 1 min. Donde se indica (flecha) el respectivo medio de perfusión también contiene veratridina 20 μ M (Vtrd) Después de este tratamiento, se colectaron fracciones adicionales de perfusados. Todos estos medios de perfusión contienen pargilina 100 μ M. Los resultados son la media \pm ESM de los valores de 4 experimentos independientes.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

V. DISCUSION

En el presente estudio, el efecto de la vinpocetina sobre la liberación de DA y su metabolito el DOPAC fue investigado en terminales nerviosas aisladas de estriado en reposo y en condiciones de despolarización. Aquí hemos demostrado que la vinpocetina inhibe marcadamente la liberación de DA endógena mediada por el DAT (Fig. 7a) y de la [³H]DA premarcada (Fig. 10, min 7-12) disparada por el incremento en la permeabilidad de los canales de Na⁺ inducida por la veratridina, mientras que la vinpocetina no influencia la liberación exocitótica de DA evocada por despolarización con K⁺ alto, que no involucra CSSV (Fig. 8a). Estos resultados son consistentes con descubrimientos previos (Sitges y Nekrassov, 1999) de que la vinpocetina inhibe el aumento en la concentración interna de Na⁺ inducido por veratridina (Fig. 2) pero no influencia el aumento en la concentración interna de Ca²⁺ inducido por K⁺ alto (Fig. 3) en sinaptosomas de estriado, y confirman la conclusión de que la vinpocetina bloquea los CSSV presinápticos pero no bloquea los canales presinápticos de Ca²⁺.

La presente investigación muestra además que la vinpocetina, a las mismas concentraciones capaces de bloquear a los CSSV de las terminales nerviosas de estriado, incrementa la formación de DOPAC (Fig. 9c). Sin embargo el bloqueo de los CSSV es improbable que esté asociado con el mecanismo responsable para la formación de DOPAC inducido por vinpocetina, ya que ésta incrementa la liberación de DOPAC independientemente del estado de los CSSV. En otras palabras, el aumento en la concentración de DOPAC se observa tanto en

sinaptosomas en estado de reposo como en sinaptosomas despolarizados con veratridina (Fig. 7b), así como en sinaptosomas despolarizados con K^+ alto ó (Fig. 8b). Otro resultado que confirma la conclusión de que los efectos de la vinpocetina sobre el DOPAC no se relacionan con sus efectos sobre los CSSV es que aunque la vinpocetina y el bloqueador de CSSV, TTX, ambos inhiben la liberación de DA inducida por veratridina y no modifican la liberación de DA inducida por K^+ alto, sólo la vinpocetina es capaz de incrementar la liberación de DOPAC (Fig. 8). Como una primera aproximación para entender el origen del DOPAC liberado por vinpocetina, las concentraciones de catecolaminas internas se midieron. De los experimentos fue claro que la vinpocetina incrementa la liberación de DOPAC decreciendo la DA interna de manera dependiente de la dosis (Fig. 9). En contraste el IMAO clorgilina incrementa la DA total y decrece el DOPAC total (Tabla 2). Sin embargo es improbable que la vinpocetina incremente la actividad de la MAO A ya que la vinpocetina no cambia la inhibición de la formación de DOPAC causada por clorgilina (Tabla 2). Debido a que la DA extravesicular es el substrato de la MAO, los compuestos capaces de elevar la DA en el compartimento extravesicular se espera que incrementen la formación de DOPAC. En acuerdo con esto, la liberación de DA de sus sitios de almacenaje al citosol inducida por reserpina (Peter y col. 1994) incrementa la formación de DOPAC muy eficientemente (Tabla 2). Como en el caso de la reserpina, la vinpocetina incrementa la liberación de DOPAC (Tabla 1, columna 2), decrece la concentración interna de DA (Tabla 1, columna 1) y pierde esta capacidad cuando la MAO A es inhibida por clorgilina. Estos datos sugieren que la vinpocetina incrementa al DOPAC mediante un mecanismo semejante a la reserpina. En otras

palabras, la similitud de cambios inducidos por vinpocetina y reserpina junto con la similitud estructural entre las 2 drogas sugiere fuertemente que la vinpocetina y la reserpina aumentan la concentración de DOPAC incrementando la disponibilidad de la DA citoplasmática extravesicular, que es precisamente el sustrato metabolizado por la MAO a DOPAC, ya que la DA almacenada en las vesículas está protegida del ataque de la MAO.

Un punto interesante que emerge del presente estudio es que la liberación basal de DA depende de la concentración de DA en el compartimento extravesicular del citoplasma. Por ejemplo, la clorgilina que daña la degradación de la DA extravesicular del citoplasma incrementa su liberación basal, y cuando la DA extravesicular del citoplasma es aumentada substancialmente por tratamiento simultáneo con reserpina (que trasloca la DA vesicular al citosol) (Peter y col. 1994) o por inhibición del metabolismo citosólico de la DA con clorgilina, se incrementa marcadamente la liberación basal de DA. Esta dramática potenciación causada por reserpina es también inducida por la vinpocetina. Sin embargo, en comparación con la reserpina, la vinpocetina sólo causa una moderada facilitación de la liberación de DA inducida por clorgilina (Tabla 1, columna 4). Esta diferencia cuantitativa es improbable que sea debida a la concentración de vinpocetina, ya que para probar los efectos simples y combinados de la vinpocetina y la clorgilina, la vinpocetina fue aplicada a una concentración (15 μM) que ya induce el efecto máximo sobre los niveles de DOPAC (Fig. 9c). Si estas diferencias cuantitativas entre la vinpocetina y la reserpina se deben a la porción de la molécula de reserpina ausente en la molécula de vinpocetina es desconocido. La inhibición por reserpina del almacenaje de la DA ha sido reportado que es prácticamente

irreversible (Rudnick y col. 1990). Investigaciones futuras dirigidas a probar los efectos tipo reserpina de la vinpocetina sobre otras monoaminas ayudarán a establecer posibles diferencias entre la vinpocetina y drogas que son conocidas por comprometer el almacenaje de monoaminas en las vesículas sinápticas.

Es importante hacer notar que en la mayor parte de los estudios in vitro dirigidos a probar el efecto de drogas sobre la liberación de DA en sinaptosomas de estriado se sigue la liberación de DA radioactiva precargada a la preparación, que se perfunde con buffers que contienen el IMAO pargilina a una alta concentración (100 μ M). La pargilina se emplea para impedir que la DA radioactiva se metabolice y el marcaje se encuentre en los metabolitos del neurotransmisor. Los experimentos con [3 H]DA precargada reportados aquí confirman el bloqueo de los CSSV por vinpocetina como es evidenciado por la reducción marcada de la liberación de [3 H]DA evocada por veratridina (Fig. 10, min 7-12). En estos experimentos el tritio liberado debe ser DA marcada (y no DOPAC marcado), ya que el metabolismo de [3 H]DA es inhibido por pargilina. Es interesante notar que la vinpocetina que no influencia la liberación basal de DA endógena (Fig. 7a y Tabla 1, columna 4, filas 1 y 3) incrementa la liberación basal de [3 H]DA (Fig. 10, min 1-6). Esta controversia aparente es explicada por la inhibición del almacenaje de [3 H]DA por vinpocetina en condiciones en las que el metabolismo de [3 H]DA es inhibido por pargilina. En otras palabras, en los sinaptosomas expuestos a pargilina y vinpocetina toda la [3 H]DA debe estar localizada en el compartimento extravesicular, ya que el metabolismo de [3 H]DA es inhibido por pargilina y la vinpocetina inhibe el almacenaje de [3 H]DA, lo que explica el aumento en la liberación basal de la DA radioactiva en presencia de vinpocetina y apoya la

conclusión de que la liberación basal de DA depende de la concentración de DA en el compartimento extravesicular del citoplasma. Aunque en los sinaptosomas control también hay pargilina, que evita la degradación de la [³H]DA, la ausencia de la vinpocetina en los sinaptosomas control hace que la concentración citoplasmática extravesicular de [³H]DA se reduzca por el almacenaje parcial de [³H]DA precargada dentro de las vesículas sinápticas, en comparación con los sinaptosomas tratados con vinpocetina (que impide el almacenaje de [³H]DA) y pargilina. Este resultado también indica que la facilitación producida por vinpocetina sobre la liberación de DA endógena inducida por clorgilina puede ser extendida a otros IMAO's, como la pargilina.

En resumen, la inhibición de la liberación de neurotransmisor disparada por el aumento de la permeabilidad de los CSSV presinápticos es probable que contribuyan a la capacidad neuroprotectora de la vinpocetina en el SNC, ya que la inhibición de la liberación de DA evocada por veratridina, mostrada aquí, se extiende a los neurotransmisores aminoácidos excitatorios (Sitges y Nekrassov, 1999) que están 1000 veces más concentrados que la DA en las terminales aisladas del estriado (Sitges y col. 2000). No sabemos si el efecto de la vinpocetina sobre el almacenaje vesicular de DA que incrementa la concentración de DOPAC exportado a la sinápsis también contribuye a la capacidad neuroprotectora de la vinpocetina en la isquemia, una de las principales causas de daño neuronal. Sin embargo es interesante que la liberación de DOPAC es dependiente de ATP (Miyamoto y col. 1991) y que la reducción de los niveles de ATP por isquemia particularmente reduce la liberación de los metabolitos de la DA

incluyendo el DOPAC (Slivka y col. 1988; Hillered y col. 1989; Phebus y col. 1995; Toner y Stamford, 1999) contrariamente a lo que hace la vinpocetina.

En conclusión:

1. La capacidad de la vinpocetina de reducir la permeabilidad al Na^+ mediante la inhibición de los CSSV presinápticos, con la consecuente inhibición de la liberación de DA de las terminales nerviosas de estriado que ocurre en condiciones patológicas por la reversión del funcionamiento del DAT, debe contribuir importantemente a los efectos neuroprotectores de la vinpocetina (Fig. 11). Sin embargo es importante recordar que dicho efecto que se demuestra en la presente tesis por la inhibición que causa la vinpocetina sobre la liberación de DA inducida por veratridina y su incapacidad de inhibir la exocitosis de DA inducida por alto K^+ , es extensivo a los aminoácidos excitatorios como se demostró anteriormente.

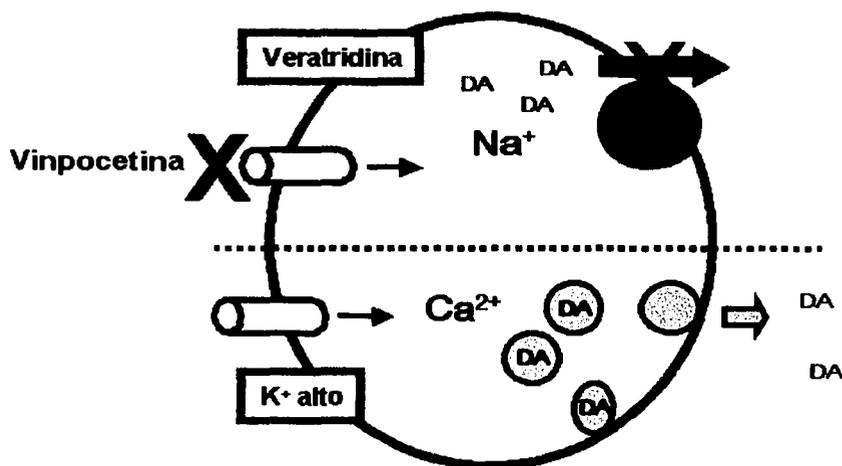


Fig. 11. La vinpocetina inhibe selectivamente la liberación de DA mediada por el DAT.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2. La vinpocetina incrementa los niveles de DOPAC en las terminales de estriado aisladas de manera dependiente de concentración a costa de la disminución de la DA interna.

3. La vinpocetina parece ejercer este efecto haciendo más disponible a la DA para la degradación por la MAO. Los efectos de la vinpocetina se asemejan mucho al de la reserpina que es un inhibidor del transporte de la DA a las vesículas sinápticas sugiriendo que la vinpocetina de manera similar a la reserpina inhibe el transporte de la DA a las vesículas sinápticas .

4. La vinpocetina y la reserpina potencian la liberación de DA en las terminales en la presencia de los IMAO clorgilina y pargilina. Aunque la reserpina es más eficiente y potente que la vinpocetina para potenciar la liberación de DA en presencia de clorgilina. En el siguiente esquema resumo gráficamente la interpretación de los efectos de la vinpocetina (y la reserpina) sobre la distribución de las catecolaminas estudiadas en el presente trabajo (Fig. 12).

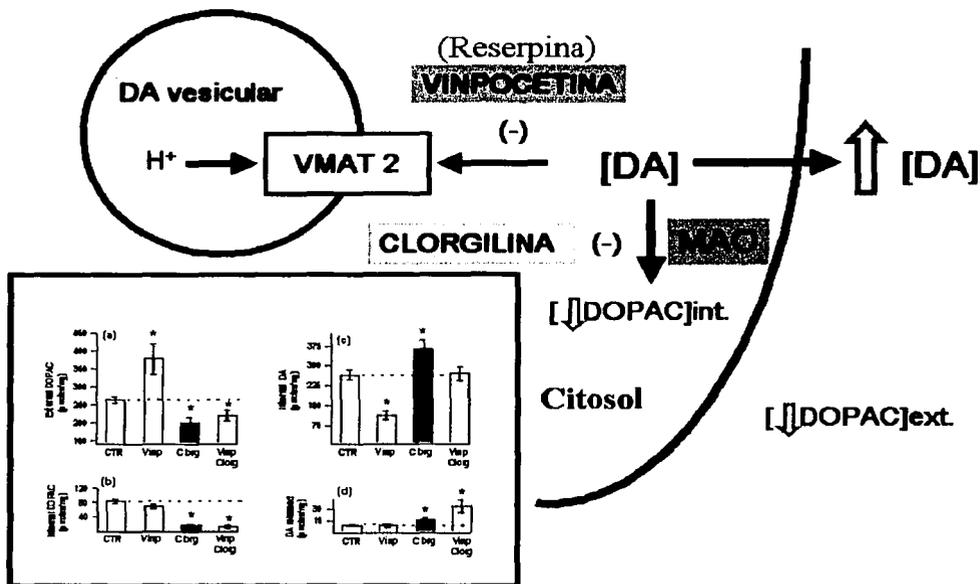


Fig. 12. Interpretación de los efectos simples y combinados de la vinpocetina y la clorgilina sobre las distribuciones internas y externas de la DA y el DOPAC. Los resultados de los efectos simples y combinados de la vinpocetina y la clorgilina que se presentaron en la Tabla 1 se ilustran en las barras dentro de la Fig. 11. Las gráfica de barras que sigue a la Fig. 11 ilustra los efectos simples y combinados de la reserpina, para su comparación.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

VI. PERSPECTIVAS.

Con base en los hallazgos de la tesis, y con objeto de profundizar en los mecanismos de neuroprotección de la vinpocetina, la presente investigación pudiera orientarse en las direcciones siguientes:

1) Profundizar, respecto a las propiedades farmacológicas de la vinpocetina en relación a su capacidad de bloquear al canal de Na^+ . Por ejemplo, sería de interés investigar el mecanismo mediante el cual la vinpocetina reduce la permeabilidad al Na^+ mediada por la activación del CSSV. A este respecto podríamos mencionar que es improbable que la vinpocetina inhiba la permeabilidad al Na^+ uniéndose directamente a la región del poro externo (sitio 1) del canal, como lo hace la TTX, ya que los presentes hallazgos indican que la vinpocetina actúa a nivel del VMAT, y esto sugiere que la vinpocetina es capaz de introducirse a la terminal nerviosa. Por consiguiente es más probable que la vinpocetina se una al canal por su parte interna. No obstante no podemos descartar la posibilidad de que la vinpocetina se una a alguna región hidrofóbica membranal, compita con la veratridina por el mismo sitio, ó se una a otra región del canal de Na^+ . Como un abordaje inicial para explorar una posible acción directa de la vinpocetina con los diferentes sitios del CSSV se podrían realizar estudios de "binding" de marcadores radioactivos de los diferentes sitios del canal, como por ejemplo TTX, batracotoxina, anestésicos locales, toxinas de sodio de escorpión, etc. (sección 1.2.c en la página 68 y Fig. 18 en la página 70).

2) Los presentes resultados sugieren que la vinpocetina incrementa la concentración de DOPAC en las terminales estriatales inhibiendo el transporte vesicular de DA. Por consiguiente sería de interés probar directamente esta hipótesis. Un posible abordaje para abordar directamente la hipótesis de que la vinpocetina inhibe la captura de DA a las vesículas sinápticas podría consistir en permeabilizar a las terminales nerviosas aisladas del estriado (que son ricas en terminales dopaminérgicas), con toxinas del tipo de la estreptolisina. La estreptolisina es una toxina de la bacteria *Streptococcus pyogenes* que permeabiliza la membrana de los sinaptosomas pero no la membrana de las vesículas sinápticas, ya que dichas vesículas no presentan receptores para la estreptolisina. En otras palabras, la determinación del transporte de $^3\text{[H]DA}$ a sinaptosomas tratados con estreptolisina, podría utilizarse como una estrategia alternativa para medir el transporte de $^3\text{[H]DA}$ a las vesículas sinápticas sin la interferencia del transporte de $^3\text{[H]DA}$ mediado por el DAT a través de la membrana plasmática ó de interacciones de la $^3\text{[H]DA}$ con autoreceptores dopaminérgicos D2 localizados en la membrana plasmática de las terminales nerviosas dopaminérgicas aisladas del estriado . Otra posible alternativa podría consistir en estudiar los efectos de la vinpocetina sobre la captura de $^3\text{[H]DA}$ a vesículas sinápticas aisladas de sinaptosomas del estriado. Sin embargo esta estrategia tiene el inconveniente de que requeriría demostrar que la preparación de vesículas sinápticas aisladas no tiene otros contaminantes que pudieran unir $^3\text{[H]DA}$ inespecíficamente; tales como fragmentos de membrana plasmática, lo que resulta muy difícil y más laborioso.

3) Otra dirección que podría seguirse consistiría en profundizar respecto a qué contribución tiene la capacidad de la vinpocetina para inhibir a la fosfodiesterasa 1B1 en la neuroprotección, ya que la inhibición de dicha enzima incrementaría los niveles de GMPc intracelulares.

Una de las repercusiones del incremento en los niveles de GMPc intraneuronales es la activación de la proteína cinasa dependiente de GMPc (PKG), que participa en vías de señalización intracelulares que estimulan la sobrevivencia neuronal. En esta línea también se podría estudiar si la vinpocetina potencia el aumento de GMPc inducido por NO, ya que el NO activa a la enzima guanilato ciclasa que forma GMPc y la vinpocetina se esperaría que aumentara al GMPc al inhibir su degradación por la fosfodiesterasa 1B1.

4) Otra dirección que podría seguirse consistiría en investigar si la vinpocetina detiene la caída en los niveles de ATP que inducen agentes que causan daño neuronal.

APÉNDICE 1

NEUROTRANSMISION

1.1. Exocitosis de Neurotransmisores

La participación del Ca^{2+} en los procesos de secreción, se conoce desde hace mucho tiempo. Uno de estos procesos de secreción incluye la exocitosis de los neurotransmisores desde las terminales nerviosas presinápticas. En este caso el papel del Ca^{2+} no sólo está bien documentado sino que ha dado lugar a la llamada hipótesis del Ca^{2+} , que actualmente ha sido enriquecida tras el descubrimiento de una serie de proteínas de las vesículas sinápticas que juegan papeles específicos en el proceso de fusión vesicular que culmina en la exocitosis de los neurotransmisores.

1.1.a. Hipótesis del Ca^{2+}

La hipótesis del Ca^{2+} , introducida por Katz en 1969, propone que cuando el potencial de acción invade la terminal nerviosa presináptica, la despolarización que genera abre los canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje que están inmersos en la membrana presináptica. El Ca^{2+} entra en la terminal a favor de su gradiente electroquímico y el aumento transitorio en la concentración de Ca^{2+} interno dispara la exocitosis del neurotransmisor (Matthews, 1996; Jahn y Sudhof, 1994).

Los canales de Ca^{2+} que activan la liberación de neurotransmisores están en sitios cercanos a donde se localizan las vesículas sinápticas. Las vesículas sinápticas son organelos celulares contenidos en las terminales presinápticas de las neuronas, cuya función es almacenar a los neurotransmisores en altas

concentraciones para protegerlos de su degradación y prepararlos para su liberación durante la exocitosis. La liberación del neurotransmisor es cuántica, es decir, en paquetes, cada cuanto de neurotransmisor provoca al ser liberado un potencial sináptico unitario. Los cuantos son liberados de las terminales mediante las vesículas sinápticas. Las vesículas sinápticas no están distribuidas de manera aleatoria en la terminal presináptica sino agrupadas en regiones donde la membrana presináptica es más densa a los electrones. Esta región es llamada zona activa y las vesículas sinápticas en esta zona se liberan de manera independiente una de otra. La entrada de Ca^{2+} es requerida para la movilización y la fusión de las vesículas en la zona activa (Kandell, 1994).

1.1.b. Hipótesis SNARE (sinaptic vesicle associated release) de la fusión vesicular.

Los neurotransmisores almacenados en las vesículas sinápticas son liberados al espacio sináptico por el proceso de exocitosis que involucra la fusión de la vesículas sinápticas con la membrana plasmática de la terminal presináptica. Las vesículas sinápticas tienen un diámetro aproximado de 50 nm y su composición proteica ha sido determinada (Sudhof, 1995; De Camilli y Takei, 1996). Entre las proteínas de las vesículas sinápticas algunas están involucradas en la captura de neurotransmisores y otras son determinantes en la fusión, gemación y descarga del neurotransmisor. Las funciones de las proteínas de las vesículas sinápticas se han elucidado con ayuda de la toxina de *Clostridium botulinum*, proteasa que corta algunas de las proteínas determinantes en la fusión

de las vesículas, y del análisis de células de mutantes de proteínas de vesículas sinápticas (Ashton y Dolly, 1988; Niemann y col. 1994).

Entre las principales proteínas de las vesículas sinápticas involucradas en la exocitosis de los neurotransmisores se encuentran: la sinaptofisina, la sinaptobrevina, la sinapsina, la syntaxina, la sinaptotagmina y el SNAP-25 (Jahn y Sudhof, 1994; Calakos y Scheller, 1996; Geppert y Sudhof, 1998).

La sinaptofisina juega un papel importante en la exocitosis de los neurotransmisores, la sinaptobrevina participa en la fusión vesicular, la descarga y la fusión con la membrana celular. En el proceso de fusión vesicular las proteínas específicas de las vesículas sinápticas interactúan entre sí para formar el complejo de fusión vesicular que libera al neurotransmisor. Por ejemplo, la sinaptofisina enlaza a la sinaptobrevina con alta afinidad durante la fusión vesicular (Edelmann y col. 1995). Las sinapsinas son proteínas que son abundantes en las vesículas sinápticas y regulan la liberación de neurotransmisor interaccionando en su estado fosforilado con elementos del citoesqueleto (Edelmann y col. 1995). La syntaxina y SNAP-25 son dos proteínas de las vesículas sinápticas que están involucradas en la exocitosis de las vesículas sinápticas y junto con la sinaptobrevina forman el complejo proteico de exocitosis vesicular, conocido como SNARE, que recluta los factores citosólicos tales como el factor proteico sensible a la N-etilmaleimida (NSF) que juega un papel importante en el tráfico membranal (Hanson y col. 1997).

En la terminal sináptica no estimulada existe una fracción de vesículas sinápticas cargada con neurotransmisor en las cercanías de las zonas activas de la membrana presináptica preparadas para la exocitosis. La despolarización por

un potencial de acción estimula la entrada de Ca^{2+} que inicia el proceso excitotico. Las vesículas sinápticas empleadas en la exocitosis una vez que descargan su neurotransmisor al medio externo son reemplazadas por vesículas de reserva y las membranas de las vesículas sinápticas que se fusionaron a la membrana presináptica son recapturadas por endocitosis (Bauerfeind y col. 1996)

Los neurotransmisores se encuentran en altas concentraciones (de hasta 100 mM) dentro de las vesículas de exocitosis (Trimble y col. 1991). La exocitosis de neurotransmisores depende de Ca^{2+} libre. La teoría que explica la exocitosis neuronal se llama la hipótesis SNARE. De acuerdo con esta teoría todas las vesículas sinápticas se generan en el retículo endoplasmático y portan una señal v-SNARE que interacciona con el blanco t-SNARE. En esta teoría 8 proteínas regulan la exocitosis: v-SNARE: sinaptobrevina y t-SNARE: proteína asociada a sinaptosomas (SNAP-25), sintaxina 1, NSF, α -SNAP, β -SNAP, γ -SNAP, canal de Ca^{2+} asociado a la sintaxina y sinaptotagmina (proteína integral de membrana) (Solner y col. 1993; Jahn y Sudhof, 1994; Calakos y Scheller, 1996; Geppert y Sudhof, 1998) (Fig.13a).

El ciclo celular de las vesículas sinápticas, de llenado de neurotransmisor, translocación al sitio activo, descarga, fusión, liberación de neurotransmisor y endocitosis en vesículas de clatrina así como su reciclamiento directo e indirecto son esquematizadas con objeto de mostrar la complejidad de dicho ciclo. (Tomado de Sudhof, 1999). En el ciclo vesicular, la vía de las vesículas sinápticas en la terminal se divide en varias fases. 1) las vesículas sinápticas vacías toman neurotransmisor por transporte activo en su lumen, usando el gradiente

electroquímico formado por una bomba de H^+ vesicular, 2) Las vesículas sinápticas son translocadas a la zona activa, 3) las vesículas sinápticas se unen a la zona activa de la membrana presináptica pero no a otros componentes (fase de descarga), 4) las vesículas sinápticas son activadas para fusión y preparadas para responder a la señal de Ca^{2+} rápidamente en forma posterior. La activación es un proceso complejo de varios pasos y componentes que puede ser subdividida. 5) El influjo de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} dispara la liberación del neurotransmisor en menos de 1 mseg, el Ca^{2+} estimula el término de la reacción de fusión parcial iniciada durante el cebamiento, 6). Las vesículas sinápticas son cubiertas con clatrina y proteínas asociadas en preparación para la endocitosis, el Ca^{2+} puede participar también en la endocitosis, 7) las vesículas sinápticas vacías se liberan de su cubierta de clatrina y se acidifican vía una bomba de H^+ y se retranslocan a la región trasera de la terminal nerviosa, 8) las vesículas sinápticas se fusionan con endosomas tempranos donde forman un compartimiento de direccionamiento intermedio para eliminar proteínas viejas y mal direccionadas de las vesículas sinápticas, 9) las vesículas sinápticas son frescamente generadas por gemación de los endosomas, algunas vesículas sinápticas se reciclan vía endosomas. Es probable que el intermediario endosomal no es obligatorio para el reciclado y que las vesículas sinápticas pueden ir directamente del paso de acidificación al paso de captura de neurotransmisor (Fig. 13b).

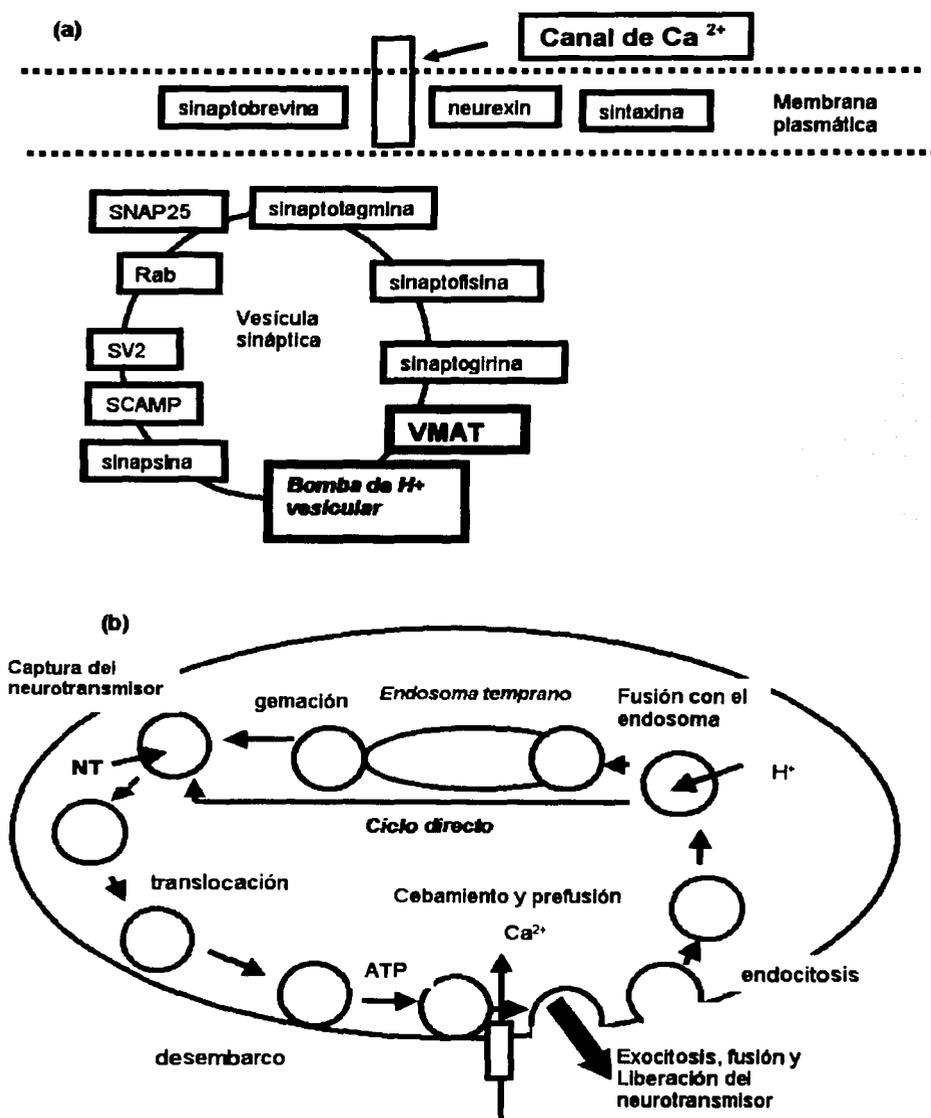


Fig. 13. Proteínas de las vesículas sinápticas y su reciclamiento. (a).. Proteínas de las vesículas sinápticas que participan en el tráfico y la exocitosis de los neurotransmisores. (b) Ciclo vesicular.

La hipótesis SNARE explica como las vesículas sinápticas liberan neurotransmisor en sitios específicos de la membrana y necesitan activarse para hacerse competentes en exocitosis. Se ha propuesto que la proteína sinexina, pudiera participar en la exocitosis ya que es una proteína que enlaza Ca^{2+} y fosfolípidos y además estimula la exocitosis del neurotransmisor (Nagatsu y Stjarne, 1998). Se han hecho estudios de los mecanismos de exocitosis en diferentes especies y estos parecen ser similares desde las levaduras hasta los organismos superiores (Bennett y Scheller, 1993).

Como se menciona previamente, la descarga de las vesículas sinápticas ocurre después de la fusión de la vesícula sináptica a la membrana plasmática. La fusión lleva a la formación de un canal en el punto de contacto, el poro de fusión, que tiene elevada conductancia (230 pS), similar a la conductancia de los conexones elementos de las uniones estrechas de las células. El poro de fusión consiste de 2 mitades, una está en la vesícula sináptica y otro en la membrana presináptica, los cuales se unen durante la descarga de la vesícula. Hay 2 proteínas asociadas con las vesículas sinápticas que pueden servir como proteínas formadoras del poro de fusión. La sinaptofisina que puede funcionar como canal y la sinaptotagmina que atraviesa la membrana plasmática y enlaza fosfolípidos y se puede insertar en la membrana en respuesta a la entrada de Ca^{2+} (Trimble y col. 1991; Jahn y Sudhof, 1994; Calakos y Scheller, 1996; Geppert y Sudhof, 1998).

Recientemente se ha descrito en sinapsis del hipocampo un proceso de exocitosis de neurotransmisor de alta velocidad denominado "kiss & run" que consiste de una liberación de neurotransmisor por la vesícula sináptica de <6 ms, en el que

sólo se abre transitoriamente el poro de fusión vesicular y se libera el neurotransmisor pero no se fusiona la vesícula sináptica a la membrana presináptica y ocurre cuando la demanda de exocitosis de neurotransmisor por estimulación elevada es muy alta (Stevens y Williams, 2000).

Durante un potencial de acción la entrada de Ca^{2+} se incrementa en la terminal presináptica de 100 nM hasta 100-200 μM . Este incremento de Ca^{2+} es adecuado para disparar la liberación del neurotransmisor. Una porción de las vesículas sinápticas permanece enlazada al citoesqueleto y representa el conjunto de reserva de las vesículas sinápticas. Las sinapsinas son proteínas que anclan a las vesículas sinápticas al citoesqueleto. Las sinapsinas son fosforiladas por la CaM-PK-II, que se activa por Ca^{2+} y calmodulina, cuando la sinapsina no está fosforilada liga a las vesículas sinápticas a los filamentos de actina. Cuando entra Ca^{2+} a la terminal, la sinapsina se fosforila y libera a las vesículas sinápticas de los microfilamentos que las mantienen atrapadas lo que hace que se muevan a la zona activa de secreción. Hay evidencia de que una proteína G pequeña llamada Rab 3A guía a las vesículas sinápticas a sus sitios blanco donde desembarcan de manera correcta. No todos los neurotransmisores son liberados de vesículas sinápticas pequeñas, existen péptidos que son empacados en vesículas sinápticas densas de 70-200 nm de diámetro y también son liberados por exocitosis después de estimulación sináptica prolongada (Kandell, 1994).

1.1.c. Transportadores vesiculares de neurotransmisores

Todos los neurotransmisores clásicos son almacenados en las vesículas sinápticas. Los transportadores vesiculares de neurotransmisores son las

proteínas de la membrana de las vesículas sinápticas responsables del almacenamiento de los neurotransmisores dentro de las mismas. Dentro de los transportadores vesiculares, el de monoaminas (VMAT) es el mejor caracterizado. Las vesículas sinápticas que tienen VMAT, también tienen una bomba de H^+ vesicular (ATPasa de H^+) similar a la presente en los lisosomas y otros organelos. La ATPasa genera un gradiente de pH que usa el VMAT para transportar a la monoamina neurotransmisora, su estequiometría es de 2 H^+ por molécula de monoamina transportada. La reserpina inhibe este transporte de monoaminas a las vesículas sinápticas. El contenido de monoaminas de las vesículas sinápticas se pierde en ausencia del gradiente de H^+ . La reserpina y la tetrabenazina (TBZ), son 2 inhibidores selectivos del VMAT. La primera enlaza al mismo sitio que las monoaminas en el VMAT e inhibe el transporte competitivamente en el rango nanomolar de manera prácticamente irreversible. El enlace de reserpina a VMAT depende de que exista un gradiente de pH en la vesícula sináptica. La reducción de la presión sanguínea, la letargia y la depresión son consecuencias del vaciamiento de monoaminas que induce la reserpina. Los efectos de este fármaco in vivo son de larga duración y de efecto retardado debido a que la reserpina se asocia lentamente con el VMAT y no se disocia de él, aunque su enlace no es covalente. La TBZ es otro potente inhibidor del transportador y su enlace al VMAT no depende de que exista un gradiente de pH vesicular. El sitio de reconocimiento de la TBZ es diferente al sitio de reconocimiento de la amina en el VMAT. El VMAT es una proteína de una sola cadena polipeptídica, tiene un peso molecular de 80 Kd y representa el 0.5% de la proteína en las vesículas sinápticas.

El VMAT se ha clonado y se ha demostrado que en el humano lo codifica un gen localizado en el cromosoma 10q25 (Surratt y col. 1993). Además, se ha demostrado que transporta a la neurotoxina dopaminérgica, MPP⁺, cuando esta toxina se encuentra presente en el citoplasma, por lo que el VMAT puede considerarse un factor de resistencia a dicha neurotoxina. Existen 2 tipos de VMAT, denominados 1 y 2. El VMAT1 ocurre principalmente en las vesículas que sintetizan catecolaminas de las glándulas suprarrenales y el VMAT2 es fundamentalmente cerebral.

El VMAT1 es una proteína de 521 aminoácidos y tiene 12 dominios transmembranales, 3 sitios de glucosilación, y el lado amino y el carboxilo terminal encaran al citoplasma. Los ionóforos de H⁺, agentes que disipan el gradiente de pH, bloquean el transporte de las monoaminas a las vesículas sinápticas. La afinidad del VMAT por las monoaminas tiene el siguiente orden de afinidad: serotonina > adrenalina > DA > NA. La reserpina inhibe el transporte de monoaminas con una IC₅₀ de 25nM y la TBZ tiene una IC₅₀ de 4μM (Erickson y col. 1992; Peter y col. 1994; Schuldiner, 1994). El VMAT2 se expresa predominantemente en el cerebro y tiene 78% de homología con el VMAT1 pero difiere de éste en el dominio transmembranal 1-2 así como en el amino y carboxilo terminales. La forma cargada de las aminas es la que es transportada por el VMAT. Otros compuestos como p-cloro-anfetamina, metilendioximetanfetamina (MDMA) y anfetamina también son transportados por el VMAT. El VMAT tiene homología estructural con la proteína de resistencia a multidroga, con el mayor grado de homología compartido en la región amino terminal. El mecanismo de acción que ha sido propuesto para el VMAT se puede resumir como sigue: el

sustrato (por ejemplo una monoamina cerebral neurotransmisora) se une al VMAT en su estado de alta energía. El VMAT transporta al primer H^+ al exterior de la vesícula y los intercambia por la molécula de monoamina que es transportada al interior de la vesícula sináptica, el VMAT transporta al segundo H^+ para volver a su estado inicial, donde el VMAT encara al citoplasma y está listo para recoger otra molécula de monoamina del citoplasma ya que trabaja en un ciclo. En consecuencia el VMAT transporta dos H^+ al citoplasma por cada molécula de monoamina que almacena en la vesícula sináptica (Schuldiner, 1994) (Fig. 14 y 15).

Los inhibidores del VMAT como la TBZ y la reserpina al evitar el almacenaje vesicular de las monoaminas tales como la DA, incrementan su degradación y como consecuencia de la disminución de la DA aumentan su síntesis. Por ejemplo en los sinaptosomas de estriado la TBZ incrementa 200% la síntesis de DA (Kuczenski, 1977). Los fármacos que disminuyen la concentración citoplasmática de DA e incrementan su concentración en el espacio sináptico tales como la cocaína y el GBR-12935 (que inhiben la recaptura de la DA liberada), el ácido amfonélico (que al evitar que la DA sea almacenada en la vesícula la expone a la degradación de la MAO) y la α -metil-p-tirosina (inhibidor de la TH), inducen incremento de la velocidad máxima (V_{max}) a la que se captura la DA a la vesícula sináptica e inducen incremento en el número máximo de sitios donde moléculas de DA se pueden enlazar al VMAT (B_{max}) (Brown y col. 2001). Consistentemente la transfección del VMAT en células dopaminérgicas aumenta el volumen de las vesículas sinápticas y la cantidad de DA almacenada en cada vesícula así como el

número de vesículas que liberan su contenido en respuesta a un estímulo despolarizante (Colliver y col. 2000).

El análisis citoquímico con anticuerpos producidos contra el VMAT2 ha mostrado su distribución intracelular en las neuronas dopaminérgicas. El VMAT2 se localiza dentro de las neuronas en la membrana de las vesículas sinápticas y también se localiza en regiones de forma vesiculada que parecen ser parte del retículo endoplasmático en el soma de las neuronas dopaminérgicas (Nirenberg y col. 1996a).

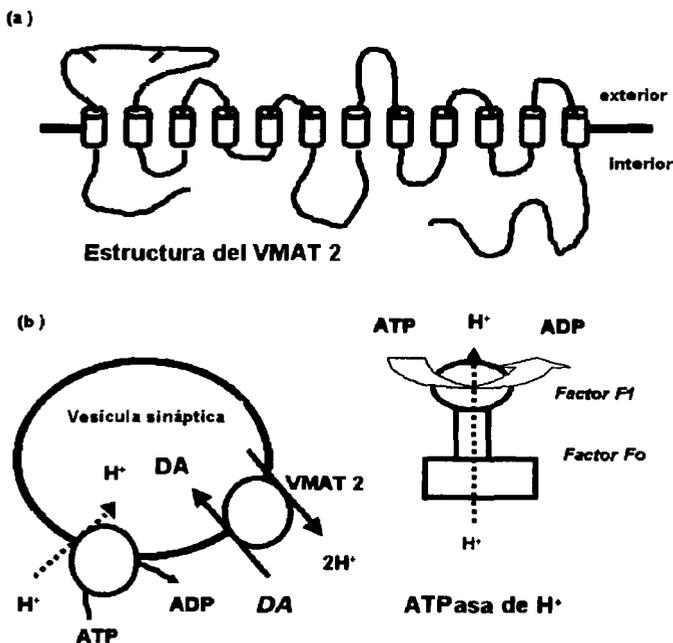
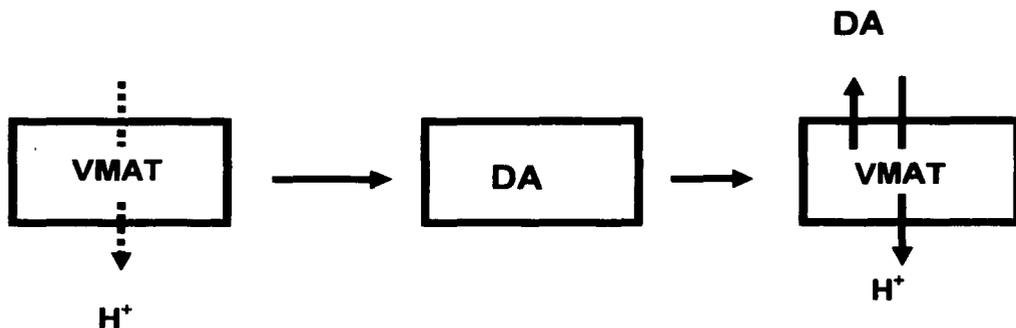


Fig. 14. Transporte vesicular de monoaminas. a) Estructura del transportador vesicular de DA tipo 2, basado en la secuencia de aminoácidos del VMAT 2. Reproducida de Liu y Edwards (1997). El VMAT 2 tiene 12 segmentos transmembranales, el asa extracelular 1-2 tiene residuos de carbohidrato en su estructura. b) En la vesícula sináptica trabajan coordinadamente la ATPasa de H⁺ y el VMAT 2 para transportar DA al interior de la vesícula sináptica. El VMAT 2 aprovecha el gradiente de H⁺ generado por ATPasa de H⁺ para transportar la DA.

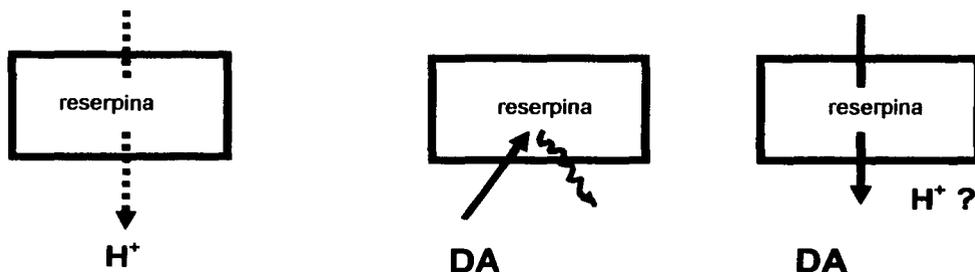
Fig. 15. Mecanismo propuesto para el transporte de la DA al interior de la vesícula sináptica



El VMAT adopta una configuración de alta energía capaz de transportar una monoamina después de expulsar un H^+ al exterior de la vesícula sináptica

VMAT enlaza en el estado energizado a la DA del citosol. La DA se enlaza al sitio de reconocimiento de las monoaminas del VMAT.

El VMAT transloca Otro H^+ desde el interior de la vesícula sináptica, para catalizar el transporte de DA del citosol al interior de la vesícula sináptica. Queda listo para otro ciclo de transporte



El inhibidor del VMAT, reserpina se une al transportador sólo en el estado activado y bloquea reversiblemente el sitio de reconocimiento de las monoaminas. La TBZ se une independiente del estado del VMAT

En presencia de reserpina el sitio de reconocimiento de la monoamina está bloqueado y la DA no se puede unir al VMAT

La DA por tanto no se transloca al interior de la vesícula sináptica y permanece en el citosol incrementándose su concentración citoplasmática.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.2. Liberación de neurotransmisores mediada por reversión de sus transportadores

Además de la exocitosis de neurotransmisores mediada por la fusión de las vesículas sinápticas a la membrana plasmática, los neurotransmisores también son liberados desde el citoplasma de las terminales presinápticas mediante los transportadores de neurotransmisores. Estos son proteínas ubicadas en la membrana citoplasmática que recapturan al neurotransmisor liberado. Cuando la concentración intraterminal de Na^+ se eleva substancialmente, los transportadores de neurotransmisores funcionan en su forma reversa, ya que dependen del gradiente de Na^+ para su funcionamiento.

Esta liberación por reversión del funcionamiento de los transportadores de neurotransmisores ocurre basalmente pero se incrementa en condiciones patológicas tales como la isquemia ó la anoxia del tejido nervioso (Buyukuysal y Mete, 1999). Se caracteriza porque es dependiente de la concentración de Na^+ externo, es proporcional a la entrada de Na^+ a la terminal, no depende de Ca^{2+} externo y es inducida por drogas que colapsan el gradiente membranar de Na^+ . Entre los estudios en donde se ha de caracterizado este fenómeno para los neurotransmisores GABA y DA se encuentran varios realizados en nuestro laboratorio (Sitges y col. 1989; Sitges y col. 1993; Sitges y col. 1994; Sitges y col. 1995a, 1995b). Este fenómeno también ha sido caracterizado para glutamato (Nicholls, 1989).

1.2.a. Mecanismos de inactivación de neurotransmisores

Fisiológicamente los neurotransmisores se liberan desde la neurona presináptica. Una vez que llevaron la señal a la célula receptora ó neurona postsináptica, son rápidamente eliminados de la hendidura sináptica para permitir que el potencial de membrana regrese a su nivel de reposo y quede en disposición de recibir otra señal. Existen tres mecanismos que operan para eliminar a los neurotransmisores de la hendidura sináptica. Estos son: 1) la recaptura del neurotransmisor liberado, 2) la difusión del neurotransmisor al espacio extracelular y 3) la degradación enzimática del neurotransmisor liberado. A excepción de la acetilcolina que cesa su acción al ser degradada por una acetilcolinesterasa específica, los demás neurotransmisores clásicos (DA, NA, serotonina, glutamato, aspartato, GABA, glicina y taurina) cesan su acción al ser recapturados por las terminales nerviosas que los liberaron ó por sesensibilización de sus receptores. Para algunos de estos neurotransmisores han sido demostrados sistemas de captura de alta afinidad dependientes de Na^+ y temperatura (Sitges, 1987).

1.2.b. El DAT

El transportador de DA (DAT) es una molécula proteica de la membrana de las neuronas dopaminérgicas que funciona en el transporte de DA y que está en la superficie membranal de dichas neuronas. El DAT se encarga de recapturar la DA una vez que es liberada al medio externo en la terminal sináptica. La captura de DA por el DAT es un proceso altamente selectivo para DA y es dependiente de Na^+ , de Cl^- y es óptimo a 37 °C (bajas temperaturas inactivan al DAT). La recaptura de otros neurotransmisores tales como NA y serotonina también

depende de Na^+ y temperatura pero se efectua por transportadores específicos diferentes del DAT (Uhl y Hartig, 1992).

El gen del DAT se ha localizado en la parte distal de cromosoma 5 y codifica para una proteína de 620 aminoácidos con p.m. de 68 Kd que tiene 12 dominios transmembranales (Giros y col. 1992)(fig. 16).

El mecanismo de acción propuesto para el funcionamiento del DAT es un mecanismo aleatorio, secuencial y de multisubstratos para el DAT del estriado. La DA ó el Na^+ (2 iones) se enlazan al DAT en una secuencia aleatoria, este paso es seguido por el enlace del ión cloro (Cl^-). En el paso siguiente el DAT acarrea la DA al interior neuronal. Si la cocaína está presente el DAT es inhibido por ésta, la cual bloquea el sitio de enlace de Na^+ impidiendo el transporte de DA (McElvain y Schenk, 1992)(fig. 17).

Se ha mostrado la presencia y funcionamiento del DAT en los sinaptosomas de estriado y se ha observado que la anfetamina, la metanfetamina y la metil-dideoxi-metanfetamina, MDMA, ("extasis"), decrecen la expresión y el funcionamiento del DAT pero no la cocaína, el metilfenidato y la fenfluramina que sólo inhiben el funcionamiento (Fleckenstein y col. 1999). Se ha sugerido la coexistencia de los transportadores de GABA y DA en las mismas terminales presinápticas en los sinaptosomas de estriado, ya que el GABA eleva la liberación de DA del estriado y el ácido nipecótico y la isoguvacina, inhibidores del transportador de GABA, bloquean el efecto inhibitor del GABA sobre la recaptura de DA, indicando que la recaptura de GABA compite con la recaptura de DA en la terminal ya que ambas dependen de Na^+ externo (Bonanno y Raiteri, 1987). Se ha mostrado una correlación positiva entre la captura de [^3H]DA y el enlace de

[³H]GBR-12783, inhibidor del DAT, en el estriado durante el proceso de la maduración cerebral de las ratas. Entre el día 1-40 postnatal se llega al 80% de la cantidad de DAT del adulto (Bonnet y Constantin, 1989) indicando que la aparición de la expresión del DAT es paralelo con la captura de DA en el estriado. Por otro lado se ha construido un modelo de la dependencia de Na⁺ para el funcionamiento del DAT en sinaptosomas de estriado, ya que para que la DA sea acarreada al interior neuronal debe meterse Na⁺ a la terminal. El DAT tiene requerimiento absoluto de Na⁺. Por ejemplo, una molécula de DA y 2 iones de Na⁺ son cotransportados por el transportador. El transporte es proporcional a la concentración externa de Na⁺. Este modelo para el transporte de DA por el DAT se ha denominado modelo cinético de equilibrio rápido (Wheeler y col. 1993). También se ha observado una dependencia del ión cloro (Cl⁻) en adición al Na⁺ para el transporte de DA por el DAT (Sitges y col. 1994). Se ha mostrado que por cada molécula de DA transportada son cotransportadas 2 iones Na⁺ y 1 ión Cl⁻.

Los sitios de recaptura de la DA en el estriado que corresponden al DAT están distribuidos diferencialmente en los estriosomas y la matriz del estriado, indicando que en las diferentes regiones del estriado la distribución del DAT no es homogénea (Graybiel y Moratalla, 1989). Hay diferencia en la expresión del DAT en el estriado que es regional siendo mayor su densidad en la porción de la matriz del estriado que en la región de los estriosomas (Graybiel y Moratalla, 1989). También hay diferencias entre el estriado ventral y el dorsal en cuanto a la distribución del DAT indicando que hay zonas del estriado con mayor concentración del DAT. Así se ha observado un mayor enlace de [³H]mazindol en el estriado dorsal que en el estriado lateral y en general el enlace de [³H]mazindol

es 3 veces mayor en el estriado que el enlace que se observa en el núcleo acumbens. El núcleo acumbens carece de DAT en alta concentración por tanto no hay un grado elevado de recaptura de DA después de su liberación (Marshall y col. 1990). En relación al DAT se han hecho experimentos de la cinética y el bloqueo de la recaptura de DA mediada por el transportador en sinaptosomas de estriado. Se ha estudiado el flujo unidireccional de [³H]DA en sinaptosomas y se ha mostrado que tiene 2 fases, una que depende de Na⁺ y Cl⁻ y otra que es inhibida por cocaína, nomifensina y anfetamina (Krueger, 1990). También se ha mostrado que la captura de DA por los sinaptosomas de estriado por el DAT ocurre en un amplio rango de concentraciones de DA y que hay una captura de DA de alta afinidad y otra de baja afinidad. La recaptura de alta afinidad pudiera representar al DAT y el transporte de baja afinidad de DA pudiera representar mecanismos de captura post-sinápticos de terminales dopaminérgicas y no dopaminérgicas menos específicos (Mireylees y col. 1986).

Usando [³H]metilfenidato y determinando su enlace selectivo se ha mostrado que metilfenidato tiene un receptor que lo enlaza a los sinaptosomas preparados a partir del cuerpo estriado que es dependiente de Na⁺ y cuyo enlace es inhibido por ácido ritalínico, indicando que el [³H]metilfenidato se enlaza selectivamente al DAT. La inhibición del DAT por metilfenidato propicia un incremento de la actividad motora en las ratas al inducir esta droga un aumento de la cantidad de DA liberada (Schweri y col. 1985).

La nomifensina es un inhibidor de la recaptura de DA al inhibir selectivamente la función del DAT, también aumenta la liberación de DA de los sinaptosomas de estriado (Hunt y col. 1974; Koe, 1976; McKillop y Bradford, 1981;

Dubocovich y Zahniser, 1985). La geometría rígida estructuralmente similar a la DA hace que la nomifensina se una al DAT pero no se transporte (Koe, 1976).

En el estriado hay un transporte de [³H]DA dependiente de Na⁺ que representa el funcionamiento del DAT. En ausencia de Na⁺ la formación de DOPAC es reducida 27% y la de ácido homovanílico (HVA) 47% y la nomifensina inhibe la formación de DOPAC 62% en este sistema (Schoepp y Azzaro, 1985). Se ha investigado la localización del DAT y se ha observado que se localiza en las dendritas y los axones de las neuronas dopaminérgicas (Nirenberg y col. 1996b). Para medir el funcionamiento del DAT en el cerebro se ha diseñado un método basado en la determinación de la captura de [³H]DA en sinaptosomas (Cooper y Carlson, 1983). También se ha hecho una comparación entre la captura de DA de sinaptosomas y la captura de DA en rebanadas de tejido nervioso para determinar en que preparación se observa mejor el fenómeno de captura de [³H]DA y se ha observado que las 2 son igualmente adecuadas (Near y col. 1988). Por otro lado en la captura de [³H]DA de sinaptosomas de estriado se observa un decaimiento de la captura de [³H]DA que es dependiente del tiempo, de la temperatura y dicha captura es protegida por adición de ditiotreitól (protector de grupos SH) y por la adición de DA, indicando que el DAT es sensible a la oxidación de sus grupos SH, los cuales son esenciales para su funcionamiento (Schoemaker y Nickolson, 1983). El DAT es una glucoproteína y el ácido siálico es parte de los carbohidratos presentes en el DAT. Dicho ácido siálico está involucrado en la captura de DA de sinaptosomas de cerebro de rata ya que la eliminación química del ácido siálico por la neuraminidasa inhibe la función del DAT (Zaleska y Erecinska, 1987).

Por otra parte, se observa una inhibición del 50% en la recaptura de DA en los sinaptosomas de estriado de animales pretratados con los antidepresivos como la nomifensina (Manias y Taylor, 1983). Los compuestos de la serie GBR también son compuestos inhibidores con alta selectividad por el DAT (Bonnet y Constantin, 1986; Janowsky y col. 1986, 1987; Chagraoui y col. 1987). El compuesto WIN-35428 un análogo artificial no metabolizable de la cocaína, derivado del tropano, inhibe la recaptura de DA al inhibir al DAT. Se ha observado que tanto la DA como el WIN-35428 son translocados por el DAT en los sinaptosomas de estriado, y que la captura de DA por el DAT es lineal durante 8 min pero la del WIN-35428 es lineal sólo 1 min y llega a una fase estacionaria en 20 min (Xu y col. 1995). La captura de DA es estimulada por ATP en los sinaptosomas de estriado (Cao y col. 1990), su efecto parece ser mediado por la estimulación de la actividad de la bomba de Na^+/K^+ ya que el transporte de DA depende de la concentración de Na^+ externo a la terminal.

El compuesto mazindol es otro inhibidor selectivo del DAT e inhibe la captura de DA e incrementa su liberación, ya que en ratas lesionadas de la vía nigroestriatal induce giros hacia el lado lesionado al inducir la liberación de DA (Kruk y Zarrindast, 1976). El mazindol inhibidor de la recaptura de DA incrementa los niveles de DOPAC en ratas tratadas con el agonista dopaminérgico espiperona y facilita la liberación de DA (Fuller y Snood, 1979). El mazindol, inhibe la captura de ^3H DA y estimula la liberación de ^3H DA, con menor potencia que la anfetamina (Carruba y col. 1977).

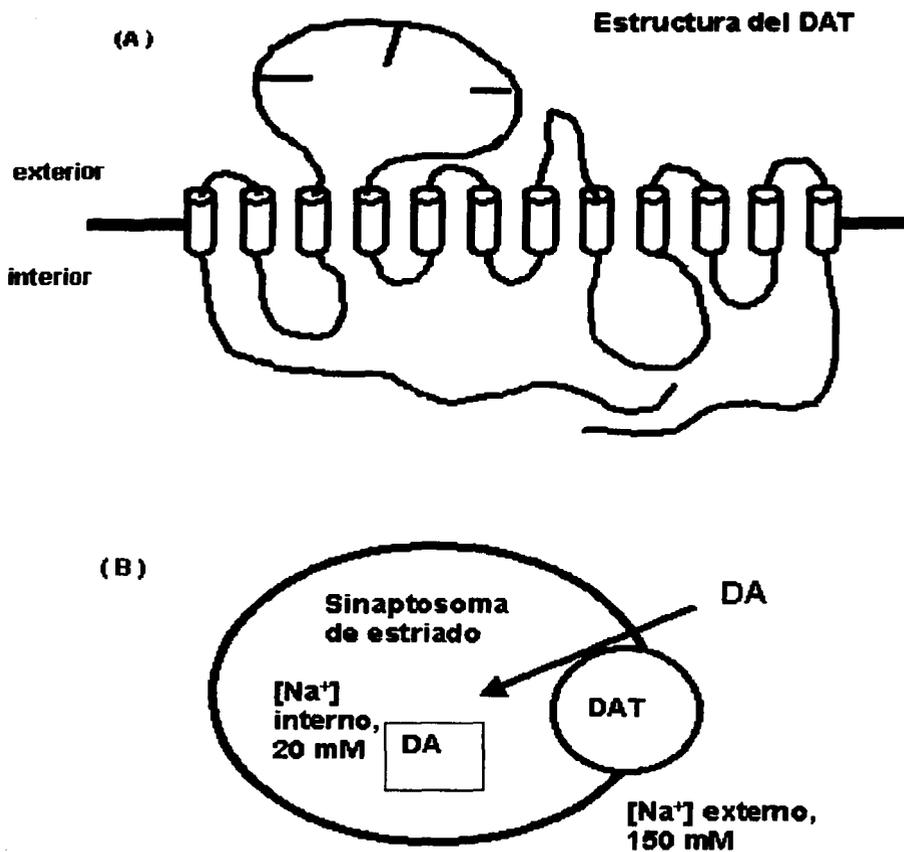


Fig. 16. El DAT. A) Estructura del transportador de DA (DAT) propuesta con base en la secuencia de aminoácidos, que muestra los 12 dominios transmembranales, el asa extracelular entre los segmentos 3-4 y los segmentos amino y carboxilo terminales intracelulares, que son particularmente largos. Tomado de Amara y Kuhar (1993) B). El transporte de DA mediado por el DAT depende del gradiente de Na⁺, y de Cl⁻.

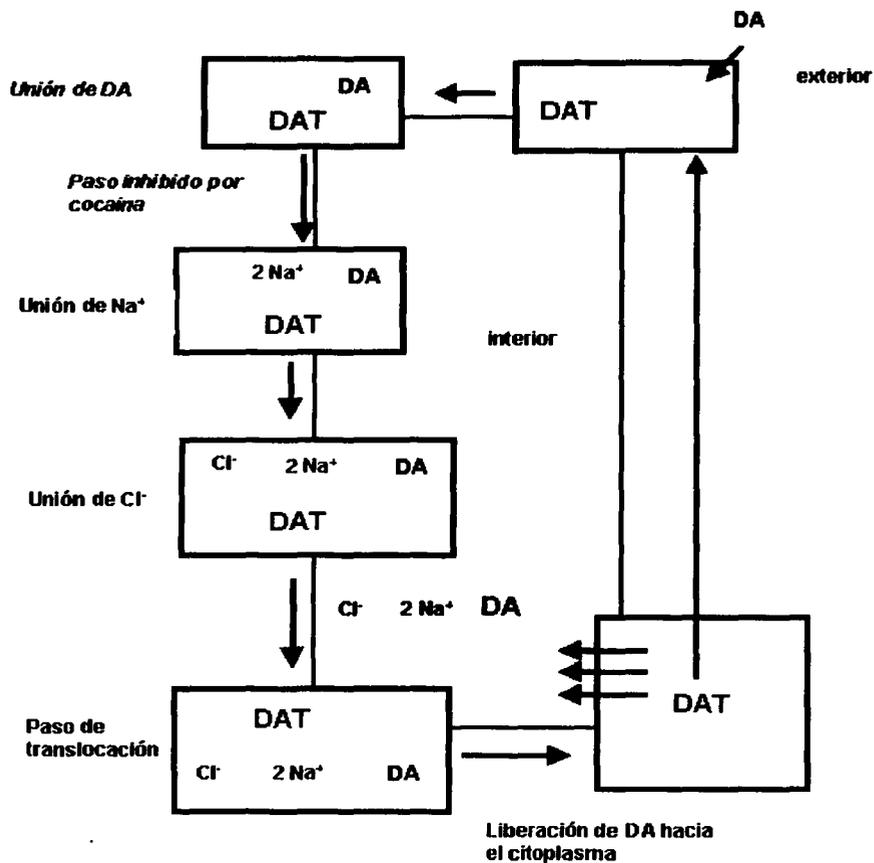


Fig. 17. Mecanismo propuesto para la recaptura de la DA liberada. El DAT es una proteina membranal que trabaja en un ciclo repetido que depende de la concentraci3n de Na⁺ y Cl⁻ y DA en el medio externo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.2.c. Canales de Na⁺ dependientes de voltaje

Los canales de Na⁺ son complejos proteicos formados por una subunidad α glicosilada de 260 Kd asociada no covalentemente con la subunidad β 1, de 36 Kd y vía un enlace disulfuro a la subunidad β 2, de 33 Kd. El análisis de hidrofobicidad de la secuencia de aminoácidos de la subunidad α sugiere una topología consistente de 4 repetidos homólogos enlazados a la membrana (I-IV), cada uno compuesto de 6 segmentos transmembranales (S1-S6). Los lados amino y carboxilo terminales son intracelulares. El canal de Na⁺ tiene sitios de glucosilación extracelulares y sitios de fosforilación intracelulares. La subunidad β 1 tiene un sólo segmento transmembranal y 4 sitios de fosforilación extracelulares. Hay 4 tipos de subunidades α : I, II, IIA, y III, las tipo II y IIA se producen por ensamblaje alternativo. Se ha documentado la existencia de un canal de Na⁺ cardiaco y dos tipos de canal de Na⁺ en el músculo esquelético.

En el cerebro humano se han aislado los canales de Na⁺ del tipo II y se ha demostrado que en la subunidad α 1 hay 97% de homología con el canal de rata, en el caso de la subunidad β 1, la del humano tiene 96% de homología con la de la rata. Estas analogías estructurales, junto con la similitudes de las corrientes transportadas por los canales, sugieren que las neuronas de rata representan un modelo válido para el estudio de la expresión y función de los canales de Na⁺ humanos.

Muchos de los canales de Na⁺ están en reposo cerrados, cuando la membrana se encuentra con un potencial negativo. Durante la despolarización la conductancia de Na⁺ aumenta debido a la activación de los canales de Na⁺, llega

a un pico y después declina debido a la inactivación del canal. Durante la activación una compuerta se abre en la despolarización y se cierra en la repolarización. Hay una compuerta de inactivación que se cierra lentamente por despolarización y se abre por repolarización.

La subunidad α es el principal componente del canal de Na^+ y forma canales de Na^+ funcionales cuando se expresa en ovocitos. La subunidad $\beta 1$, es un valioso blanco para desarrollar moduladores de canales de Na^+ terapéuticos ya que modifican las propiedades de inactivación de la subunidad α del canal de Na^+ . La coexpresión de la subunidad $\beta 1$ con la subunidad α se requiere para expresar las propiedades cinéticas normales del canal de Na^+ . La subunidad α contiene todos los elementos estructurales para formar el poro iónico, asegurar la selectividad iónica y llevar a cabo las funciones básicas del canal de Na^+ . También contiene muchos de los sitios receptores para toxinas y fármacos que modifican la función del canal de Na^+ . El poro transmembranal está en el centro de un cuadrado formado de 4 subunidades repetidas cada subunidad formando $\frac{1}{4}$ del poro del canal.

Los canales de Na^+ son el blanco de varias toxinas de origen natural entre las que se encuentran: la tetrodotoxina (TTX), la saxitoxina (STX), algunas toxinas de escorpión, la veratridina, los anestésicos locales, tales como la lidocaina y la procaina entre otros. A continuación se describen los sitios del canal de Na^+ (Fig. 18).

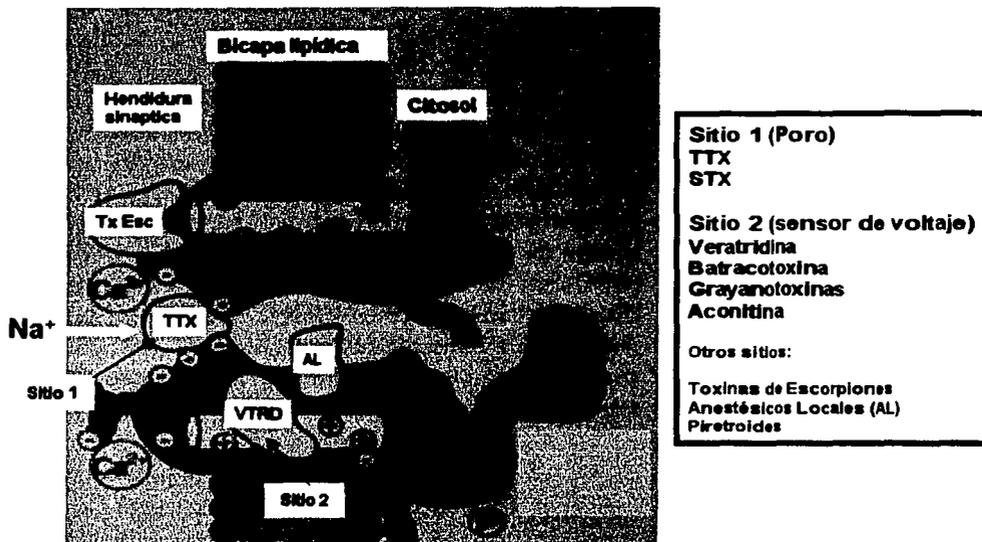


Fig. 18. Esquema que muestra los sitios del canal de sodio.

La TTX y la STX son toxinas que bloquean selectivamente a los canales de Na^+ uniéndose con alta afinidad al sitio 1 del canal de Na^+ que se localiza en el lado externo del poro del canal, la protonación y la modificación covalente de los residuos carboxilo en el canal de Na^+ bloquea su enlace y sugiere que estas toxinas catiónicas enlazan a los residuos carboxilo en el lado extracelular de apertura del poro del canal, la substitución de los glutamatos por glutamina en la región S5-S6 disminuye la afinidad de la TTX por el canal de Na^+ . Aunque los canales de Na^+ cardiacos contienen glutamato en la región del poro enlazan a la TTX con menor afinidad indicando que otros residuos aminoácidos del canal de Na^+ también contribuyen al enlace de la TTX. El modelo estructural del canal de

Na^+ actual indica que la boca del canal de Na^+ tiene una forma de túnel en el que la TTX y STX bloquean al poro enlazándolo en muchos sitios de anclaje constituyendo el sitio 1 receptor del canal de Na^+ .

La granayotoxina, la veratridina, la aconitina y la batracotoxina, BTX, compiten por enlazar al sitio 2 del canal de Na^+ . Estas toxinas causan activación persistente del canal de Na^+ en el potencial de reposo de la membrana, al bloquear la inactivación del canal y cambiar la dependencia de voltaje de la activación del canal a potenciales de membrana más negativos. Estos efectos resultan de un enlace de alta afinidad de las toxinas a los estados activados de los canales de Na^+ y la consecuente estabilización de esos estados. Las toxinas que se unen al sitio 2 también alteran la selectividad iónica del canal de Na^+ . El sitio 2 es una región de la hélice α que está involucrada en la activación dependiente de voltaje y la inactivación; está alostéricamente asociada con el poro transmembranal del canal. Como estas toxinas son moléculas grandes sus efectos múltiples pueden resultar de su interacción con varios micrositos del canal de Na^+ .

Debido a la naturaleza lipofílica de las toxinas del sitio 2, estas toxinas pueden producir sus efectos cuando son agregadas al lado extracelular de la membrana donde se piensa que enlazan al canal en sitios enterrados en la matriz de la capa lipídica. Los anestésicos locales inhiben el enlace de las toxinas al sitio 2, esta inhibición resulta del acoplamiento alostérico del sitio de enlace a los anestésicos y el sitio 2. Las toxinas que enlazan al sitio 2 enlazan al canal de Na^+ activado, mientras que los anestésicos enlazan al canal de Na^+ inactivado ó en reposo. Enlazando preferencialmente los estados de afinidad baja para las toxinas

del sitio 2 los anestésicos estabilizan los estados no activados y reducen el enlace de la neurotoxina al sitio 2. Esto sugiere que el sitio de enlace de la BTX, y veratridina está físicamente cercano al sitio de enlace de los anestésicos locales y de la luz del poro del canal de Na^+ .

La BTX y la veratridina actúan sobre el canal de Na^+ y son herramientas para estudiar la función del canal. El flujo de Na^+ inducido por la veratridina es una prueba funcional para verificar si un compuesto dado inhibe las corrientes de Na^+ . El flujo de Na^+ puede ser medido usando ^{22}Na radioactivo ó ión ^{14}C guanidinio ó midiendo el consumo de oxígeno ó la toxicidad midiendo la liberación de lactato deshidrogenasa del citoplasma al medio externo.

Los anestésicos locales bloquean la propagación del impulso nervioso e interactúan con el canal de Na^+ de las neuronas. La acción de los anestésicos es compleja ya que es dependiente de uso y de frecuencia (la inhibición es potenciada por estímulos repetidos), propiedad que indica que el enlace es modulada por el estado del canal. Los anestésicos enlazan a sitios específicos localizados en el canal de Na^+ . La lidocaina es inefectiva cuando se aplica extracelular pero efectiva cuando se aplica intracelular. Estas drogas actúan principalmente sobre los canales de Na^+ abiertos a través de una vía hidrofílica que es ocluida y que se localiza en S6 del repetido IV.

La apertura del canal de Na^+ es disparada por la despolarización de la membrana que ejerce una fuerza eléctrica sobre los sensores de voltaje del canal. Las corrientes de Na^+ a través del canal pueden ser bloqueadas por las toxinas sin afectar las corrientes de compuerta sugiriendo que los elementos del canal activados dependientes de voltaje son diferentes de los de la región del poro. Las

regiones S4 transmembranales contienen los elementos de disparo. Los elementos de activación de la compuerta del canal de Na⁺ resultan del desplazamiento de residuos de aminoácidos cargados en respuesta a cambios en el potencial eléctrico transmembranal. Hay evidencias de mutagénesis que así lo indican. Por ejemplo, el reemplazo de residuos cargados positivamente en S4 resulta en la alteración de la activación del canal de Na⁺ en respuesta a cambios de voltaje.

Los canales de Na⁺ activados se hacen no conductores cuando se bloquean en el lado interno físicamente por una partícula de inactivación localizada en los repetidos III y IV. Se ha observado que enzimas proteolíticas bloquean dicha inactivación y los anticuerpos dirigidos contra esta región previenen la inactivación del canal de Na⁺. La secuencia de aminoácidos IFM (isoleucina-fenilalanina-metionina) en esta región es esencial para producir la inactivación del canal (Catterall, 2000).

1.3. Modelos experimentales para estudiar la liberación de los neurotransmisores

La liberación de neurotransmisores de terminales nerviosas se ha estudiado empleando diversas metodologías y modelos experimentales in vitro que incluyen el uso de sinaptosomas (terminales nerviosas aisladas), de rebanadas de tejido, el uso de cultivos primarios de neuronas ó de células de línea de neuroblastoma con fenotipo neuronal. In vivo se ha empleado la técnica de microdiálisis cerebral para estudiar la liberación de neurotransmisores. En el caso de las catecolaminas e

indolaminas se ha empleado la voltametría tanto in vivo como in vitro para medir la liberación de dichas monoaminas in situ.

Las preparaciones empleadas para estudiar la liberación de neurotransmisores abarcan desde el animal completo hasta las terminales nerviosas cerebrales aisladas. Para coleccionar el neurotransmisor liberado desde una región del cerebro de un animal vivo, libre en movimiento, se ha diseñado la microdiálisis cerebral. Esta técnica está basada en la implantación de una cánula de microdiálisis en el cerebro que una vez colocada en el núcleo de interés permite coleccionar muestras del fluido presente en el medio externo de las neuronas de dicho núcleo cerebral. La composición de neurotransmisores presente en el fluido varía de acuerdo a la cantidad de actividad de disparo neuronal que presenta cada grupo neuronal. En la microdiálisis se puede muestrear en el tiempo la variación del nivel de uno ó varios neurotransmisores en el núcleo en un periodo de tiempo que puede variar de minutos a días (Di Chiara, 1991).

Aunque los estudios de liberación in vivo son muy valiosos si se desea correlacionar los cambios en la liberación de un mensajero químico con un evento conductual, hay eventos que se pueden controlar y estudiar mejor en preparaciones celulares y subcelulares, pues sería imposible interpretarlos ó incluso detectarlos in vivo. Las preparaciones in vitro (de componentes celulares ó subcelulares) más frecuentemente usadas para estudios de liberación de mensajeros químicos son: las rebanadas de tejido provenientes de alguna región de interés previamente disecada (corteza cerebral, estriado, hipocampo, etc.); los cultivos de tejidos y las terminales nerviosas aisladas, mejor conocidas como sinaptosomas, que pueden aislarse del cerebro completo ó de alguna región

cerebral específica. Cada una de estas preparaciones tiene sus ventajas y sus desventajas y una u otra resulta adecuada según la pregunta que quiera contestarse. En cuanto a los sinaptosomas podría decirse que su obtención equivale a la disección del componente funcional de la liberación de los neurotransmisores (Sitges, 1987).

1.3.a. La preparación de terminales nerviosas cerebrales aisladas

Los sinaptosomas son terminales sinápticas aisladas, tienen un diámetro de 0.5-1 μm . Se aíslan de la fracción P2 que cosedimenta junto con las mitocondrias. Los sinaptosomas son viables durante algunas horas y representan el sistema subcelular más simple que retiene la maquinaria de recaptura, síntesis, almacenaje y exocitosis de neurotransmisores (Hollingsworth y col. 1985).

Se ha estudiado la ultraestructura de los sinaptosomas provenientes del estriado que contienen monoaminas (Kanerva y col. 1977). Se ha demostrado que los sinaptosomas son vesículas de membrana que se forman después de la destrucción y del resello de la membrana de las terminales sinápticas de las neuronas. Los sinaptosomas tienen en su interior, porciones de citoplasma, gran cantidad de mitocondrias, ribosomas, vesículas sinápticas, vacuolas y lisosomas, porciones de retículo endoplasmático y del aparato de Golgi, la densidad presináptica y elementos del citoesqueleto tales como microfilamentos, están rodeados por una membrana externa que delimita al sinaptosoma y son funcionalmente capaces de liberar neurotransmisor. Los sinaptosomas que guardan las catecolaminas y los sinaptosomas que guardan GABA forman dos

poblaciones sinaptosomales con características diferentes de sedimentación (Iversen y Snyder, 1968). Usando esta propiedad se han diseñado métodos para la separación de los sinaptosomas de GABA y sinaptosomas de catecolaminas del estriado (Kuhar y col. 1970). Se ha observado un aumento de la densidad de los sinaptosomas de estriado después de que acumulan DA administrada externamente (Fix y Rutledge, 1978), esto está de acuerdo con los hallazgos que muestran que el tratamiento con los inhibidores de la MAO (IMAO), clorgilina y pargilina aumentan la densidad de las vesículas sinápticas cuando están llenas de NA y DA al ser purificadas ya que inducen un incremento en la concentración de dichos neurotransmisores dentro de las vesículas sinápticas de entre 200 a 600% (Buu, 1989).

Usando la preparación sinaptosomal se han podido contestar varias preguntas fundamentales de la neurotransmisión como por ejemplo la naturaleza de los canales de Ca^{2+} que regulan la liberación de un neurotransmisor en particular (Turner y col. 1993; Sitges y Chiu, 1995a, 1995b; Carvalho y col. 1995), el papel de la fosforilación en la exocitosis (Sitges y Talamo, 1993, Sitges y col. 1998), y la caracterización de los mecanismos de acción de fármacos y toxinas que alteran la liberación de los neurotransmisores (Sitges y col. 1997, Sitges y Nekrassov, 1998, 1999; Sitges y col. 2000).

1.3.b. Liberación del neurotransmisor radioactivo precargado a los sinaptosomas

Desde hace varios años este mecanismo de inactivación por recaptura ha sido aprovechado para estudiar la liberación de los neurotransmisores clásicos ya

que es posible cargar la preparación elegida (sinaptosomas, rebanadas de tejido) con un neurotransmisor marcado radioactivamente para después seguir su liberación bajo distintas condiciones experimentales. Como los sitios de captura de alta afinidad están localizados en las membranas de las terminales nerviosas que normalmente lo sintetizan, almacenan y liberan, al someter una preparación heterogénea de sinaptosomas de cerebro a dicho neurotransmisor marcado radioactivamente, favorecemos su captura por los sinaptosomas que normalmente lo liberan.

1.3.c. Liberación del neurotransmisores endógenos de los sinaptosomas

En adición al método de seguir la liberación del neurotransmisor marcado radioactivamente previamente cargado a las terminales nerviosas aisladas cerebrales ampliamente utilizado, más recientemente algunos investigadores han empezado a seguir a los neurotransmisores endógenos liberados de los sinaptosomas empleando el sistema de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) para detectarlos (Freeman y col. 1993; Sitges y Nekrassov, 1999; Sitges y col. 2000). A este respecto es de interés mencionar que en nuestro laboratorio se ha desarrollado un método que permite medir por HPLC en las terminales nerviosas cerebrales aisladas las concentraciones internas y liberadas de varios neurotransmisores (tanto del tipo de las monoaminas como los aminoácidos neurotransmisores) simultáneamente.

1.3.d. Estrategias para despolarizar a los sinaptosomas

El tamaño promedio de los sinaptosomas es menor de media micra, lo que impide usar electrodos comunes para despolarizarlos, por lo que entre los métodos más usualmente utilizados para despolarizar a los sinaptosomas se encuentran 3 principalmente: 1) incubar los sinaptosomas en medios con una elevada concentración de KCl que induce una elevación de la concentración de K^+ externo, 2) mediante el uso de toxinas capaces de elevar la permeabilidad al Na^+ como la veratridina, que elevan la concentración intrasinaptosomal de Na^+ , 3) mediante agentes que bloquean la permeabilidad al K^+ de los sinaptosomas en el reposo. Al bloquear los canales de K^+ que están abiertos en el reposo se eleva la concentración de K^+ intrasinaptosomal y se despolariza la terminal. La fundamentación de dichos métodos se detalla a continuación. La despolarización inducida por K^+ alto y veratridina se explica si consideramos la ecuación de

Goldmann que relaciona el potencial de membrana (V_m) con las concentraciones y las permeabilidades relativas de los iones Na^+ , K^+ y Cl^- a través de la membrana.

La ecuación de Goldmann es la siguiente:

$$V_m = (RT/F) \ln \left[\frac{P_{K^+} [K^+]_o + P_{Na^+} [Na^+]_o + P_{Cl^-} [Cl^-]_i}{P_{K^+} [K^+]_i + P_{Na^+} [Na^+]_i + P_{Cl^-} [Cl^-]_o} \right]$$

En esta ecuación R es la constante de los gases, T es la temperatura en grados Kelvin y F es la constante de Faraday. P_{K^+} , P_{Na^+} , P_{Cl^-} , indican las permeabilidades relativas de los iones respectivos y las letras i, o, a la derecha de los signos de ([]) indican la concentración del ion dentro y fuera de la membrana respectivamente.

Como en el reposo la permeabilidad relativa al K^+ es muy alta, otra estrategia que nos permite despolarizar a los sinaptosomas es la disminución de la permeabilidad al K^+ con bloqueadores de los canales de K^+ tales como la 4-amino-

piridina y la noxius-toxina (Sitges y col. 1986). Según la ecuación de Goldman al disminuir la permeabilidad al K^+ también esperaríamos una alteración del potencial de membrana en el sentido de la despolarización.

APÉNDICE 2.

MONOAMINAS CEREBRALES

Las monoaminas cerebrales neurotransmisoras incluyen a las catecolaminas, dopamina (DA), noradrenalina (NA), adrenalina y a la indolamina serotonina.

La DA participa en circuitos de neuronas que se involucran en la generación del movimiento y es fundamental en la fisiología de los ganglios basales. La reducción de este neurotransmisor genera enfermedades tales como el Parkinson, y la sobreproducción de DA que conlleva a la sobre-estimulación de sus receptores está asociada con la esquizofrenia así como con desórdenes de movimiento ó distonias. El principal núcleo dopaminérgico del cerebro se encuentra en la sustancia nigra compacta. Este núcleo envía sus proyecciones principalmente al estriado donde se encuentra el mayor porcentaje de terminales nerviosas dopaminérgicas. El estriado es un núcleo que participa en la generación y selección de programas motores para iniciar el movimiento. La NA está principalmente concentrada en las neuronas noradrenérgicas del locus coeruleus y la serotonina en las neuronas serotoninérgicas de los núcleos del rafé.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Las neuronas catecolaminérgicas representan una pequeña fracción del total de neuronas del cerebro, hay aproximadamente 50,000 neuronas catecolaminérgicas en las ratas, de estas, aproximadamente 40,000 neuronas son dopaminérgicas y aproximadamente 10,000 neuronas son noradrenérgicas. A pesar del escaso número de neuronas catecolaminérgicas que hay en el cerebro, las grandes ramificaciones de sus axones les permiten influenciar a casi todo el cerebro. Así por ejemplo se ha estimado que una neurona dopaminérgica de la sustancia nigra tiene 50,000 botones de liberación de DA (Nicholls, 1994).

2.1. Síntesis de monoaminas cerebrales

La tirosina hidroxilasa (TH) es la enzima limitante en la síntesis de las monoaminas cerebrales. La TH es una proteína que se activa por fosforilación mediada por varias proteína-cinasas. La TH oxida a la tirosina y la transforma en L-dopa. La TH depende de la coenzima tetrahidrobiopterina y usa oxígeno como sustrato. La L-dopa a su vez es rápidamente descarboxilada por la L-dopa-descarboxilasa (DDC) generando DA. La DDC usa como cofactor al fosfato de piridoxal (Fig. 19). La NA se sintetiza a partir de la DA por la actividad de la DA- β -hidroxilasa, que es una enzima exclusiva de las neuronas noradrenérgicas, y la adrenalina se forma a partir de la NA en las neuronas adrenérgicas por metilación de la NA mediante la acción de otra enzima, la fenil-etanolamina-metil-transferasa. La serotonina se sintetiza a partir de la hidroxilación del triptofano por la acción de la triptofano-hidroxilasa en las terminales nerviosas serotoninérgicas (Kopin, 1985; Kuhar y col. 1999).

2.2. Degradación de las monoaminas cerebrales

La monoamino-oxidasa (MAO) es una enzima de primordial importancia en la degradación de las monoaminas cerebrales neurotransmisoras. La DA es catabolizada por la MAO para formar DOPAC (ácido dihidroxifenilacético). La enzima catecol-orto-metil-transferasa (COMT) que usa S-adenosil-metionina como cofactor también participa en la degradación de la DA. Esta enzima está ampliamente distribuida en el cerebro y puede actuar sobre catecolaminas extraneuronales. La COMT transfiere un grupo metilo de la S-adenosil-metionina a varios tipos de catecolaminas incluido el DOPAC. Una vía alternativa de degradación de la DA en el espacio extraneuronal es su degradación a 3-metil-DA (3-MT) mediada por la acción de la COMT. Tanto la 3-MT como el DOPAC, que son metabolitos de la DA originan finalmente HVA, el 3-MT forma HVA por la acción subsecuente de la MAO, mientras que el DOPAC origina HVA por la subsecuente acción de la COMT (Kopin, 1994; Kuhar y col. 1999) (Fig. 19).

El catabolismo de la NA por la MAO genera dihidroxifenilglicol (DHPG). La acción subsecuente de la COMT sobre el DHPG genera MHPG (metil-hidroxi-fenilglicol) ó ácido vanilil-mandélico. La serotonina es degradada por la acción de la MAO para generar el metabolito 5-HIAA (ácido 5-hidroxiindolacético) (Kopin, 1985; Kopin, 1994).

Entre las enzimas que participan en la degradación de las monoaminas cerebrales la MAO, que convierte a la DA en DOPAC, es de particular importancia para el presente trabajo, por lo que a continuación se mencionan algunas de sus

características moleculares, los subtipos de MAOs, así como aspectos relativos a los fármacos inhibidores de la misma.

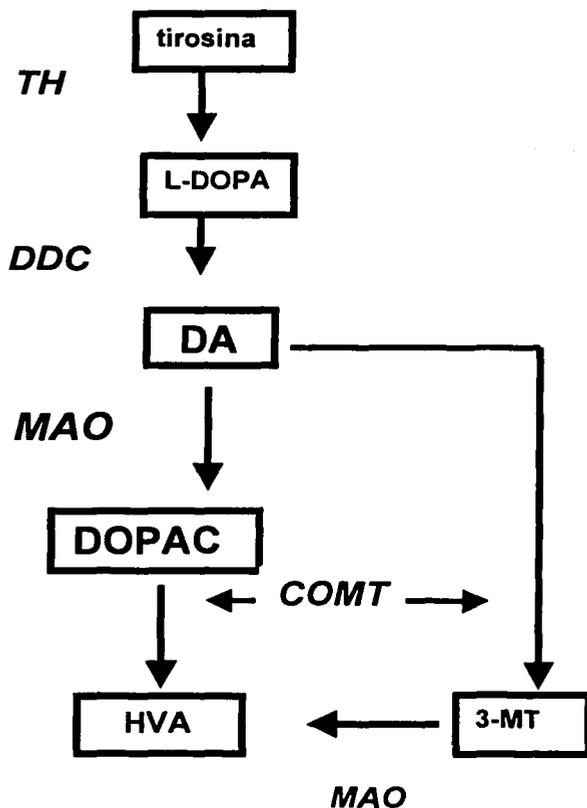


Fig. 19. Metabolismo de la DA. La síntesis de la DA y la degradación de la DA coexisten en la terminal nerviosa estriatal. La TH y la DOPA-descarboxilasa (DDC) son las enzimas que catalizan la síntesis de DA. La MAO y la COMT catalizan la degradación de la DA.

2.3. Inhibidores de la MAO

Como se mencionó, la MAO es la principal enzima en la degradación de las catecolaminas, incluyendo a la DA cerebral que está particularmente concentrada en las terminales nerviosas estriatales. Entre los compuestos con actividad farmacológica capaz de inhibir la actividad de la MAO cerebral se encuentran la clorgilina, la pargilina y el deprenil. Con base en la selectividad de sustrato y en su sensibilidad a los inhibidores se ha propuesto la existencia de dos formas de MAO denominadas A y B. La MAO-A tiene más afinidad por la clorgilina y la MAO-B tiene más afinidad por el deprenil. La pargilina es un inhibidor no selectivo que actúa sobre los dos tipos de MAOs. Las catecolaminas son los sustratos preferidos por la MAO-A y la feniletilamina para la MAO-B. Por ejemplo, en homogenados de estriado de ratas pretratadas crónicamente con clorgilina a bajas dosis, la concentración de DA aumenta y la de sus metabolitos, DOPAC y HVA, disminuye, pero la concentración de feniletilamina se mantiene constante (Paterson y col. 1991). En la corteza frontal de la rata la administración crónica de clorgilina también aumenta la concentración de monoaminas neurotransmisoras y reduce la de sus metabolitos (Twist y col. 1991).

2.4. Liberación de DOPAC

En la literatura existen evidencias que indican una modulación en los niveles de DOPAC que está mediada por diversos tipos de receptores de neurotransmisores. Estos incluyen los receptores de glutamato, de DA y de acetilcolina. Hay controversia en los mecanismos que explican cómo la

modulación de los receptores sobre las terminales presinápticas modifica la concentración de DOPAC que se libera de las terminales de neuronas dopaminérgicas. En ocasiones los efectos de los agonistas y antagonistas de receptores sobre las terminales dopaminérgicas son contradictorios y por lo tanto no son bien entendidos. A continuación haré una revisión de algunos de los hallazgos de los efectos de la modulación de dichos receptores sobre los niveles de DOPAC cerebrales. Por otra parte existen fármacos que afectan la neurotransmisión dopaminérgica por mecanismos distintos a la activación de receptores y que también modifican las concentraciones cerebrales de DOPAC. Como por ejemplo, fármacos que vacían a las vesículas sinápticas de DA ó que inhiben al DAT. Es importante señalar que las modificaciones en los niveles de DA que inducen diversos fármacos deben repercutir en los niveles de DOPAC.

El DOPAC que se detecta en el cerebro proviene fundamentalmente del metabolismo de la DA en las neuronas dopaminérgicas. Se ha propuesto que el DOPAC liberado del estriado se genera a partir de la DA citoplásmica y no de la DA que es liberada y recapturada (Zetterstrom y col. 1988).

Como se mencionó, el DOPAC es formado principalmente a partir de la acción de la MAO sobre la DA. En el estriado, la MAO A es la principal enzima responsable del catabolismo de la DA (Zúrnstein y col. 1981, Garrett y Soares, 1990). Los inhibidores de la MAO, IMAO, disminuyen la formación de DOPAC en el cerebro. Se ha estudiado el efecto de los IMAO sobre los metabolitos ácidos de la DA en el estriado y se ha observado que inducen una marcada disminución de DOPAC en las terminales sobre todo la clorgilina (Dyck y col. 1993).

Se ha determinado simultáneamente la tasa de formación de DA y DOPAC en varias áreas cerebrales y se ha observado que la tasa de formación de DOPAC a partir de DA es similar en los diferentes núcleos cerebrales ya que la relación DA/DOPAC es similar pero la concentración de DA y DOPAC varía en el cerebro dependiendo del grado de la innervación dopaminérgica de cada núcleo cerebral en particular (Westerink y Spaan, 1982).

Los agonistas de los receptores de glutamato al activar sus receptores específicos modifican indirectamente los niveles de DOPAC en el cerebro. Así por ejemplo se ha reportado que la administración de kainato mediante microdiálisis aumenta el nivel de DOPAC en el estriado (Kabuto y col. 1994). Sin embargo el ácido domoico, un aminoácido excitotóxico, aumenta la liberación de DA y disminuye los niveles de DOPAC en el estriado (Arias y col. 1998).

La fenciclidina un antagonista del receptor al NMDA e inhibidor del DAT también tiene efectos sobre los niveles de DOPAC. Se ha encontrado que la droga fenciclidina induce un incremento en el nivel de DOPAC en la corteza prefrontal pero no en el estriado (Umino y col. 1998) y se ha descrito que la fenciclidina incrementa el recambio de DA en el cerebro al incrementar la liberación de DA (Jentsch y col. 1997). Otros investigadores han mostrado que en las ratas la fenciclidina decrece el DOPAC en el cerebro en dosis de 1mg/kg (Chapman y col. 1990).

Los niveles de DOPAC se modifican con la edad y también posiblemente su transporte. Se ha encontrado que el nivel de flujo de DOPAC está disminuido en animales envejecidos (Gerhardt y Maloney, 1999), indicando una posible disminución ya sea de la DA que es el precursor del DOPAC ó una disminución de

su transporte. A este respecto, en neuronas catecolaminérgicas se ha observado que en el colículo superior el recambio de DA pero no de serotonina es menor en ratas viejas respecto a ratas jóvenes (Herrera y col. 1991) indicando una síntesis posiblemente menor y por tanto se infiere, menos formación y transporte de DOPAC y de otros metabolitos de la DA.

Varios fármacos con actividad sobre los receptores de DA alteran la concentración de DOPAC en el medio externo cerebral. Así por ejemplo el agonista dopaminérgico, bromocriptina, reduce los niveles de DOPAC inicialmente pero después de 1-4 h incluso eleva ligeramente los niveles de DOPAC (Jackson y col. 1990). El antagonista dopaminérgico, sulpiride, incrementa el nivel de DOPAC en el estriado (Hofmann y col. 1979). Los antipsicóticos, clozapina y haloperidol, que son antagonistas de diferentes tipos de receptores dopaminérgicos incrementan el metabolismo de la DA en las terminales elevando la concentración de DOPAC, ya que al inhibir la liberación de DA estimulan su degradación intracitoplasmática (Chrapusta y col. 1993). La risperidona un antagonista D2 y de serotonina 2 incrementa la concentración de DOPAC en el estriado (Grimm y See, 1998). Asimismo ratones carentes genéticamente del receptor de DA tipo D4 presentan niveles incrementados de DOPAC así como de DA en el estriado y estos ratones son supersensibles a los efectos de etanol, cocaína y metanfetamina (Rubinstein y col. 1997).

También se han descrito alteraciones en el nivel de DOPAC inducidas por agonistas del receptor de acetilcolina. Por ejemplo, la tacrina, un inhibidor de la acetilcolinesterasa, al elevar la concentración de acetilcolina provoca un incremento de los niveles externos de DOPAC en preparaciones de estriado,

efecto que es inhibido por la mecamilamina, antagonista del receptor nicotínico de acetilcolina (Warpman y col. 1996). Por otra parte se ha descrito que la nicotina, administrada de forma aguda al cerebro por una cánula de microdiálisis incrementa los niveles de DOPAC en el estriado (Leikola-Pelho y col. 1990). La nicotina aplicada a rebanadas de estriado también aumenta la liberación de DA espontánea y disminuye la liberación de DA evocada por K^+ alto; simultáneamente la nicotina aumenta la liberación de DOPAC en el estriado (Dluzen y Anderson, 1998).

Los antidepresivos, que inhiben la captura de DA también afectan los niveles de DOPAC. Por ejemplo, el antidepresivo, nomifensina, que es un inhibidor del DAT disminuye los niveles de DOPAC en el estriado al inhibir la captura de DA (Ayala y Jaffe, 1993).

La liberación de DA inducida por anfetamina decrece los niveles de DOPAC cerebral (Elverfors y Nissbrandt, 1992), esto es explicable, ya que la DA es sacada por la acción de la anfetamina ocasionando con esto que disminuya la DA citoplásmica disponible para el ataque de la MAO, provocando por tanto que se inhiba la formación intracitoplásmica de DOPAC. La cocaína, como la anfetamina, disminuye los niveles de DOPAC en el estriado, mientras que el GBR-12909, otro inhibidor de la captura de DA, incrementa al DOPAC en el cerebro (Karoum y col. 1994). La anfetamina administrada crónicamente también incrementa los niveles de DOPAC en el estriado (Dietze y Kuschinsky, 1994).

El precursor de la DA, la L-dopa, modifica los niveles de DOPAC en el cerebro. Se ha estudiado el efecto de la administración de altas dosis de L-dopa - carbidopa sobre los niveles de metabolitos de la DA, se ha observado que el

DOPAC se incrementa marcadamente (Mannisto y Tuomainen, 1991). En acuerdo con esta observación la oxidación de la DA por la MAO en el caudado-putamen de monos tratados con L-dopa, se incrementa y por tanto también se incrementa el nivel de DOPAC en el estriado (Di Monte y col. 1996).

Se ha estudiado el efecto del DOPAC sobre la liberación de DA en sinaptosomas de estriado. El DOPAC parece ejercer efectos negativos sobre la concentración de DA extra-estriatal, ya que se ha observado que la inyección de DOPAC intracerebral decrece los niveles de DA estriatal medida por microdiálisis y detección por HPLC acoplado a detección electroquímica 24 h después de la inyección de DOPAC (Shiekhattar y col. 1992).

Las drogas que sacan DA de su sitio de almacenaje incrementan el nivel de DOPAC cerebral. Por ejemplo, se ha observado que el ácido amfonélico inhibidor del VMAT incrementa el nivel de DOPAC externo en el estriado y en el núcleo acumbens, dicho compuesto inhibe la elevación de DOPAC inducida por clozapina y potencia la elevación de DOPAC inducida por haloperidol (Rivest y Marsden, 1992, Gudetzki y col. 1992). Finalmente, usando la microdiálisis cerebral también se ha mostrado que la administración de L-dopa induce un incremento de la liberación de DA pero no de la liberación de DOPAC en situaciones en las que las vesículas de DA están dañadas por tratamiento con bloqueadores del transporte vesicular de DA tales como reserpina y TBZ. Una segunda aplicación de L-dopa junto con reserpina disminuye la concentración de DOPAC pero no la aplicación de TBZ junto con L-dopa, indicando que los efectos de TBZ y reserpina no son idénticos y que el sitio de almacenamiento de DA es importante en los efectos de

la L-dopa y cambios en el almacenamiento inducen cambios en el metabolismo de la DA (Xu y col. 1998).

2.5. Transporte de DOPAC al medio externo

Los medios de transporte de DOPAC al exterior no son conocidos con precisión pero varias investigaciones han descubierto aspectos del mecanismo de su liberación. Un grupo de investigadores ha mostrado, empleando la detección de DOPAC por HPLC acoplado a la detección electroquímica, la existencia de las bombas de transporte activo de DOPAC y HVA en las terminales dopaminérgicas los cuales dependen de la existencia de un potencial de membrana a través de la terminal nerviosa ya que la despolarización con K^+ 120 mM induce una disminución del flujo de DOPAC (Miyamoto y col. 1991).

Este mismo grupo ha mostrado que la N-metil maleimida un inhibidor de la ATPasa de H^+ inhibe el transporte de DOPAC en neuronas de DA (Miyamoto y col. 1993), ya que la administración de este compuesto provoca una caída de los niveles de DOPAC expulsado de las terminales. Esto es aún novedoso puesto que a nuestro conocimiento no se ha estudiado desde entonces en detalle cuales son las moléculas proteicas involucradas en el transporte y simplemente se ha sugerido que las bombas de transporte de DOPAC son dependientes de ATP, y que hay una relación entre la ATPasa dependiente de H^+ y el transporte de DOPAC en las neuronas catecolaminérgicas.

Es de interés mencionar que este grupo de investigadores estudió los efectos del potencial de membrana sobre el flujo de 5-HIAA metabolito principal de la serotonina en varios núcleos del cerebro con innervación serotoninérgica,

como la corteza cerebral, el tálamo, el hipotálamo y el núcleo del rafé usando la técnica de HPLC para medir la serotonina y sus metabolitos y encuentran que el incremento de K^+ externo de 4-120 mM induce una caída de los niveles de 5-HIAA, decremento que es proporcional al incremento de K^+ externo. Postulan que el 5-HIAA es movido del interior de la neurona al espacio extracelular por un mecanismo de transporte activo acoplado al potencial de membrana del mismo tipo que se postula para el DOPAC (Miyamoto y col. 1990).

Otras evidencias que muestran que existe un transportador de aniones se basan en las observaciones que han demostrado que la droga probenecid un inhibidor del transportador de aniones en las neuronas induce la acumulación de DOPAC conjugado en el estriado, que es el ester que se forma por la reacción de 2 moléculas de DOPAC (Elchisak y col. 1977). Esta observación de la formación de DOPAC conjugado intraterminal indica que debido a las altas concentraciones que alcanza el DOPAC dentro de las terminales dopaminérgicas bajo estas condiciones de tratamiento con probenecid, es posible que se formen esteres (dímeros de DOPAC) dentro de dicha terminal.

Otra evidencia que sugiere la existencia de un transportador para el DOPAC proviene del uso de fármacos que son capaces de bloquear dicho transporte. Por ejemplo, se ha descubierto que el herbicida 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) inhibe el transporte de DOPAC e inhibe su recaptura (Elo y MacDonald, 1989). Este comportamiento es de esperarse si el DOPAC es extruido por un sistema de transporte específico en las neuronas dopaminérgicas.

Otra evidencia de la existencia de un sistema de transporte activo proviene del uso de drogas como glizipide, una sulfonilurea que induce un aumento los

niveles intracelulares de DOPAC y HVA en neuronas dopaminérgicas y los niveles de estos ácidos son decrecidos en el medio. Este hecho sugiere la presencia de un transporte de DOPAC sensible a sulfonilurea en las células PC12. Se ha mostrado que dicho transporte de DOPAC es unidireccional, dependiente de ATP, no es afectado por TTX ó ouabaina y es bloqueado por drogas que inhiben a proteínas de resistencia a multidroga. En ratas por microdiálisis se ha mostrado que el glizipide induce una disminución de los niveles externos de DOPAC también. Concluyeron que los metabolitos ácidos de la DA son secretados activamente de las células dopaminérgicas por un transportador no descrito previamente que tiene homología con el transportador de aniones (Lamensdorf y col. 2000a). Este mismo grupo ha mostrado que el glizipide incrementa la retención citoplásmica de DOPAC y HVA indicando un bloqueo de su transporte hacia el medio externo. También han descrito que la acumulación de DOPAC intracelular inducida por el glizipide inhibe la actividad de la TH por un mecanismo de inhibición por producto final (Lamensdorf y col. 2000b).

Se ha descrito que en la isquemia cerebral se produce una inhibición de la extrusión de DOPAC hacia afuera de las terminales ya que la isquemia induce un incremento de DOPAC en el tejido y un decremento de DOPAC en el estriado indicando que existe un sistema de transporte activo del metabolito, que involucra el uso de ATP cuya concentración cae marcadamente en la isquemia cerebral (Phebus y col. 1995). Otras investigaciones han descrito que la hipoxia induce cambios en el metabolismo de la DA en el cerebro en células en cultivo. Por otra parte se ha descubierto que la hipoxia induce incremento del DOPAC en el interior de las células dopaminérgicas cultivadas así como en el medio externo (Gao y col.

1999). Lo que corroboraría las observaciones hechas in vivo sobre el comportamiento del DOPAC en la anoxia.

Finalmente debemos mencionar que en la anoxia hay una disminución de la formación de DOPAC ya que la enzima MAO usa como sustrato el oxígeno para formar DOPAC a partir de DA.

El nivel de DOPAC cerebral se modifica en enfermedades neurológicas, por ejemplo, se ha mostrado alteraciones en los niveles de DOPAC en el ratón weaver; un ratón que sufre degeneración de la vía dopaminérgica, ya que hay una disminución de la cantidad de DOPAC cerebral respecto a la que se observa en los ratones silvestres (Reader y col. 1999). Por otra parte se ha descrito que en ratas diabéticas hay un nivel de DOPAC disminuido en el estriado debido a una reducción en la síntesis de DA estriatal que ocurre a causa de la diabetes (Kwok y col. 1985).

Por su parte en humanos se ha descubierto que en los parkinsónicos tratados con L-dopa los niveles de DOPAC están incrementados (Ahlskog y col. 1996a). Se ha observado que el 40% de los enfermos de Parkinson no tratados presentan niveles más elevados de DOPAC respecto a la población que no presenta dicha enfermedad (Ahlskog y col. 1996b). Estas investigaciones han mostrado que los niveles de DOPAC están incrementados en los pacientes parkinsónicos tratados con L- dopa (Ahlskog y col. 1996a).

APÉNDICE 3.

BLOQUEADORES DE LOS CANALES DE SODIO COMO NEUROPROTECTORES

Los neuroprotectores son compuestos farmacológicamente activos que previenen el daño celular inducido por agentes neurotóxicos sobre neuronas del sistema nervioso central (SNC). Varios investigadores han revisado los estudios de la neuroprotección en la isquemia cerebral y proponen que los bloqueadores de canales de Na⁺, pudieran ser neuroprotectores potencialmente efectivos (Taylor y Meldrum, 1995; Urenjak y Obrenovith, 1996; Taylor y Narashimhan, 1998).

3.1. Isquemia cerebral y epilepsia como modelos de daño neuronal

La mortalidad y los déficits neurológicos debidos al trauma cerebral, infarto cardiaco ó asfixia perinatal tienen gran efecto sobre la salud pública. El infarto cerebral es la tercera causa más común de muerte en EU, la primera de deshabilitación seria y causa de la mayoría de las hospitalizaciones neurológicas (Urenjak y Obrenovitch, 1996). Se ha estudiado la isquemia cerebral debida a infartos e investigado drogas para combatir los efectos de la isquemia, sin embargo aún no se logra una droga efectiva capaz de proteger a las neuronas de la isquemia cerebral. Existen varias estrategias terapéuticas contra el trauma cerebral tales como el uso de drogas que atrapan radicales libres, drogas que previenen la toxicidad mediada por glutamato, drogas que preservan la

homeostasis de Ca^{2+} y drogas que mejoran la circulación cerebral. Por el contrario la modulación farmacológica de los canales de Na^+ sensibles a voltaje para tratar el trauma cerebral ha recibido poca atención.

Los canales de Na^+ sensibles a voltaje son responsables para iniciar y conducir el potencial de acción. Los canales de Na^+ afectan la duración y la frecuencia del disparo neuronal repetido. En las terminales nerviosas los canales de Na^+ pueden potencialmente influir en la liberación de neurotransmisor de las vesículas presinápticas. El propósito de esta sección es demostrar que la modulación hacia abajo de los canales de Na^+ es una estrategia racional y efectiva para proteger al tejido nervioso en condiciones asociadas con un déficit de la irrigación sanguínea (isquemia cerebral) ó en casos de actividad cerebral desmesurada como en el caso de la epilepsia.

En el cerebro mucha de la energía se gasta en mantener los gradientes de Na^+ y K^+ a través de la membrana neuronal (Erecinska y Dagani, 1990; Erecinska y col. 1991). Durante la isquemia ó la hiperexcitabilidad neuronal hay un marcado influjo de Na^+ hacia el interior de las neuronas que es neurotóxico directa e indirectamente.

Una definición extendida de daño cerebral incluiría cualquier situación en donde la demanda de energía cerebral es mayor que su suministro. Por ejemplo, la isquemia cerebral que implica reducción del flujo sanguíneo, la hipoglicemia, la hipotensión, las convulsiones sostenidas, la deficiencia en la síntesis mitocondrial de ATP, todas estas condiciones causan daño neuronal.

La cerebroprotección por consiguiente no sólo se restringe a mejorar la reperusión local sino que también requiere disminuir la demanda metabólica.

Como la mayor parte de la energía que consume el cerebro se usa para mantener los gradientes iónicos a través de las membranas excitables, una manera efectiva de reducir la demanda energética es disminuyendo la activación de los canales de Na^+ .

La tasa metabólica cerebral de consumo de oxígeno y de consumo de glucosa es la suma del metabolismo residual y el metabolismo de activación. El metabolismo residual sustenta a los procesos celulares basales que persisten aún cuando se elimine la actividad funcional. El metabolismo de activación depende del estado funcional del cerebro y varía con la actividad sináptica y eléctrica del mismo (Astrup, 1982).

La actividad metabólica cerebral humana se puede medir empleando tomografía de emisión de positrones (con deoxiglucosa marcada con ^{18}F). Con esta técnica se ha observado que la tasa metabólica cerebral de consumo de oxígeno aumenta 3 veces con los disparos neuronales sincrónicos de las convulsiones epilépticas (Sokoloff, 1993)

La mayor parte de la demanda energética acoplada a la actividad funcional del cerebro se usa para el transporte iónico. La principal función del SNC es la generación y transmisión de los potenciales de acción. Estos potenciales de acción no consumen energía por sí mismos, pues son consecuencias eléctricas pasivas del movimiento de Na^+ de afuera hacia adentro y de K^+ de adentro hacia fuera cuando la membrana es despolarizada. Lo que consume energía metabólica es la restauración de los gradientes iónicos para regresar a la membrana al potencial de reposo. (Erecinska y Silver, 1989; Sokoloff, 1993).

3.2. La isquemia cerebral y los canales de Na⁺

Los canales de Na⁺ dependientes de voltaje son esenciales para la actividad del SNC ya que la apertura de dichos canales induce la despolarización neuronal y genera el potencial de acción.

Cuando se considera la cerebro-protección, la isquemia es un desbalance entre el suministro y la demanda de energía de las neuronas. La reducción de la tasa metabólica por barbitúricos ó la hipotermia es por tanto responsable probable de sus efectos neuroprotectores en la isquemia cerebral (Kass y col. 1992; Dietrich y col. 1993) . La modulación hacia abajo de los canales de Na⁺ sensibles a voltaje es una manera efectiva de reducir una parte de la demanda de energía a causa de que gran parte de la energía consumida en el cerebro es usada para el mantenimiento de los gradientes iónicos a través de las membranas celulares aún cuando la actividad sináptica es abolida (Astrup y col. 1982; Erecinska y Silver, 1989).

Está bien documentado que un altísimo porcentaje de la demanda de energía acoplada a la actividad funcional del cerebro es usada para el transporte de iones (Ames y col. 1992). Por ejemplo, el mecanismo primario protector de los barbitúricos se ha atribuido a su habilidad para reducir la tasa metabólica. Se ha reportado que la disminución en el consumo de glucosa que producen los barbitúricos resulta en una reducción notable de la actividad eléctrica registrada del EEG (Astrup y col. 1982).

3.3. Mecanismo de acoplamiento del metabolismo energético con el transporte iónico transmembranal

El consumo de glucosa acoplado a la actividad neuronal se usa principalmente para el mantenimiento de los gradientes iónicos transmembranales. Consistentemente, la estimulación eléctrica de las neuronas aumenta la captura de 2-desoxiglucosa de manera directamente proporcional a su frecuencia de disparo y de manera sensible al inhibidor de la ATPasa de Na^+/K^+ , ouabaina (Mata y col. 1980).

En las terminales nerviosas cerebrales aisladas el consumo basal de oxígeno se eleva más de 2 veces por la veratridina de manera sensible a TTX y a ouabaina, lo que indica que la estimulación de la respiración y el aumento del recambio de ATP que induce la veratridina en sinaptosomas están directamente acoplados al influjo de Na^+ (Erecinska y Dagani, 1990; Gleitz y col. 1993).

La entrada sostenida de Na^+ que induce la veratridina a altas concentraciones incluso destruye rápidamente (30 min) a las neuronas de hipocampo de rata cultivadas en medios carentes de Ca^{2+} , ya que el remplazo del Na^+ externo por el catión colina protege a dichas neuronas de la muerte que induce la veratridina (Rothman, 1985).

En un estudio reciente se ha mostrado que el bloqueo de los canales de Na^+ dependientes de voltaje retarda la despolarización anóxica inducida por arresto circulatorio en la corteza cerebral de la rata (Xie y col. 1995).

En neuronas del hipocampo, la anoxia severa produce aumentos en el Na^+ y el Ca^{2+} internos, así como hinchamiento y formación de vacuolas intracelulares en las neuronas. Esta toxicidad inducida por la anoxia se debe al influjo de Na^+ ya

que la remoción del Ca^{2+} externo bloquea los incrementos de Ca^{2+} internos en las neuronas pero no previene el hinchamiento y el daño neuronal (Friedman y Haddad 1993, 1994a, 1994b). En neuronas de los ganglios basales (estriado) en cultivo también se ha reportado una contribución del influjo de Na^+ al daño neuronal producido por anoxia-aglicemia (Goldberg y col. 1986).

En resumen, la entrada excesiva de Na^+ a las neuronas inducida tanto por la veratridina como por la anoxia parece estar directamente relacionada con la inducción del daño neuronal. Los ejemplos anteriores son consistentes con la hipótesis de que los fármacos capaces de producir una modulación negativa de los canales de Na^+ son cerebroprotectores potenciales.

3.4. Carga intracelular de Na^+ y homeostasis del Ca^{2+}

La hipótesis de sobrecarga de Ca^{2+} (incremento en el Ca^{2+} libre intracelular que dispara una cascada de eventos dañinos a la célula vía la activación de proteasas, fosfolipasas y endonucleasas) es una hipótesis de las causas del daño neuronal (Choi y col. 1995). Sin embargo, la neurotoxicidad inducida por influjo excesivo de Na^+ , como el provocado por veratridina ó anoxia, puede incluir un componente de Ca^{2+} causado por la entrada sostenida de Na^+ . Los canales de Ca^{2+} serían rutas obvias de entrada de Ca^{2+} después de la entrada de Na^+ a causa de que se despolariza la membrana. En este sentido el influjo de Ca^{2+} en condiciones de anoxia es parcialmente dependiente de activación de canales de Ca^{2+} tipo L y N (Madden y col. 1990). Sin embargo el influjo de Ca^{2+} inducido por veratridina es dependiente en menor grado de bloqueadores de canales de Ca^{2+} , indicando que el Ca^{2+} entra a la neurona por otro mecanismo. Bajo condiciones

basales el intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ contribuye al mantenimiento de la concentración baja de Ca^{2+} interno extruyendo 1 Ca^{2+} por 3 Na^+ , un proceso manejado por el gradiente de Na^+ . La despolarización puede revertir este mecanismo transportando al Na^+ fuera y al Ca^{2+} hacia adentro. La carga de Ca^{2+} subsecuente a la reversión del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ha sido documentada para el corazón anóxico y el nervio óptico (Haigney y col. 1992; Stys y col. 1992). La reversión del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ha sido demostrada en neuronas y en sinaptosomas en situaciones que mimetizan la hipoxia y la disminución de producción de ATP (Dagani y col. 1990; Wakade y col. 1993).

3.5. Carga intracelular de Na^+ y liberación de glutamato

La liberación excesiva de glutamato y/o la sobre-estimulación de los receptores glutamatérgicos particularmente del tipo ionotrópico se ha propuesto que juegan un papel principal en el daño neuronal. La concentración de glutamato dentro de las neuronas bajo condiciones de reposo es 10,000 veces mayor que en el medio extracelular. Este gradiente de glutamato es mantenido por los transportadores de dicho aminoácido excitatorio que se encuentran en la porción presináptica de las neuronas y en las células gliales.

Los transportadores de neurotransmisores, incluyendo al transportador de glutamato, son estrictamente dependientes del gradiente de Na^+ . El aumento en la concentración interna de Na^+ inducido por veratridina ó por anoxia debe resultar en un funcionamiento reverso del transportador de glutamato (Nicholls y Attwell, 1990). El bloqueo de la entrada de Na^+ al reducir la liberación de glutamato también reduciría la excitotoxicidad neuronal mediada por liberación de glutamato.

Durante la anoxia la carga de Na^+ intracelular excesiva puede inhibir la glucólisis ya que la piruvato-cinasa es inhibida por altas concentraciones de Na^+ . Consistentemente se ha encontrado que la TTX aumenta la tasa de glucólisis anaerobia y protege de la marcada reducción de la síntesis de ATP anaerobia que induce el tratamiento con veratridina en condiciones de anoxia (Gleitz y col. 1993).

El bloqueo selectivo de los canales de Na^+ por TTX, claramente incrementa la tolerancia anóxica de las neuronas. En el hipocampo de rata, la TTX al bloquear al canal de Na^+ reduce la caída en las concentraciones de ATP durante la anoxia por 5-10 min y mejora la recuperación de la actividad de disparo de las neuronas piramidales del hipocampo. En neuronas piramidales del hipocampo, la TTX previene del daño producido por anoxia y aglicemia (Boening y col. 1989; Weber y Taylor, 1994) y en neuronas de corteza cerebral, atenúa la despolarización de la capa 2 y 3 de neuronas piramidales de la corteza cerebral que se produce en la anoxia cerebral (Rosen y col. 1994). La TTX protege contra el daño neuronal en el hipocampo inducido por exposición de las neuronas a hipoglicemia ó al cianuro (CN^-) que inhibe la respiración neuronal (Tasker y col. 1992; Vornov y col. 1994). La TTX reduce la muerte en neuronas corticales privadas de oxígeno y glucosa durante 40-50 min. En el nervio óptico la TTX mejora la recuperación funcional de las neuronas que ocurre post-anoxia cerebral (Goldberg y Choi, 1993; Lynch y col. 1995). El bloqueo de los canales de Na^+ dependientes de voltaje disminuye la demanda de energía de las neuronas. La TTX en el hipocampo de rata reduce de manera dependiente de dosis la muerte neuronal que se produce después de la isquemia cerebral en ratas y en gerbos (Lysko y col. 1994).

3.6. Vinpocetina

La vinpocetina se usa en el tratamiento de enfermedades cerebrovasculares leves acompañadas por hipoxia e isquemia (Hadjiev y Yancheva, 1976; Otomo y col. 1985) y se vende como vasodilatador periférico para el tratamiento de la demencia senil. En modelos animales experimentales, la vinpocetina incrementa la tolerancia a la anoxia (Biro y col. 1976; King y col. 1987), inhibe la muerte neuronal retardada subsecuente a isquemia cerebral global y reduce el tamaño de la lesión en modelos de trauma cerebral (Rischke y Krieglstein, 1990). La vinpocetina incrementa la sobrevivencia de animales expuestos a una atmósfera de nitrógeno y carente de oxígeno (King y col. 1987). En isquemia global la vinpocetina administrada 15 min antes ó inmediatamente después de la hipoxia cerebral redujo la muerte neuronal en el hipocampo de la rata (Sauer y col. 1988; Rischke y Krieglstein, 1990). La administración de altas dosis de vinpocetina son menos efectivas para el tratamiento de la isquemia cerebral ya que la presión arterial es disminuida (Rischke y Krieglstein, 1990). En la oclusión de la arteria cerebral media inducida experimentalmente la vinpocetina reduce el volúmen de infarto cortical (Rischke y Krieglstein, 1990). La vinpocetina muestra actividad anticonvulsiva si es preadministrada en ratones tratados con metrazol agente usado para inducir convulsiones epilépticas (Palosi y Szporny, 1976). In vitro la vinpocetina potencia la actividad neuroprotectora de la adenosina en contra de la hipoxia inducida por cianuro de sodio, NaCN, en cultivos neuronales, sugiriendo que el efecto neuroprotector de la vinpocetina puede ser mediado por adenosina (Krieglstein y Rischke, 1991).

El mecanismo cerebroprotector de la vinpocetina no está resuelto, puede resultar de sus efectos de aumento del flujo cerebrovascular (Bencsath y col. 1976) y por una acción directa (Rischke y Krieglstein, 1990). La vinpocetina tiene una gran cantidad de blancos, tiene una actividad antagonista sobre los canales de Ca^{2+} a 100 μM (Kaneko y col. 1990), interacciona con los receptores de glutamato ya que a 100 μM , la vinpocetina desplaza el enlace de [^3H]MK-801 en membranas cerebrales de cobayo (Kaneko y col. 1991; Kiss y col. 1991), y proporciona protección a las neuronas contra excitotoxinas de tipo glutamatérgico (Miyamoto y col. 1989; Erdo y col. 1990; Kiss y col. 1991). Todas estas acciones ocurren a altas concentraciones y a bajas concentraciones no presenta estos efectos. Recientemente se ha sugerido que los canales de Na^+ dependientes de voltaje pueden ser el blanco predominante de la vinpocetina a las concentraciones terapéuticas (Lakics y col. 1995b). La vinpocetina inhibe la muerte neuronal en cultivos primarios de corteza cerebral de rata inducida por veratridina en una manera dependiente de concentración y bloquea el efecto de la veratridina totalmente. Este efecto neuroprotector de la vinpocetina es dos ordenes de magnitud mayor que la potencia de la fenitoina contra la neurotoxicidad de la veratridina (Lakics y col. 1995a, 1995b). Las propiedades de la vinpocetina se describen a continuación de manera detallada.

3.6.a. La vinpocetina y la isquemia cerebral

Hay evidencias experimentales que muestran que la isquemia cerebral es una de las principales causas de daño cerebral ya que induce la muerte neuronal,

y existen experimentos que sugieren que la vinpocetina protege contra la muerte neuronal inducida por la isquemia cerebral. La vinpocetina mejora el flujo cerebral y la utilización de glucosa en animales 7 días post-isquemia cerebral inducida experimentalmente (Rischke y Krieglstein, 1990). La vinpocetina protege contra el daño causado por la isquemia cerebral experimental ya que la vinpocetina disminuye la muerte neuronal inducida por esta condición (Rischke y Krieglstein, 1991). Asimismo, la vinpocetina previene el daño neuronal en el hipocampo de rata inducido por la isquemia cerebral que provoca la liberación de glutamato en el hipocampo (Araki y col. 1990a, 1990b, 1991b). La vinpocetina protege del daño neuronal en el hipocampo inducido por isquemia cerebral, en el gerbo y en ratones (Iino y col. 1992; Sauer y col. 1988). A este respecto se ha hecho una revisión de los datos clínicos de los efectos de la terapia de la vinpocetina en el tratamiento de la isquemia cerebral inducida por trauma cerebral y se ha encontrado que la vinpocetina puede ser neuroprotectora en la isquemia cerebral en pacientes que han sufrido derrame cerebral (Bereczki y Fekete, 1999). La vinpocetina aumenta la utilización de glucosa cerebral y disminuye la formación del edema cerebral después de la obstrucción de la arteria cerebral media (Borzeix y Cahn, 1984; Araki y col. 1992c). La vinpocetina protege de la disminución en el "binding" de [³H]AMPC que produce la isquemia cerebral en cerebro del gerbo (Araki y col. 1992a, 1992b; Araki y col. 1993b).

El compuesto VA045, un derivado de la vinpocetina, atenúa el daño inducido por la hipoxia y por la adición de glutamato a las neuronas de la corteza cerebral de la rata (Uchiyama y col. 1996). Por su parte, en otras investigaciones se ha descrito los efectos protectores de la vinpocetina sobre las consecuencias

letales de la hipoxia en el ratón ya que el pretratamiento con vinpocetina retarda la muerte de los ratones sometidos a anoxia (King y col. 1987).

La vinpocetina protege contra la desaparición de la señal eléctrica del EEG en pacientes que han sufrido de enfermedad cerebrovascular crónica, incrementa la magnitud bioeléctrica del EEG, mejora la amplitud del ritmo α , incrementa la frecuencia del ritmo β cerebral e induce un incremento en el espectro de potencia del EEG y decrece la cantidad de ondas θ cerebrales en dichos pacientes (Martucci y col. 1984).

La vinpocetina no modifica las respuestas eléctricas transcallosas (corriente conducida a través del cuerpo calloso) en ratas indicando que no afecta la comunicación interhemisférica cerebral (Okuyama y Aihara, 1988). El derivado de la vinpocetina, VAO45, protege contra las alteraciones tales como la desaparición y la disminución de la señal eléctrica en el EEG inducida por el daño cerebral que se produce en la vejez, asimismo incrementa el flujo sanguíneo cerebral y también mejora la ejecución de la prueba de evitación pasiva en ratas que es una prueba de memoria lo que indica que dicho derivado de la vinpocetina mejora la memoria (Okuyama y col. 1994).

3.6.b. La vinpocetina y los canales de Na^+ , Ca^{2+} y K^+

Como se mencionó en la sección 1.2.c., la veratridina es una toxina que aumenta la permeabilidad del canal de Na^+ , al impedir su inactivación; la vinpocetina protege a las neuronas de la corteza cerebral en cultivo in vitro de la muerte inducida por una alta concentración de veratridina (100 μM). La vinpocetina

protege contra los efectos neurotóxicos de la veratridina en las neuronas de la corteza cerebral de la rata en cultivo por lo que este efecto se ha asociado con su capacidad para bloquear a los canales de Na^+ (Erdo y col. 1990; Lakics y col. 1995a, 1995b; Erdo y col. 1996). Por otra parte la vinpocetina inhibe el aumento en el Na^+ interno inducido por veratridina en sinaptosomas (Tretter y Adam-Vizi, 1998; Sitges y Nekrassov, 1998; Sitges y Nekrassov, 1999).

Existen evidencias experimentales que muestran que la vinpocetina es un bloqueador de los canales de Na^+ dependientes de voltaje en todas las células que expresan dichos canales aunque no sean neuronas. Por ejemplo, La vinpocetina inhibe la activación de la corriente de Na^+ en miocitos cardiacos inducida por veratridina (Wei y col. 1997b). La vinpocetina resulta tan potente como la fenitoina (antiepiléptico) para bloquear los canales de Na^+ en neuronas corticales de rata en cultivo (Molnar y Erdo, 1995). La vinpocetina y su análogo el vincanol inhiben la unión de [^3H]Saxitoxina a los canales de Na^+ de membranas neuronales y protegen a las neuronas en cultivo contra la neurotoxicidad inducida con veratridina a altas concentraciones (Erdo y col. 1996).

La veratridina induce la liberación de varios neurotransmisores al inducir la activación de los canales de Na^+ , inducir la entrada de Na^+ al interior de la terminal nerviosa y provocar la liberación de neurotransmisores por reversión del funcionamiento de sus transportadores, en particular propicia la liberación de purinas en preparaciones de sinaptosomas de hipotálamo. La vinpocetina también inhibe la liberación de los neurotransmisores purinérgicos (adenosina) que induce la veratridina en los sinaptosomas de esta región cerebral (Fredholm y col. 1983).

La vinpocetina inhibe la liberación de los neurotransmisores excitadores glutamato y aspartato inducida por 20 μM de veratridina en terminales nerviosas aisladas del estriado de la rata (Sitges y Nekrassov, 1999). Se ha estudiado el efecto de la vinpocetina sobre la liberación de neurotransmisores inducida por K^+ alto en ratas viejas y se ha mostrado que la vinpocetina mejora la liberación de DA en ratas viejas, esta mejoría la logra al evitar la peroxidación y mejorar el acoplamiento entre el estímulo y la liberación de neurotransmisor por exocitosis en la terminal sináptica dopaminérgica y al mejorar la actividad de la ATPasa que saca Ca^{2+} de las neuronas que está disminuida en su actividad en la vejez (Wustmann y col. 1990).

Como con la aplicación de veratridina, durante la isquemia cerebral también aumenta la concentración interna de Na^+ dentro de las terminales y por consiguiente puede incrementar la liberación de glutamato, que es un neurotransmisor neurotóxico. El aumento de Na^+ interno en las terminales nerviosas reduce la recaptura de glutamato y propicia la reversión del transportador de glutamato incrementando su liberación (Nicholls, 1989).

Por otra parte, a concentraciones mayores que las que bloquean al canal de Na^+ , la vinpocetina también se ha reportado que inhibe las respuestas mediadas por los canales de Ca^{2+} y de K^+ ; por ejemplo, La vinpocetina inhibe la activación de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje a concentraciones elevadas (VSCC) (Kaneko y col. 1990). La vinpocetina es capaz de bloquear una corriente de K^+ rectificada-retardada con más potencia que las corrientes de Ca^{2+} de alto umbral (Bukanova y Sointseva, 1998). El compuesto GTP cíclico, un nucleótido, imita el efecto potenciante de la vinpocetina sobre la corriente A (I_A , corriente de

canal de K^+) de alto umbral en las neuronas de molusco indicando similitud de efectos con la vinpocetina en esta preparación (Solntseva y Bukanova, 1999). La vinpocetina en las células de línea de la hipófisis GH3 incrementa la amplitud de la corriente de los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} , estimulando un incremento en la frecuencia de apertura del canal de $K^+(Ca^{2+})$, al interaccionar la vinpocetina directamente con el canal y cambiar su umbral de voltaje de activación a valores más bajos. De este modo la vinpocetina antagoniza los incrementos en la frecuencia de disparo inducidos por la aplicación de la hormona liberadora de tirotrópina, TRH (Wu y col. 2001). Se han efectuado estudios en neuronas de moluscos sobre los efectos de la vinpocetina sobre los canales de K^+ , y se ha encontrado que la vinpocetina induce incremento en la corriente transitoria de K^+ (30%), mientras que la corriente de K^+ producida por el canal de K^+ rectificador retardado fue inhibida (20%) y la corriente de K^+ dependiente de Ca^{2+} fue inhibida 45% (Solntseva y col. 2001).

3.6.c. La vinpocetina como un agente neuroprotector de las respuestas asociadas a la activación de los receptores de glutamato

La vinpocetina potencia la acción neuroprotectora de agentes que basan su efecto neuroprotector en su capacidad de bloquear al canal del receptor al NMDA y al adenosina (Krieglstein y Rischke, 1991).

Si bien la vinpocetina no protege directamente contra la activación de los receptores NMDA, al parecer bloquea los efectos excitotóxicos posteriores a dicha activación. Por ejemplo, la vinpocetina previene de la muerte neuronal retardada en el hipocampo del gerbo inducida por el agonista de receptores de glutamato,

NMDA (Araki y Kogure, 1989). La vinpocetina protege a las neuronas de la corteza cerebral obtenidas a partir de cultivo primario, del daño excitotóxico debido a la incubación con altas concentraciones de glutamato, NMDA, AMPA y quisqualato (Erdo y col. 1990). La vinpocetina actúa como un agente antioxidante en la neurotoxicidad inducida por el glutamato en la línea celular N18-RE-105 (Miyamoto y col. 1989).

En ovocitos que expresan al receptor NMDA cerebral, cuya expresión es inducida después de inyectar el RNAm de dicho receptor en el citoplasma del ovocito, se ha observado que la vinpocetina a altas concentraciones (100 μM) bloquea la función del receptor NMDA al bloquear el enlace de [^3H]MK-801 a los ovocitos (Kaneko y col. 1991). Quizá este efecto de desplazar a MK-801 de su sitio de enlace es debido más a la inhibición del enlace de MK-801 a los canales de Na^+ que a la competición de la unión a los receptores NMDA, ya que Sitges y col. (2000), han mostrado que el compuesto MK-801 se comporta como un bloqueador de canal de Na^+ en adición a su bien caracterizada capacidad de ser un antagonista del receptor NMDA ya que inhibe los incrementos de Na^+ intracelulares inducidos por veratridina en sinaptosomas del estriado.

La vinpocetina a concentración de 40 μM en rebanadas de estriado de la rata antagoniza las respuestas del receptor de glutamato del tipo AMPA/Quisqualato ya que se ha mostrado que es capaz de inhibir el enlace de [^3H]AMPA a preparaciones de membranas cerebrales así como la liberación de DA y de [^3H]Acetilcolina inducida por AMPA y quisqualato que son agonistas de dichos receptores de glutamato (Kiss y col. 1991), esta inhibición de la liberación

de DA y acetilcolina que es bloqueada por vinpocetina, también podría contribuir a la capacidad neuroprotectora de la vinpocetina.

3.6.d. La vinpocetina y la memoria.

La vinpocetina mejora la ejecución en pruebas de memoria en ratas tratadas previamente con agentes que dañan la memoria como la escopolamina, un antagonista colinérgico ó por inducción de hipoxia, en la prueba de evitación pasiva en la rata (De Noble y col. 1986; De Noble y col. 1987). Adicionalmente se ha observado que la vinpocetina atenua los daños cognitivos inducidos por el coagonista del receptor de GABA-A, flunitrazepam, que incrementa la permeabilidad al Cl^- disminuyendo el aprendizaje (Bhatti y Hindmarch, 1987).

Otras investigaciones han estudiado los efectos de la vinpocetina sobre la ejecución en pruebas de memoria en pacientes afectados con la enfermedad cerebrovascular crónica y han observado que mejora la memoria y la actividad motora orientada a estímulos de dichos pacientes (Casale y col. 1984).

Otras investigaciones han mostrado que la vinpocetina incrementa la formación de LTP en el hipocampo de animales (Ishihara y col. 1989). Por otra parte también se ha mostrado un efecto positivo de la vinpocetina sobre la LTP en el giro dentado del hipocampo de la rata al incrementarlo (Molnar y Gaal, 1992).

La vinpocetina restaura la potenciación de largo plazo (LTP) hipocampal que se produce después de lesión del septum, que es un núcleo colinérgico del cerebro (Molnar y col. 1994). Por el contrario la vinpocetina a elevadas concentraciones (100 μ M) se ha reportado que es un agente psicogeriatrico que bloquea la potenciación sináptica del hipocampo (Olpe y col. 1982).

La vinpocetina disminuye el daño del aprendizaje provocado por inducción de "kindling" cortical por estimulación eléctrica en ratas (Becker y Grecksch, 1995).

3.6.e. Los efectos de la vinpocetina sobre el flujo cerebral

El derivado de la vinpocetina (VA05) induce relajación sobre la actividad muscular de la arteria cerebral vasilar del conejo (Yamada y col. 1995a). La vinpocetina también tiene efectos relajantes sobre contracción muscular inducida por el péptido vasoconstrictor endotelina 1, en la arteria coronaria del corazón. Se ha propuesto que esta capacidad de la vinpocetina de relajar al músculo arterial junto con su capacidad de bloquear los canales de Na^+ cardiacos puede ser la responsable de sus efectos benéficos en algunas patologías cardiacas así como en la mejor circulación cerebral (Lillestll y col. 1998). La vinpocetina también induce un incremento de los niveles de GMPc intracelulares en las células del músculo liso al inhibir a la fosfodiesterasa muscular responsable de degradar el GMPc (Hagiwara y col. 1984) y es posible que este sea el medio principal por el que induce la relajación en las células musculares endoteliales de los vasos sanguíneos.

La vinpocetina tiene un efecto específico sobre la actividad muscular de las arterias cerebrales ya que induce relajación muscular al inhibir la contracción del músculo liso de las venas y las arterias (Miyata y col. 1993). Al inducir esta relajación, la vinpocetina incrementa el flujo cerebral sanguíneo (Sugawa y col. 1990). El VA05, también incrementa la circulación cerebral en perros anestesiados (Imamoto y col. 1984; Yamada y col. 1995b). La vinpocetina disminuye la

resistencia en el flujo sanguíneo cerebral en pacientes con enfermedad cerebrovascular (Miyazaki, 1995), e incrementa el flujo cerebral en voluntarios sanos (Lim y col. 1980). La vinpocetina incrementa el flujo cerebral y las funciones mentales de pacientes con demencia debida a infartos cerebrales múltiples y disminuye el número de zonas con isquemia cerebral (Hagstadius y col. 1984).

En 15 pacientes con derrame isquémico cerebral crónico la administración de vinpocetina indujo un aumento en el flujo regional cerebral y un aumento del metabolismo de la glucosa en el tálamo, los ganglios basales y la corteza visual primaria en la región del trauma cerebral así como en el hemisferio cerebral del lado no dañado (Bonoczky y col. 2000).

3.6.f. La farmacocinética de la vinpocetina

Se ha estudiado la farmacocinética de la vinpocetina en humanos, es decir su tasa de captura y eliminación en el organismo y se ha observado que su eliminación es bifásica sugiriendo que se deposita en 2 compartimentos y alcanza una concentración máxima en el organismo a las 1.5 h después de su administración (Vereczkey y col. 1979a, 1979b).

La vinpocetina es fácilmente absorbida en el tracto gastrointestinal y la vida media de su eliminación cuando se administra oralmente es de 1-2 horas, la mayoría de la vinpocetina es eliminada 8 horas después de su administración (Miskolczy y col. 1990).

A este respecto, otros han estudiado el metabolismo de [³H]vincamina marcada radioactivamente en ratas y en humanos, la cual también es eliminada rápidamente del organismo (Mayo y col. 1982). Otras investigaciones han

estudiado también la farmacocinética de la vinpocetina y su principal metabolito la apovincamina después de su administración oral a humanos, encuentran que su acumulación es lineal y no tiene permanencia prolongada en el organismo (Miskolczi y col. 1990). Se han estudiado los efectos de la edad sobre el metabolismo de la degradación de la vinpocetina, encuentran que la vinpocetina se elimina más lento en los animales viejos que en los jóvenes posiblemente debido a que en los viejos ocurre una reducción de la función renal (Miskolczi y col. 1987). Por su parte varios investigadores han estudiado la degradación de la vinpocetina en solución acuosa, encuentran que es dependiente de pH, ya que en pH ácido, la vinpocetina se degrada en solución (Muhammad y col. 1988).

3.6.g. La vinpocetina y la actividad de las neuronas del locus coeruleus

Se ha estudiado el efecto de la vincamina, análogo de vinpocetina, sobre la tasa de disparo de las neuronas del locus coeruleus, se ha observado que la vincamina, incrementa la tasa de disparo de dichas neuronas (Olpe y Steinmann, 1982). Por otra parte también otras investigaciones han estudiado el efecto de la vinpocetina sobre la actividad de las neuronas del locus coeruleus. En dosis bajas la vinpocetina induce un incremento de su actividad de disparo de las neuronas del locus coeruleus cuando es administrada en dosis terapéuticas (Gaal y Molnar, 1990). Otras investigaciones han mostrado que un análogo de vinpocetina incrementa la actividad eléctrica reducida de las neuronas del locus coeruleus que ocurre después de daño cerebral ó de inyección de clonidina un agonista α -2 adrenérgico (Arakawa y col. 1995).

3.6.h. El enlace de la vinpocetina a las proteínas del plasma sanguíneo

La vinpocetina es una droga que enlaza in vitro a la albúmina de suero bovino y a la α 1-glucoproteína, dos proteínas del suero sanguíneo de mamíferos (Fitos y col. 1991), lo que pudiera ser significativo en su biodisponibilidad cerebral ya que parte de la vinpocetina administrada como fármaco para actuar en el cerebro se pierde al enlazar a las proteínas del suero.

2.3.i. La vinpocetina como atrapador de radicales libres

La vinpocetina es un atrapador de radicales libres en sinaptosomas sujetos a estrés oxidativo (Santos y col. 2000). Esta propiedad de atrapar radicales libres es de interés puesto que pudiera contribuir a la capacidad neuroprotectora de la vinpocetina. Por otro lado se han hecho experimentos en los que el compuesto hialuronano, polímero de N-acetilglucosamina y ácido glucurónico se ha oxidado, y les ha permitido probar los efectos antioxidantes de la vinpocetina in vitro, ya que contrarresta la oxidación de hialuronano (Orvisky y col. 1997). A este respecto es interesante mencionar que se ha descrito que la vinpocetina es capaz de bloquear los efectos de estrés oxidativo inducido por la incubación de células de la línea celular PC12 con el péptido β -amiloide, péptido que es responsable de la degeneración neuronal en la enfermedad de Alzheimer. La vinpocetina inhibe la formación de radicales libres tóxicos en las células PC12 inducidos por el péptido β -amiloide, lo que sugiere que la vinpocetina pudiera emplearse para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas (Pereira y col. 2000).

3.6.j. La vinpocetina como inhibidor de fosfodiesterasas

Se ha clasificado a la vinpocetina como un inhibidor de la fosfodiesterasa dependiente de Ca^{2+} y de calmodulina que tiene selectividad por el GMPc, en particular es un inhibidor selectivo de la fosfodiesterasa 1B1 (Beavo y Reifsnnyder, 1990; Thompson, 1993; Beavo y col. 1994). Es interesante que la teofilina, inhibidor de fosfodiesterasas no selectivo, también incrementa los niveles de DOPAC (Dethy y col. 1996).

Se ha clonado la fosfodiesterasa 1B1 que es inhibida selectivamente por vinpocetina (Polli y Kincaid, 1992) y su expresión se correlaciona con regiones del cerebro que tienen alto grado de inervación dopaminérgica (Polli y Kincaid, 1994), fundamentalmente en las regiones postsinápticas, como es sugerido por detección inmune en preparaciones vistas al microscopio electrónico (Ludvig y col. 1991). La vinpocetina, inhibidor de la fosfodiesterasa 1B1, inhibe las oscilaciones de Ca^{2+} espontáneas en células de la pituitaria de la línea GH3 (Cataldi y col. 1999) y se ha sugerido que hay un involucramiento de la protein-quinasa G (PKG) que incrementa la concentración de GMPc, en las oscilaciones de Ca^{2+} que ocurren en las células de hipotálamo GH3 y encuentran que la vinpocetina bloquea dichas oscilaciones al bloquear la degradación de GMPc (Cataldi y col. 1999). Otras investigaciones han clonado y caracterizado en humanos la enzima fosfodiesterasa 1B1 dependiente de calmodulina que es inhibida por vinpocetina, encuentran que es similar a la descrita en la rata previamente (Yu y col. 1997). Por otra parte se han estudiado los efectos de la vinpocetina, inhibidor de fosfodiesterasas, y del análogo no hidrolizable de GMPc, 8-BrGMPc sobre la

contracción muscular y los flujos de Ca^{2+} radioactivo en la aorta de conejo, se ha encontrado que la vinpocetina produce elevación de la concentración de GMPc en la aorta e inhibe la captura de Ca^{2+} radioactivo inducida por incubación con K^+ alto ó por adrenalina (Chiu y col. 1988). Estudios efectuados en rebanadas de hipocampo muestran que la vinpocetina induce variaciones complejas de la concentración de GMPc en el hipocampo dependiendo de la región del hipocampo donde se mide el GMPc; en el hipocampo la vinpocetina induce un incremento en la concentración de GMPc medido mediante inmunoquímica contra GMPc y han sugerido que tanto las neuronas como los astrocitos del hipocampo pudieran contribuir a este incremento de GMPc observado después de aplicar vinpocetina (van Staveren y col. 2001). Por otra parte en células neuronales cultivadas provenientes de la pituitaria anterior, la vinpocetina, que inhibe a las fosfodiesterasas dependientes de GMPc, induce la inhibición de la guanilato ciclasa soluble, enzima que sintetiza GMPc (Andric y col. 2001).

3.6.k. La acción de la vinpocetina sobre la acumulación de iones en el cerebro y vasos sanguíneos

Se ha descrito que la vinpocetina previene contra la acumulación anormal de Ca^{2+} en el cerebro de gerbo que ocurre con la edad (Araki y col. 1991a), así como también inhibe la acumulación anormal de depósitos de Ca^{2+} , PO_4^{3+} , y Al^{3+} en el SNC inducidos artificialmente en un modelo de arterioesclerosis cerebral en ratas que son alimentadas con una dieta con alto contenido en colesterol con el objeto de inducirles arterioesclerosis (Yasui y col. 1990) .

3.6.I. La vinpocetina y el comportamiento

La vinpocetina es eficaz y no tiene efectos secundarios en pacientes que sufren psicosis orgánicas (Hindmarch y col. 1991). Por otro lado se han evaluado los efectos psicofisiológicos de la vinpocetina en individuos sanos y se ha observado que no tiene ningún efecto adverso ó estimulante (Subhan y Hindmarch, 1985). Se ha estudiado los efectos sobre el comportamiento en animales de la vinpocetina y encuentran que no tiene efectos sobre la conducta (O'Donnell y Frith, 1999). Otras investigaciones han encontrado que la vinpocetina afecta el comportamiento de los ratones ya que mejora el comportamiento activo en campo abierto, en la rueda giratoria en ratones poco activos y disminuye la actividad de los ratones hiperactivos (Jahkel y col. 1994). Sin embargo se ha usado la vinpocetina como fármaco en el tratamiento de la demencia y ha probado no ser efectiva (Nicholson, 1990).

3.6.m. La vinpocetina administrada en la vejez

Un análogo de la vinpocetina, el vinconato, inhibe los cambios en el cerebro relacionados a la edad en gerbos respecto del enlace de drogas marcadas radiactivamente que identifican a los receptores muscarínicos, a la adenilato ciclasa, a la PKA y al canal de Ca^{2+} (Araki y col. 1993a, 1993b). También se ha evaluado el efecto de la vinpocetina sobre la disfunción cerebral en viejos y se ha observado que mejora la ejecución en pruebas psicométricas que evalúan el status mental del individuo (Balestreri y col. 1987). Otras investigaciones muestran una inhibición relacionada a la edad en el sistema de segundo mensajero AMPc, el enlace de $[^3H]AMPc$ al cerebro y los efectos atenuantes de la vinpocetina sobre

dicha disminución (Araki y col. 1992a, 1992b). Se ha estudiado el efecto de la vinpocetina sobre la liberación de oxígeno de la hemoglobina y la concentración de ATP en pacientes con demencia, se encuentra que la vinpocetina aumenta la liberación de oxígeno de la hemoglobina y eleva la concentración de ATP (Tohgi y col. 1990). Por otro lado se ha mostrado una falta de eficacia de la vinpocetina en la enfermedad de Alzheimer que es una enfermedad neurodegenerativa que induce la pérdida de memoria (Thal y col. 1989).

3.6.n. Efectos de la vinpocetina sobre el estatus mental en pruebas psicológicas

Se ha mostrado que la administración de 10 mg por vía oral de vinpocetina 3 veces al día mejora el estatus mental de pacientes como se demuestra por mejor ejecución en las pruebas psicológicas en pacientes con afectaciones orgánicas cerebrales (Blaha y col. 1989).

3.6.o. Los estudios de tomografía de emisión de positrones en pacientes tratados con vinpocetina

Se ha encontrado que en pacientes con derrame cerebral crónico el tratamiento con vinpocetina en una dosis única mejora el flujo sanguíneo cerebral, el transporte y el consumo de glucosa al cerebro en el hemisferio dañado y también en el hemisferio cerebral normal (Szakall y col. 1998). Por otra parte se ha estudiado la captura por el cerebro de vinpocetina marcada radioactivamente con ^{11}C mediante el empleo de la técnica de tomografía de emisión de positrones (PET) en monos. Se encontró que la vinpocetina llega al cerebro en 2 min

después de la administración de la vinpocetina y se acumula principalmente en el tálamo, los ganglios basales y algunas regiones de la corteza cerebral (Gulyas y col. 1999).

A pacientes humanos se les ha administrado oralmente [^{11}C]vinpocetina, se ha mostrado que la [^{11}C]vinpocetina se acumula en el cerebro en alto grado y se logra concentrar el 3.71% de la radioactividad total y la acumulación cerebral se hace rápidamente. La captura rápida de la [^{11}C]vinpocetina indica que penetra la barrera hematoencefálica con facilidad esto probablemente a su alto grado de lipofilidad (Bonoczk y col. 2000).

Después de la administración intravenosa de 1mg/kg de vinpocetina en pacientes con desordenes cerebrovasculares se ha mostrado que la vinpocetina administrada de este modo pasa fácilmente la barrera hematoencefálica y llega rápidamente al cerebro (Polgar y col. 1985), concluyen también que el carácter lipofílico de la vinpocetina pudiera contribuir a mejorar su captación cerebral.

Se ha estudiado por PET la captura cerebral de [^{11}C]vinpocetina en monos después de la inyección intravenosa del compuesto. La [^{11}C]vinpocetina aparece rápidamente en el cerebro donde se captura el 5% de la radioactividad total. La máxima acumulación de [^{11}C]vinpocetina se logra en el tálamo, el estriado y en ciertas regiones corticales (corteza occipital, parietal y temporal). En el tálamo la acumulación de [^{11}C]vinpocetina es 24% superior y en el estriado 18% superior a la acumulación basal del cerebro (Bonoczk y col. 2000).

En 12 pacientes con derrame isquémico crónico que participaron en el estudio de captura de [^{18}F]glucosa al cerebro en pacientes con trauma cerebral, una sola dosis de vinpocetina de 20 mg por paciente mejora la captura

de [^{18}F]glucosa en regiones corticales y regiones subcorticales así como en regiones alrededor del trauma cerebral. La captura y el metabolismo de la glucosa en las regiones no afectadas por el trauma cerebral también fue afectada positivamente (Bonoczk y col. 2000).

3.6.p. Las alteraciones de la vinpocetina sobre el metabolismo de la DA

La vinpocetina induce reducción de la inmovilidad cuando es administrada a ratones sometidos a estrés de desesperación (Schmidt, 1984), si están involucrados mecanismos dopaminérgicos no se conoce. La vinpocetina induce inhibición en los cambios en el metabolismo de la DA inducidos por la hipoxia cerebral tal como una liberación de DA incrementada y encuentran un incremento no explicado de DOPAC de 30% sobre el nivel basal (Funk y Schmidt, 1984).

En seguida mostramos un resumen de las actividades farmacológicas reportadas de la vinpocetina y los mostramos en una tabla (tabla 3).

Tabla 3. Resumen de algunos efectos farmacológicos reportados de la vinpocetina.

autor	año	preparación	Concentración De VPC usada	efectos	referencia
Erdo y col.	1996	Neuronas en cultivo	0.49 μM 40 μM	Bloquea enlace de STX- $^3\text{[H]}$ Protección contra veratridina	Eur J Pharmacol 314:69.
Kaneko Y col.	1991	Ovocitos Expresando El receptor NMDA	100 μM	Bloquea la activación Por glutamato del Receptor NMDA	Eur J Pharmacol 207:119
Ishihara Y col.	1989	Preparación del hipocampo	10 ^{-6}M	Incrementa la LTP	Neuropharmacology. 28: 569.

Miyamoto Y col.	1989	Línea Neuronal N18RE105	100µM	Protección contra Los radicales libres Formados por Activación de receptores De glutamato	J pharmacol Exp ther. 250:1132.
Sauer y col.	1988	Ratones Sometidos A isquemia	10 mg/kg	Protege contra la Degeneración del Hipocampo en CA1	Life Sci 43:1733
Yasui y col.	1990	Animales con Dieta alta en colesterol	10mg/día	Inhibe la deposición De Ca ²⁺ , PO ₄ ³⁺ , Al ³⁺ En los ganglios Basales.	J Int Med Res. 18:142.
De Noble Y col.	1987	Animales Sujetos a Pruebas de Memoria (evitación pasiva)	400 mg/Kg	Incrementa la memoria	Pharmacol Biochem Behav 26:183.
Krieglstein Y col.	1991	Neuronas en cultivo	10-100µM	Potencia el efecto Neuroprotector De la adenosina	Eur J Pharmacol. 205:7
De Noble Y col.	1986	Animales Sujetos a Pruebas de Memoria (evitación pasiva)	200 mg/kg	Previene los efectos De la escopolamina Agente que induce Transtornos de Memoria.	Pharmacol Biochem Behav. 24:1123
Imamoto Y col.	1984	Perros anestesiados	1mg/animal	Incrementa el flujo Cerebral, induce Caída de la presión sanguínea	Arzneimittel-Forschung. 34:161.
Araki y col.	1990	Gerbos con Isquemia Cerebral Inducida.	100mg/kg	Reduce la muerte Neuronal en el Cerebro.	Res Exp Med. 190:19
Gaal y col.	1990	Registro Eléctrico de Neuronas del locus ceruleus	1mg/kg	Incrementa la Tasa de disparo De las neuronas Del locus ceruleus	Eur J Pharmacol. 187:537.
Uchiyama Y col.	1996	Neuronas en cultivo	30 µM	Protege contra los Daños neuronales inducidos por hipoxia y glutamato	Life Sci. 59: 1571.
Bukanova Y col.	1998	Neuronas de molusco	30µM 600µM	Bloquea la I _{Ca2+} y la I _{K+}	Neurosci Behav physiol. 28:116.
Paroczai Y col.	1998	En ratas los Daños de Memoria Inducidos por Diazepam y Escopolamina	10 mg/kg	Mejora la memoria	Brain Res Bull. 45:475.
Cataldi	1999	Neuronas de	50µM	Inhibe las	Biochem

Y col.		La línea Celular Hipofisiaria GH3		Oscilaciones de Ca ²⁺ al inducir Un incremento de GMPc	Biophys Acta. 1449:186
Santos y col.	2000	Cerebro Aislado Tratado con Fe ²⁺ y Ascorbato Para generar Radicales Libres.	100µM	Disminuye la Formación de Radicales libres Medidos por un Método fluorescente	Free Rad Res. 32:57.
Lakics Y col.	1985	Cultivo Primario de La corteza cerebral	490nM	Protege 50% De la muerte Neuronal inducida Por veratridina 100µM	Neurosci lett. 185:127.
Tretter Y col.	1998	Sinaptosomas cerebrales	10µM	Reduce la elevación De Ca ²⁺ interno Y Na ⁺ interno. Inducida por K ⁺ y veratridina.	Neuroreport. 9:1849.
Molnar Y col.	1995	Neuronas De la corteza Cerebral. Registro eléctrico	44µM	Disminuye la Corriente de Na ⁺	Eur J Pharmacol. 273:303.
Erdo y col.	1995	Neuronas De cultivo primario	400µM	Protege vs la Neurotoxicidad De NMDA, Quisqualato y AMPA	Eur J Pharmacol. 187:551.
Kiss y col.	1991	Preparación De Membranas.	40µM	Reduce el enlace De AMPA y Kainato. Reduce el Eflujo de DA Evocado por glutamato	Eur J Pharmacol. 209:109
Vereczkei Y col.	1979	Voluntarios Humanos.	0.36 lt/h/kg	Se bioelimina por La orina de manera bifásica	Arzneimittel-Forschung. 29:957.
Molnar Y col.	1992	Preparación De Hipocampo (giro dentado)	5 mg/kg	Potenciación de La LTP	Eur J Pharmacol. 215:17.
Matkovics Y col.	1991	Metabolismo De la ¹⁴ C-glucosa en el cerebro de rata.	500µg	Incrementa el Metabolismo de la ¹⁴ C-glucosa, activando la vía de las pentosas.	Arzneimittel-Forschung. 41:107.
Okuyama Y col.	1994	Evaluación De EEG En ratas.	30mg/kg	Induce incremento Del disparo Espontáneo en Neuronas de la Corteza cerebral	Gen Pharmacol. 25:1311.

Schmidt Y col.	1990	Kindling de La amígdala Y tratamiento Con PTZ	De manera Dependiente De dosis	Disminuye o protege Contra las Convulsiones	Biomed Biochim Acta. 49: 413.
Miyata Y col.	1993	Arteria Coronaria De cerdo.	10^{-7} a 10^{-6} M	Inhibe la contracción De la arteria inducida Por noradrenalina	Life Sci. 52:1481?
Yamamoto Y col.	1989	Ratones Sujetos a anoxia	10 mg/kg	Prolonga el tiempo De supervivencia De los ratones Sujetos a anoxia.	Neuropharmacology. 28:313
Schmidt Y col.	1990	Ratas Inyectadas Con Apomorfina.	300mg/kg	Induce una Potenciación de la Estereotipia inducida Por apomorfina.	Biomed. Biochim Acta. 49:133
King y col.	1987	Ratones Sometidos a Hipoxia.	16.6 mg/kg	Protege contra Muerte por hipoxia.	Arch Int Pharmacodyn. Ther. 286: 299
Murakami Y col.	1993	Gerbos Sujetos a hipoxia	100-300mg/kg	Protege contra la Muerte neuronal y Daño en el enlace de SCH23390- ³ H	Gen pharmacol. 24:23
Sitges Y col.	1999	Sinaptosomas De estriado	15 μ M	Inhibe la liberación De glutamato y aspartato Evocada por Veratridina.	Neurochem Res. 24: 1587-93.
Pereira y col.	2001	Células PC12	40 μ M	Protege contra el Estrés oxidativo Inducido por el Péptido beta-amiloide	Free Rad Res. 33:497
Wu y col.	2001	Células GH3	10 μ M	Estimula la corriente De K ⁺ que depende De Ca ²⁺	Biochem Pharmacol. 61: 877.

APÉNDICE 4.

LA ISQUEMIA CEREBRAL Y LA DA

4.1. La isquemia cerebral y la captura de DA en sinaptosomas

La isquemia cerebral inhibe la recaptura de DA a los sinaptosomas de estriado de manera diferente a la recaptura de GABA y de glutamato, así por ejemplo, en terminales de estriado incubadas con [³H]DA, [³H]GABA y [³H]Glutamato, la isquemia induce una inhibición de la recaptura de [³H]DA a 15% del control, mientras que la recaptura de [³H]GABA a un 30% del control y la recaptura de [³H]Glutamato a un 45% del control (Weinberger y Cohen, 1982). La hipoxia cerebral inhibe la liberación y la recaptura de DA en sinaptosomas de ratas sometidas a hipoxia cerebral al inducir modificaciones de la molécula del DAT ya que induce una elevación del Km para el DAT de 269% y aumenta la Vmax del DAT 300%, mientras que la liberación de DA inducida por K⁺ alto decrece 69%. 3 meses después del episodio de isquemia cerebral las ratas presentaron una elevación de 132% de la liberación de DA indicando que ocurrieron en este periodo post-isquemia cerebral cambios plásticos en las terminales dopaminérgicas, tanto en la captura como en la liberación de DA (Odarjuk y col. 1987).

Después de la isquemia se incrementa el funcionamiento del DAT en el cerebro y la activación de la NOS (óxido-nítrico-sintasa) que ocurre durante la isquemia cerebral no afecta la función del DAT, por el contrario las neuronas que

son por inmunológica positivas a NOS son más resistentes a la isquemia cerebral (Meng y col. 2000). Se ha descrito un incremento en la expresión y enlace del DAT, 24 a 96 h después de un episodio de isquemia cerebral inducida por 10 min en gerbos, como determinado mediante el enlace de β -CIT radioactivo, que es un análogo de tropano, ya que la isquemia cerebral induce un incremento en el enlace de β -CIT radioactivo que es un compuesto que detecta al transportador de DA indicando un posible incremento de la expresión de DAT después de la isquemia cerebral (Fujita y col. 1996). En los sinaptosomas de ratas sometidas a anoxia se ha observado que la recaptura de la DA está disminuida 40% sugiriendo que la disminución de la función del DAT que ocurre en la isquemia cerebral puede contribuir a la acumulación de DA externa en adición a la liberación masiva de DA que ocurre de manera simultánea en esa condición patológica (Domanska-Janik y col. 1985).

4.2. Los factores de transcripción en la isquemia cerebral

Los incrementos en la concentración de DA que se producen durante la isquemia cerebral global en el medio extraneuronal son muy peligrosos para las neuronas puesto que se ha descubierto que la DA induce apoptosis neuronal al provocar la activación de los factores de transcripción nucleares, AP-1 y NF-kB que se produce subsecuente a la oxidación de la DA (Luo y col. 1999). En este mismo sentido, en la muerte de las neuronas inducida por isquemia se produce una activación del factor de transcripción nuclear c-jun el cual se incrementa fuertemente en su expresión en las condiciones inducidas por la oxidación de DA y

precede la muerte neuronal provocada por la isquemia cerebral (Dragunow y col. 1993).

4.3. Los compuestos neuroprotectores de la isquemia cerebral

Se ha observado que algunos compuestos que tienen actividad nootrópica atenúan los efectos de la isquemia cerebral. Por ejemplo, el aniracetam que es un agente nootrópico atenúa la formación de radicales hidroxilo que se producen después de un episodio de isquemia cerebral y es neuroprotector (Himori y col. 1995). Por su parte el neuroprotector nootrópico vinpocetina y el pentobarbital protegen contra el aumento del enlace de [³H]espirodecanona en el gerbo inducido por isquemia cerebral (Murakami y col. 1994b). Por otra parte varios fármacos se han propuesto contra los efectos neurodegenerativos inducidos por la DA después de un episodio de isquemia cerebral, así el pretratamiento con el gangliósido GM1 reduce el volumen de daño neuronal debido a la isquemia cerebral (Lazzaro y col. 1994). Existen investigaciones que muestran un papel fundamental de la DA en la neurodegeneración después de un episodio de hipoxia en el cerebro, así, los agentes antioxidantes que cruzan la barrera hematoencefálica son protectores contra la isquemia cerebral, condición que causa la degeneración de las neuronas del estriado y protegen contra la toxicidad de la DA (Andrus y col. 1997). En acuerdo con lo anterior el ascorbato es neuroprotector a las neuronas del estriado en la isquemia cerebral, el ascorbato protege al estriado contra la isquemia cerebral y lo hace probablemente por sus efectos antioxidantes (Stamford y col. 1999).

4.4. El estrés de calor como inductor de la isquemia cerebral

El incremento del calor no es bueno para el funcionamiento del cerebro ya que induce un estado similar a la isquemia. La isquemia cerebral inducida por un incremento excesivo de temperatura provoca la aparición de proteínas de choque térmico que protegen parcialmente contra la isquemia (Yang y Lin, 1999). En este sentido se ha observado que la eliminación de la DA, por lesión selectiva con 6-OHDA, protege a las neuronas del estriado de la degeneración inducida por isquemia debida a shock de calor inducido por mantener a las ratas a 42 °C durante algunas horas (Lin y col. 1995).

4.5. La alteración de los receptores de neurotransmisores por la isquemia cerebral

Los compuestos que activan los autorreceptores presinápticos dopaminérgicos sirven para atenuar los efectos de la isquemia cerebral sobre el daño neuronal y la liberación de DA: Así por ejemplo, los bloqueadores del receptor de DA presinápticos, como el quinpirole, la bromocriptina, el piribedil (Tang y col. 1994; del Barre y col. 1995) inhiben la hiperlocomoción inducida por isquemia cerebral en gerbos. Al parecer dicha acción motora incrementada es inducida por la liberación de DA provocada a su vez por la anoxia en el estriado. Dicha liberación de DA estriatal inducida por la anoxia es mediada por la reversión del transporte de DA (Buyukuysal y Mete, 1999).

En la isquemia cerebral se pierden neuronas en el cerebro que presentan en su superficie receptores de DA, algunos investigadores han estado interesados

en cuantificar la distribución de los receptores de DA después de un episodio de isquemia cerebral y han encontrado empleando la técnica de SPECT, usando [¹²³I] benzamida que es un ligando que marca los receptores D2 de DA, que están disminuidos en los niños después de un episodio de isquemia cerebral y la disminución de dichos receptores dopaminérgicos es proporcional al daño neuronal ocurrido en la isquemia (Kapucu y col. 1998). Durante la isquemia cerebral, los ganglios basales son susceptibles particularmente a la neurodegeneración y dicha muerte neuronal provoca una disminución en el número y la distribución observada en el cerebro de los receptores D2 de DA después de la isquemia cerebral como se ve mediante inmunodetección del receptor D2 (Meng y col. 1998). El compuesto lisuride un agonista de los receptores de DA, tipo D2 al interactuar con los receptores de DA presinápticos previene el incremento de liberación de DA inducido por isquemia cerebral global (Caldwell y col. 1997) y protege contra la isquemia cerebral en algún grado.

Después de un evento de isquemia cerebral en los animales neonatos se desarrolla una degeneración neuronal que provoca una disminución de los niveles de receptores de DA del tipo D2 sin cambio en los receptores tipo D1 en el cerebro de los neonatos (Zouakia y col. 1997). Otras investigaciones muestran que los agonistas de los receptores de DA tienen efectos atenuantes sobre la degeneración neuronal que ocurre posterior a la isquemia cerebral. Así por ejemplo, se ha descrito que el agonista del receptor de DA presináptico, pramipexole protege contra la degeneración de las neuronas de la sustancia nigra y del estriado inducida por isquemia cerebral (Hall y col. 1996), ya que pramipexole inhibe la liberación de DA y también tiene actividad antioxidante.

Entre tanto se ha observado que la isquemia cerebral induce una inhibición en el enlace de [³H]-SCH23390 y por tanto en los niveles de receptor de DA de tipo D1 en el estriado pero no del receptor tipo D2 ni del DAT (Araki y col. 1996). Después de la isquemia cerebral se producen alteraciones en los niveles de los receptores de DA estriatales así como en los niveles de los segundos mensajeros y las enzimas acopladas a dichos receptores. Por ejemplo, mediante autorradiografía en cortes de cerebro recientemente se ha observado que después de un evento de isquemia cerebral están disminuidos ligeramente los niveles de enlace de [³H]-forskolina (11%) y de agonistas del receptor D1 de DA (1%) (Gartshore y col. 1996). El lisuride un agonista de los receptores de DA estriatales presinápticos protege contra la neurodegeneración inducida después de que los animales han sufrido un episodio de isquemia cerebral al inhibir la liberación de DA que se produce en la isquemia (Caldwell y col. 1997). Otro agonista de los receptores D2 de DA presinápticos tal como el piribedil, que inhiben la liberación de DA es neuroprotector contra la isquemia cerebral (Delbarre y col. 1995). La isquemia cerebral induce la degeneración de las neuronas que tienen receptores de DA, se ha observado que después de un evento de isquemia cerebral en el que las ratas sobreviven, el comportamiento motor inducido por amfetamina aumenta y la catalepsia (inmovilidad) inducida por haloperidol se incrementa también (Borlongan y col. 1995). Otros investigadores han estudiado que ocurre con la expresión del RNAm de los receptores de DA después de un episodio de hipoxia cerebral neonatal y encuentran que hay una disminución tanto de la expresión del receptor D1 como de la expresión del receptor D2 de DA (Filloux y col. 1996). La isquemia cerebral modifica la neurotransmisión dopaminérgica ya que después de

isquemia se disminuyen los niveles de receptores D1 y D2 de DA así como también se provocan variaciones en la concentración de de neuropéptidos en el estriado ya que se ha observado que aumentan los niveles de neuropéptido Y, dinorfina y disminuyen los de sustancia P estriatales (Johnson y col. 1994). En el cerebro sometido a isquemia cerebral hay un incremento de 400 veces los niveles de DA liberada y disminución de los receptores de DA tipo D2 así como un aumento de la afinidad por la DA de los receptores D1 debido a la muerte neuronal por esta condición en el estriado (Chang y col. 1993). Hay reportes en la literatura que muestran que después de la isquemia cerebral hay una disminución de los niveles de receptores de DA, tipo D1 como medida por el enlace del antagonista D1, [³H]SCH-23390 (Nagasawa y col. 1992). El compuesto lisuride un agonista de los receptores de DA bloquea el incremento en la liberación de DA y de sus metabolitos inducida por isquemia cerebral, este efecto lo induce probablemente por que inhibe la liberación de DA en el cerebro sometido a hipoxia (Hirata y col. 1992). Se ha estudiado el efecto de la hipoxia sobre los receptores de DA de tipo D1 y D2 y sobre la expresión del DAT, encuentran que hay una disminución de los receptores D1 y D2 en el estriado y hay una preservación del DAT, concluyen que las neuronas del estriado postsinápticas con receptores de DA mueren pero las neuronas de DA presinápticas se preservan en las condiciones de isquemia cerebral empleadas (Przedborski y col. 1991). Se ha estudiado si existen variaciones en los niveles de mRNA del receptor de DA del tipo D2 en el estriado después de un episodio de isquemia cerebral y encuentran que hay un decremento del RNAm del receptor D2 (Benfenati y col. 1991a). Después de un periodo de isquemia cerebral hay disminución en los niveles de receptores

opioides en el estriado, así se observa una disminución en los receptores μ y δ del estriado después de isquemia cerebral como indicado por autorradiografía de cortes de cerebro sugiriendo la muerte de las neuronas que expresan dichos receptores sobre su superficie membranal (Benfenati y col. 1991b). Por otra parte se ha observado que durante la isquemia cerebral se incrementan el número de receptores de benzodiazepinas en el estriado indicando que se incrementa la transmisión gabaérgica (Dubois y col. 1988).

4.6. La síntesis de DA y la isquemia cerebral

La inhibición de la síntesis de DA puede ser neuroprotectora contra los efectos de la isquemia cerebral, hay reportes en la literatura que muestran que el inhibidor de la enzima TH responsable de la síntesis de DA, α -metil-para-tirosina, protege contra la muerte neuronal inducida por la isquemia cerebral en animales en modelos experimentales de isquemia (Marie y col. 1992). Por otra parte la inducción de isquemia cerebral provoca una disminución en los niveles de TH en varios núcleos cerebrales y la administración cerebral de GABA previene dicha pérdida de TH, indicando que el GABA inhibe la muerte de las neuronas dopaminérgicas y actúa como neuroprotector (Yamada y col. 1996). La dexametasona es una hormona esteroide que tiene profundos efectos sobre el metabolismo de la DA ya que incrementa su síntesis, este compuesto al ser administrado a animales experimentales incrementa el daño inducido por la DA a las neuronas e incrementa los daños neuronales que se producen durante la isquemia cerebral (Tsubota y col. 1999). Por el contrario el inhibir la síntesis de

DA tiene efectos benéficos sobre la protección contra la isquemia cerebral así por ejemplo, al inhibir la síntesis de tetrahidrobiopterina, que es el cofactor de la TH, enzima limitante de la síntesis de catecolaminas, se obtiene un incremento de la protección contra la muerte neuronal por isquemia cerebral mayor en los animales con TH cuya actividad es inhibida que en los animales no tratados para inhibir la actividad de la TH. Estos resultados muestran que la inhibición de la síntesis de DA es neuroprotector para algunas condiciones patológicas, tales como la isquemia cerebral (Cho y col. 1999).

4.7. Los factores tróficos neuronales y la isquemia cerebral

Se han empleado factores tróficos neuronales para el tratamiento de la muerte neuronal inducida por isquemia cerebral. Se ha mostrado que hay una disminución de la muerte neuronal en el estriado inducida por la isquemia cerebral mediante el tratamiento con factor de crecimiento nervioso (NGF) (Andsberg y col. 1998). Después de un episodio de isquemia en el estriado se degeneran varios tipos de neuronas estriatales. Sin embargo, las neuronas colinérgicas del estriado son especialmente resistentes a la isquemia cerebral debido posiblemente a que expresan receptores del factor de crecimiento nervioso NGF en su superficie (Kokaia y col. 1998). El factor transformante de crecimiento tipo β (TGF- β), un factor trófico neuronal rescata a las neuronas dopaminérgicas de la muerte inducida por isquemia cerebral y de la degeneración inducida por la neurotoxina MPP⁺ (Krieglstein y Unsicker, 1994).

4.8. La DA como causante de daño neuronal en la isquemia cerebral

La remoción de DA cerebral protege contra la muerte neuronal inducida por isquemia cerebral (Clemens y Phebus, 1988). La DA es una neurotoxina ya que su metabolismo genera radicales libres y quinonas tóxicas a las neuronas. La inyección de DA en el estriado resulta en daño al DNA y en la subsecuente apoptosis de las neuronas que son expuestas a dicho neurotransmisor (Hattori y col. 1998). La DA es particularmente tóxica a las neuronas estriatales in vitro y la adición de inhibidores respiratorios mitocondriales potencia la acción neurotóxica de la DA sobre las neuronas del estriado (McLaughlin y col. 1998). Por otra parte la DA cerebral tiene un papel fundamental en el daño neuronal al estriado y se ha mostrado evidencia de que la DA disminuye el consumo de glucosa post-isquemia cerebral y reduce el flujo cerebral local (Globus y col. 1987).

En relación a la toxicidad de la DA sobre las neuronas estriatales otro mecanismo probable de neurotoxicidad inducida por este neurotransmisor es la liberación intracelular de Ca^{2+} que ocurre subsecuente a la activación de los receptores de DA lo que puede contribuir adicionalmente a la toxicidad neuronal, ya que también la DA es capaz de inducir la liberación de Ca^{2+} de pozas intracelulares, así por ejemplo, se ha descrito que la activación de los receptores de DA tipo D1/D5 estimula la liberación de Ca^{2+} intracelular en las neuronas de corteza e hipocampo (Lezcano y Bergson, 2002). Si esta acción sobre el Ca^{2+} intracelular contribuye a la toxicidad de la DA no se conoce; sin embargo otros datos apuntan a que la estimulación de los receptores D1 pudiera contribuir a la toxicidad en las neuronas espinosas medianas del estriado a través de activar los

canales de Ca^{2+} tipo L, por ejemplo, se ha descrito que la DA facilita en las neuronas la excitabilidad neuronal al incrementar la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de Ca^{2+} tipo L (Galarraga y col. 1997). También se ha descrito que la activación de los receptor D1 de DA aumenta la tasa de disparo de las neuronas espinosas medianas al aumentar la conductancia de Ca^{2+} a través de canales tipo L (Hernandez-Lopez y col. 1997). Por otra parte, la DA a través de activar los receptores D1, se ha reportado que aumenta la corriente de Ca^{2+} que pasa a través de canales tipo L y disminuye la conductancia a través de los canales de Ca^{2+} tipo N y P, (Surmeier y col. 1995).

La importancia de la activación de las corrientes de Ca^{2+} tipo L ó su inhibición en la isquemia neuronal no se conoce con detalle. A este respecto existe un reporte que señala que en la isquemia cerebral la liberación de DA no ocurre a través de la activación de los canales de Ca^{2+} tipo L, sino canales de Ca^{2+} de otro tipo como N,P,Q (Bentue-Ferrer y col. 1993), pero no se habla de la participación de los canales tipo L en la entrada de Ca^{2+} en la isquemia neuronal. Existe poco estudio de los efectos de la activación de los receptores D2 de DA y su subsecuente efecto sobre el Ca^{2+} interno y si este Ca^{2+} contribuye al daño en la isquemia neuronal, se ha visto que dicha activación de los receptores D2 reduce la corriente de Ca^{2+} tipo L y la excitabilidad neuronal de las neuronas presinápticas (Hernandez-Lopez y col. 2000), si la entrada de Ca^{2+} modulada negativamente a través de receptores D2 es relevante para la sobrevivencia de las neuronas que poseen dichos receptores en la isquemia no se conoce. Los estudios sobre el involucramiento de canales de Ca^{2+} en la liberación de DA en la isquemia cerebral sugieren que pueden ser canales de Ca^{2+} de bajo umbral ya que la Ω conotoxina

inhibe la liberación de DA que ocurre en la isquemia de manera parcial (Ooboshi y col. 1992). Es importante sin embargo mencionar que en la isquemia neuronal aunque hay liberación excitotóxica dependiente de Ca^{2+} y liberación de neurotransmisor mediada por reversión del transportador de neurotransmisor al parecer la que no depende de Ca^{2+} tiene una contribución más importante en la isquemia ya que la primera depende de ATP, cuya concentración intracelular cae marcadamente en la isquemia.

4.9. La remoción de la DA y el daño en la isquemia cerebral

La remoción experimental de las vías dopaminérgicas por pretratamiento con la toxina dopaminérgica, 6-OHDA, aplicada intracerebralmente para eliminar las vías dopaminérgicas principales tiene efecto neuroprotector sobre las neuronas del estriado en casos de isquemia cerebral. Este procedimiento disminuye la formación de H_2O_2 que ocurre en el estriado después de oclusión de las arterias que irrigan a esa región cerebral (Lei y col. 1997). Otros investigadores han hecho observaciones similares: la remoción unilateral de la DA cerebral protege contra la degeneración neuronal estriatal inducida por hipoxia cerebral (Ren y col. 1997). La muerte de las neuronas del estriado que ocurren después de un evento de isquemia cerebral puede ser disminuido bastante si previo al episodio de isquemia los animales experimentales son tratados para eliminar las neuronas de la sustancia nigra lo que refleja que la DA que se libera durante la isquemia es la responsable de la degeneración de las neuronas en el estriado (Buisson y col. 1992). Por el contrario, otras investigaciones han encontrado que la isquemia cerebral induce daño neuronal en el estriado que no es disminuido por la lesión de

la vía nigro-estriatal (Wieloch y col. 1990). En ratones neonatos a los que se les ligó las arterias carótidas para inducir isquemia cerebral, se encontró que del lado cerebral ligado hay un incremento marcado de los niveles de HVA que es un producto de la degradación de la DA indicando que el HVA es un marcador de la liberación de DA y del daño neuronal inducido por la DA en la isquemia cerebral (Silverstein y Johnston, 1984).

4.10. Los Canales de Ca^{2+} en la isquemia cerebral

Los bloqueadores de los canales de Ca^{2+} tales como la Isradipina atenúan la liberación de DA inducida por isquemia cerebral en el estriado pero la isradipina no bloquea la liberación de glutamato inducida por esta condición patológica (Nakane y col. 1995). Durante la isquemia cerebral se ha observado existe la activación de canales de Ca^{2+} de tipo L, cuya activación potencia el incremento en la liberación de DA inducida por NMDA en el estriado (Werling y col. 1994). La isradipina, administrada previamente antes de someter a hipoxia a la rata atenúa la liberación de DA cerebral inducida por esta condición (Ooboshi y col. 1993). Estudios de liberación de DA durante la isquemia cerebral muestran que la ω -conotoxina un bloqueador de los canales de Ca^{2+} de tipo N inhibe la liberación de DA que se produce después de someter a ratas a hipoxia cerebral (Ooboshi y col. 1992). Por su parte otras investigaciones han observado que los bloqueadores de canales de Ca^{2+} reducen el daño neuronal debido a isquemia cerebral (Sauter y col. 1988).

4.11. El glutamato y la isquemia cerebral

La isquemia cerebral aumenta 50-200% el enlace de los agonistas a los receptores de glutamato del tipo NMDA en el estriado indicando que después de la isquemia cerebral ocurre la muerte de las neuronas y aumenta la expresión de dichos receptores en las neuronas sobrevivientes que portan dichos receptores de glutamato (Wei y col. 1997a). En la investigación de las posibles causas de la liberación de DA en el estriado después de la hipoxia cerebral se ha encontrado que los receptores de glutamato juegan un papel importante en dicha liberación ya que existen receptores presinápticos de glutamato en las terminales dopaminérgicas que facilitan la liberación de DA durante la isquemia cerebral (Ohta y col. 1994). Otros investigadores observan que el antagonista de los receptores al NMDA, el ifenprodil, es un inhibidor del daño neuronal en el estriado y bloquea la liberación de DA estriatal debida a la activación del receptor NMDA durante la isquemia cerebral (Carter y col. 1988). Durante la isquemia cerebral en el hipocampo ocurre una captura aumentada de Ca^{2+} y dicha entrada de Ca^{2+} involucra la activación de los receptores al NMDA (Andine y col. 1988). Después de un episodio de isquemia cerebral hay una disminución en los receptores de tipo AMPA de glutamato y de los receptores D2 de DA estriatales y dicha disminución ocurre posterior a la degeneración neuronal inducida en los ganglios basales por dicha condición (Araki y col. 1997). La liberación de DA que ocurre durante la isquemia cerebral tiene efectos inhibidores sobre el funcionamiento del transportador de glutamato. En las terminales nerviosas del estriado, la incubación con DA provoca oxidación del transportador de glutamato por la DA, el transportador de glutamato una vez oxidado no remueve al glutamato externo

elevando su concentración externa e incrementa los efectos tóxicos de la DA (Berman y Hastings, 1997). Estudios recientes muestran que la degeneración neuronal inducida por DA también tiene una relación con los niveles de glutamato liberado es decir que la degeneración por glutamato y por DA están estrechamente relacionadas en el cerebro (Hoyt y col. 1997). En este sentido, los antagonistas del receptor NMDA de glutamato, como la memantina, son capaces de proteger contra los efectos de la isquemia en el cerebro indicando que estos antagonistas también son neuroprotectores en esta condición patológica (Block y Schwarz, 1996).

De entre de los mecanismos que se han propuesto para explicar la muerte neuronal que ocurre en la isquemia cerebral llama la atención la hipótesis GluR2, propuesta por Pellegrini-Giampietro, que sugiere que el influjo anormal de Ca^{2+} que ocurre a través de los canales de los receptores de glutamato de tipo AMPA contribuye a la pérdida de neuronas asociada con la isquemia cerebral. Los canales del receptor a AMPA se forman por la coexpresión de las subunidades GluR1 y GluR2 ó GluR3 y GluR2 los cuales son permeables a Na^{+} e impermeables al Ca^{2+} , sin embargo en las condiciones de isquemia cerebral se forman receptores de AMPA que carecen de la subunidad GluR2 y cuya carencia los hace permeables a Ca^{2+} . Durante la isquemia cerebral hay una disminución de la expresión de la subunidad GluR2 ("down regulation") y se forman receptores de AMPA formados por las subunidades GluR1 y GluR3 que son permeables a Ca^{2+} y que pueden contribuir a la entrada masiva de Ca^{2+} que ocurre en la isquemia cerebral. La regulación hacia abajo de la expresión de la subunidad gluR2 pudiera

contribuir a la toxicidad aumentada del glutamato en las condiciones patológicas que ocurren en la isquemia cerebral (Pellegrini-Giampietro y col. 1997).

4.12. La liberación de DA en la isquemia cerebral

Otros investigadores han estudiado la relación entre la desaparición del ATP, el potencial de membrana y el incremento de la liberación de DA que ocurre durante la anoxia neuronal, encuentran que la liberación de DA y de otros neurotransmisores inducida por la anoxia cerebral y la inducida por ouabaina son similares ya que involucran la reversión del funcionamiento de los transportadores de neurotransmisor (Santos y col. 1996). Se han estudiado los efectos de la isquemia cerebral sobre la concentración de DA externa en el estriado determinada por microdiálisis, en donde se ha observado que la isquemia induce un incremento de 156 veces en el nivel de DA respecto a su nivel basal en el cerebro (Damsma y col. 1990). Varios estudios muestran que hay un incremento en la concentración de DA externa en el estriado durante un episodio de isquemia cerebral (Wood y col. 1992). Otros investigadores han encontrado que hay un incremento de la liberación de DA en pacientes que sufren de isquemia cerebral después de reperfusión pero también muestran que ocurre una disminución de la relación de DA/DOPAC (Harik y col. 1986), indicando un aumento de la formación de DOPAC. Estudios de la liberación de DA en ratas resistentes a derrames cerebrales sugiere que en éstas, la liberación de DA inducida por la isquemia cerebral es similar al que ocurre en las ratas normales es decir ocurre un incremento masivo de la liberación de DA en el estriado (Kawano y col. 1988). Se ha observado que la isquemia cerebral induce una liberación de DA en el estriado

500 veces mayor a la liberación basal de DA, mientras que la liberación de glutamato y GABA se incrementa entre 5-15 veces respecto a la liberación basal (Globus y col. 1988a, 1998b). Por otra parte otras investigaciones han descrito también un incremento de los niveles de DA en el estriado medida por microdiálisis después de un episodio de isquemia cerebral (Slivka y col. 1988).

La isquemia cerebral se logra experimentalmente por la reducción del flujo sanguíneo cerebral a la región que se quiere someter a hipoxia, hay experimentos donde se ha empleado esta técnica con objeto de inducir isquemia en un núcleo determinado del cerebro, al hacer esto y posteriormente medir los niveles de DA liberada mediante microdiálisis cerebral es posible detectar variaciones en la concentración de DA externa donde se muestra que la liberación de DA se incrementa (Laer y col. 1993). Por otro lado se ha descrito que hay una liberación bifásica de DA durante la isquemia cerebral transitoria, una primera liberación de DA durante el episodio de isquemia cerebral y posteriormente también se produce liberación de DA después de la reperfusión sanguínea del estriado ya que la reoxigenación de las neuronas provoca una segunda fase de liberación de DA (Ahn y col. 1991).

La condición de isquemia cerebral aumenta la liberación de DA en el estriado de la rata (Inoue y col. 1995). Otros investigadores muestran incrementos cerebrales agudos de los niveles de DA después de que se ha sometido a los animales a isquemia cerebral (Ishimaru y col. 1993). Varios investigadores muestran que hay un incremento de la concentración externa de DA en las ratas que han sido sometidas a daño cerebral por hipoxia (McIntosh y col. 1994). Se han estudiado los efectos de la isquemia cerebral sobre la liberación de DA en el

estriado y sobre la función del DAT, encuentran que la DA se libera marcadamente durante la isquemia cerebral debido a que no funciona el DAT durante la isquemia, encuentran que la TTX no bloquea la liberación de DA que se produce en la isquemia cerebral, indicando que el DAT propicia la liberación isquémica de DA y muestran que después de la reperfusión con oxígeno del tejido cerebral sujeto a isquemia disminuye la liberación de DA progresivamente después de un tiempo, concluyen que la liberación de DA en la hipoxia cerebral ocurre por un mecanismo independiente de los potenciales de acción y dependiente de la inactivación de la recaptura de DA (Akiyama y col. 1991). Hay cambios en los niveles de DA cerebral inducidos por hipoxia, se ha observado que la DA se incrementa 700 veces sobre la basal durante isquemia cerebral, mientras que la liberación de los neurotransmisores excitatorios se incrementa sólo de 14 veces sobre la liberación basal (Baker y col. 1991). Al estudiar los cambios de los niveles de DA estriatal y otros marcadores bioquímicos después de un episodio de isquemia cerebral, se encuentra que después de la isquemia se eleva la expresión de: la TH, la proteína glial fibrilar ácida (GFAP) y la concentración de DA, DOPAC y HVA y la expresión del DARPP32 se disminuye (Nemeth y col. 1991). Otros investigadores se han dedicado a estudiar cual es el umbral de hipoxia que induce una liberación de DA en el cerebro encuentran que 20% del flujo sanguíneo normal es suficiente para inducir la liberación de DA (Yao y col. 1990). Se ha observado que posterior a un período de isquemia cerebral breve y después de la posterior reperfusión cerebral también ocurre una liberación incrementada de DA en el cerebro (Werling y col. 1993). Otros investigadores muestran que la hipoxia afecta la liberación de DA incrementandola y que los componentes de la liberación de DA inducida por

isquemia cerebral tienen una porción dependiente y otra independiente de la entrada de Ca^{2+} (Milusheva y col. 1996). Durante la isquemia se activan los canales de Ca^{2+} neuronales, dichos canales al activarse inducen la liberación de DA. Los canales de Ca^{2+} que se activan en la liberación de DA inducida por isquemia cerebral son del tipo N, P/Q (Toner y Stamford, 1997). Se han hecho estudios en ratas hipertensas en relación con los efectos de la isquemia cerebral sobre la liberación de DA. Se ha encontrado que la isquemia induce una liberación de DA cerebral durante la anoxia en dichas ratas (Kozuka e Iwata, 1995).

La anoxia induce liberación de DA de sinaptosomas del estriado y está liberación involucra la reversión del funcionamiento del DAT (Buyukusal y Mete, 1999). A este respecto es interesante mencionar que la hipoxia cerebral induce decremento de la liberación de DA en ratas sujetas primero a un episodio de hipoxia (10 KPa, tensión de oxígeno) y luego de manera posterior han sido probadas 2 meses después respecto a la liberación de DA cerebral. En las rebanadas cerebrales de ratas previamente sujetas a hipoxia y 2 meses después probadas para su capacidad de liberar DA se encuentra que la liberación de DA en las ratas que sufrieron un episodio de isquemia cerebral es menor comparadas con las que no sufrieron trauma cerebral (Gross y col. 1989).

4.13. El lactato como un inductor de la liberación de DA en la isquemia cerebral

El lactato es un producto del metabolismo anaerobio de la glucosa en la isquemia, y se ha observado que la concentración de lactato se incrementa

drásticamente en la isquemia cerebral. Experimentalmente se ha observado que la adición de lactato al estriado en animales in vivo induce una liberación de DA que puede ser monitoreada por microdiálisis (Remblrier y col. 1999a, 1999b). Por otra parte el lactato, un producto e inhibidor de la glucólisis, induce incremento en la liberación de DA en el estriado; hay evidencia de un papel del glutamato liberado en inducir esta liberación aumentada de DA y que la DA liberada juega un papel en la oxidación incrementada que se observa posteriormente (Remblrier y col. 1999a). Otros investigadores han encontrado que el lactato perfundido por microdiálisis induce en el estriado un incremento de la concentración de DA externa en dicho núcleo e incrementa los niveles de su metabolito DOPAC (Remblrier y col. 1998). En relación con la isquemia, el malonato, un inhibidor del ciclo de Krebs que provoca una condición similar a la isquemia cerebral provoca la aparición de radicales libres en el estriado, dicha aparición de radicales libres depende de la liberación de la DA la cual es inducida por la inhibición de la respiración que provoca el malonato y que ocasiona una caída de la concentración de ATP (Fergér y col. 1999).

4.14. El óxido nítrico en la isquemia cerebral y la liberación de DA

Durante la isquemia cerebral el compuesto precursor del óxido nítrico (NO), L-arginina, eleva la liberación de DA inducida por esta condición en el estriado de los gerbos; el inhibidor de la NOS, L-nitro-arginina, por el contrario inhibe la liberación de DA y de DOPAC (Spatz y col. 1995). Por otra parte se ha descrito que el compuesto L-Nitro-arginina, inhibe el metabolismo de DA y retarda la

recuperación del flujo cerebral en ratas que han sufrido de isquemia cerebral (Strasser y col. 1994).

A este respecto hay consenso en la literatura de que la activación de la NOS puede ser protectora ó inducir daño cerebral dependiendo de la gravedad de la isquemia cerebral, a niveles de isquemia no graves el NO facilita el flujo sanguíneo al incrementarlo, eleva al GMPc, aumenta la apertura de los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} , inhibe la agregación de plaquetas, inhibe la adhesión de los linfocitos a los vasos sanguíneos, limita la excitotoxicidad del glutamato al nitrosilar al receptor NMDA e inhibirlo y reacciona con las especies reactivas de oxígeno tales como superóxido y otros. Por otra parte cuando la isquemia es grave y prolongada el NO forma peroxinitrito (NOO^*) que es un radical altamente tóxico que induce la peroxidación de las biomoléculas, induce una falla de energía metabólica dentro de la neurona al inducir la nitrosilación de enzimas de la vía glucolítica tales como la gliceraldehido fosfato deshidrogenasa, la creatina-cinasa y la inactivación de la aconitasa y los complejos respiratorios mitocondriales I y II, en cuanto al DNA, el NO producido en la isquemia prolongada induce la inactivación de la ribonucleótido reductasa y la desaminación y ruptura de las bases del DNA lo que lleva a la activación de la poli-ADP-ribosa sintasa que vacía a la neurona de NADH y de ATP y lleva a la apoptosis de las neuronas (Iadecola, 1997).

4.15. Los receptores α 2-adrenérgicos y la protección contra la isquemia cerebral

La clonidina es un agonista de los receptores α -2 adrenérgicos y bloquea la liberación de DA inducida por isquemia en el cerebro (Miyazaki y col. 1989). Es relevante notar que la activación de los receptores noradrenérgicos presinápticos inhibe la liberación de catecolaminas en el estriado, hay estudios recientes que demuestran que el agonista α -2 adrenérgico, dexmetomidina, atenúa la liberación de NA en el estriado que ocurre después de ratas han sufrido de un evento de isquemia cerebral. Los agonistas α -2 adrenérgicos ejercen su efecto probablemente al disminuir la liberación de NA en el estriado (Matsumoto y col. 1993) y al inhibir la liberación de NA podrían a su vez disminuir la liberación de DA cerebral.

4.16. Los anestésicos como neuroprotectores de la isquemia cerebral

El pentobarbital es un anestésico que inhibe la liberación de DA en el estriado inducida por la isquemia cerebral (Bhardwaj y col. 1990). El pentobarbital protege contra los cambios provocados por la isquemia cerebral en el enlace de [3 H]SCH-23390, un compuesto que marca receptores de DA tipo D1 en el cerebro y de [3 H]-rolipram un compuesto inhibidor de las fosfodiesterasas dependientes de AMPc que marca dichas enzimas. Es posible que el pentobarbital medie su efecto protector neuronal al inhibir la liberación de DA y de aminoácidos excitatorios (Kanai y col. 1993).

En este mismo sentido, los compuestos anestésicos isoflurano y halotano pueden actuar como neuroprotectores en los casos de isquemia cerebral ya que

estos compuestos disminuyen la liberación de DA inducida por la isquemia cerebral (Koorn y col. 1993).

4.17. Los bloqueadores de canales de Na⁺ en la neuroprotección en la isquemia cerebral

Los compuestos con la capacidad de bloquear los canales de Na⁺ neuronales son capaces de proteger contra la muerte neuronal inducida por isquemia cerebral. Recientemente se ha observado que la Lifarizina un bloqueador de los canales de Na⁺ y de Ca²⁺, es capaz de bloquear la muerte neuronal en el estriado inducida por la isquemia cerebral (Brown y col. 1993). Otros investigadores también encuentran que la flunarizina un bloqueador de los canales de Na⁺ y de Ca²⁺ presinápticos reduce el daño neuronal inducido por isquemia en el cerebro (Zapater y col. 1997). La vinpocetina, un bloqueador de canales de Na⁺ protege contra la disminución post-isquemia en el enlace de agonistas del receptor de DA en el cerebro del gerbo que ocurren después de un evento de isquemia cerebral, ya que el enlace del compuesto dopaminérgico [³H]SCH-23390, agonista D1, en el estriado no es modificado si hay un pretratamiento con la vinpocetina indicando que induce neuroprotección en el estriado (Murakami y col. 1993). El rizulole un bloqueador de canal de Na⁺ suprime la liberación de DA evocada por NMDA, kainato y VRTD en el estriado de los animales; los compuestos mencionados (NMDA, kainato y VRTD) que inducen la liberación de DA en estos experimentos podrían representar condiciones que ocurren en la hipoxia cerebral indicando que el rizulole puede ser un buen neuroprotector en la isquemia cerebral (Keita y col. 1997).

4.18. Isquemia cerebral y el metabolismo de la DA en los sinaptosomas de estriado

Se han estudiado los efectos de la hipoxia cerebral sobre la síntesis de monoaminas en el cerebro, donde se ha mostrado que dicha condición induce un decrecimiento de la actividad de TH estriatal; la exposición de las ratas durante 2 h a un ambiente de 5% de oxígeno (20% es lo normal), induce un decline de la actividad de TH, así como una disminución de la concentración de DA y de HVA (Davis y Carlsson, 1973). Se han hecho estudios de como afecta la hipoxia cerebral el metabolismo de la DA, en dichos estudios muestran que a una concentración de oxígeno de 6%, la actividad de TH y la liberación de DA disminuyen, encuentran que en estas condiciones la adición de L-dopa restaura la liberación basal de DA, se observa una inhibición parcial de la actividad de la MAO por disminución de oxígeno y que en presencia de inhibidores de la TH la degradación de DA se retarda (Brown y col. 1975). La hipoxia induce cambios en el metabolismo de neuronas de DA en cultivo, esta condición induce un incremento marcado de los niveles de DA y DOPAC en el medio, dicho incremento de la DA y del DOPAC liberados al medio externo tiene un pico máximo y disminuye posteriormente (Gao y col. 1999).

4.19. Los cambios en el metabolismo de la DA en la isquemia cerebral

Estudios empleando voltametría han reportado que se producen cambios en el metabolismo de la DA en el estriado después de sufrir un episodio de isquemia cerebral transitoria ya que el pico detectado por voltametría que

corresponde a la DA y sus metabolitos se incrementa 600-900% (Ogura y col. 1989). Por otra parte algunos investigadores han estudiado como se comportan la concentración de DA y de sus metabolitos en un período de largo plazo (1-76 h) después de que los animales han sufrido un episodio de isquemia cerebral; encuentran que 15 minutos post-recuperación de la isquemia cerebral, la DA disminuye 56%, el DOPAC disminuye 40%, el HVA 64%, después de 24 h el HVA se eleva marcadamente, en 76 h la DA y metabolitos retornan a la normalidad (Frolich y col. 1993). Varios investigadores han encontrado un incremento de la concentración de radicales libres y del metabolismo de la DA en el estriado después de un episodio de isquemia cerebral, sugieren que el incremento de los radicales libres que se produce por la liberación de DA en la isquemia cerebral es inducido por una mayor cantidad de DA oxidada a través de la MAO (Ishii y col. 1993).

4.20. La MAO y la isquemia cerebral

En la médula espinal se ha mostrado que existe un transporte axonal de la MAO del soma a las terminales nerviosas en las neuronas y que el transporte axoplásmico de la MAO a las terminales sinápticas está inhibido después de someter las neuronas a la isquemia neuronal (Chavko y col. 1987), sugiriendo que en la médula espinal durante la isquemia neuronal la degradación de las catecolaminas pudiera estar inhibida ya que la MAO pudiera no trasladarse a las terminales. En este sentido es interesante mencionar que en el estriado los IMAO previenen la muerte de neuronas estriatales inducida por isquemia cerebral transitoria (Matsui y Kumagae, 1991). Por otra parte el pretratamiento con el IMAO

deprenil, previene el daño neuronal en el estriado y otras regiones cerebrales en las ratas expuestas a isquemia cerebral probablemente al inducir un incremento en la expresión de la superóxido-dismutasa, SOD, de la catalasa y por su capacidad para inhibir a la MAO (Knollema y col. 1995).

La isquemia neuronal induce un incremento de DOPAC en el tejido estriatal y un decremento de DOPAC en el medio externo en el estriado indicando que existe un sistema de transporte activo del metabolito que involucra el uso de ATP y que dicho transporte de DOPAC es bloqueado en la isquemia cerebral (Phebus y col. 1995).

VII. REFERENCIAS

A

- Adam-Vizi V. (1992). External Ca^{2+} -independent release of neurotransmitters. *J Neurochem.* 58: 395-405.
- Ahlskog JE, Uitti RJ, Low PA, Tyce GM, O'Brien JF, Nickander KK. (1996a). Levodopa and deprenyl treatment effects on peripheral indices of oxidant stress in Parkinson's disease. *Neurology.* 46: 796-801.
- Ahlskog JE, Uitti RJ, Tyce GM, O'Brien JF, Petersen RC, Kokmen E. (1996b). Plasma catechols and monoamine oxidase metabolites in untreated Parkinson's and Alzheimer's diseases. *J Neurol Sci.* 136: 162-168.
- Ahn SS, Blaha CD, Alkire MT, Wood E, Gray-Allan P, Marrocco RT, Moore WS. (1991). Biphasic striatal dopamine release during transient ischemia and reperfusion in gerbils. *Stroke.* 22: 674-679.
- Akiyama Y, Ito A, Koshimura K, Ohue T, Yamagata S, Miwa S, Kikuchi H. (1991). Effects of transient forebrain ischemia and reperfusion on function of dopaminergic neurons and dopamine reuptake in vivo in rat striatum. *Brain Res.* 561: 120-127.
- Amara SG, Kuhar MJ. (1993). Neurotransmitter transporters: recent progress. *Annu Rev Neurosci.* 16: 73-93.
- Ames A 3rd, Li YY, Heher EC, Kimble CR. (1992). Energy metabolism of rabbit retina as related to function: high cost of Na^+ transport. *J Neurosci.* 12: 840-853.
- Andine P, Jacobson I, Hagberg H. (1988). Calcium uptake evoked by electrical stimulation is enhanced postischemically and precedes delayed neuronal death in CA1 of rat hippocampus: involvement of N-methyl-D-aspartate receptors. *J Cereb Blood Flow Metab.* 8: 799-807.
- Andric SA, Kostic TS, Tomic M, Koshimizu T, Stojilkovic SS. (2001). Dependence of soluble guanylyl cyclase activity on calcium signaling in pituitary cells. *J Biol Chem.* 276: 844-849.
- Andrus PK, Fleck TJ, Oostveen JA, Hall ED. (1997). Neuroprotective effects of the novel brain-penetrating pyrrolopyrimidine antioxidants U-101033E and U-104067F against post-ischemic degeneration of nigrostriatal neurons. *J Neurosci Res.* 47: 650-654.

Andsberg G, Kokaia Z, Bjorklund A, Lindvall O, Martinez-Serrano A. (1998). Amelioration of ischaemia-induced neuronal death in the rat striatum by NGF-secreting neural stem cells. *Eur J Neurosci*. 10: 2026-2036.

Arakawa S, Nakamura S, Kawashima N, Nishiike S, Okuyama S. (1995). Antagonizing effects of vinpocetine on reduced activity of rat I. ceruleus following head injury or intravenous clonidine. *Life Sci*. 57: 1803-1810.

Araki T, Kogure K. (1989). Prevention of delayed neuronal death in gerbil hippocampus by vinpocetine. *Mol Chem Neuropathol*. 11: 33-43.

Araki T, Kogure K, Nishioka K. (1990a). Comparative neuroprotective effects of pentobarbital, vinpocetine, flunarazine and ifenprodil on ischemic neuronal damage in gerbil hippocampus. *Res Exp Med*. 190: 19-23.

Araki T, Nishioka K, Yuki S, Kogure K. (1990b). Vinpocetine prevent ischemic neuronal damage in rat hippocampus. *Acta Neurol Scand*. 81: 173-176.

Araki T, Kogure K, Murakami M. (1991a). Prevention of abnormal calcium accumulation in postischemic gerbil brain by vinconate. *Acta Neurol Scand*. 83: 155-160.

Araki T, Kato H, Kogure K. (1991b). Comparative protective effects of vinconate, baclofen and pentobarbital against neuronal damage following repeated brief cerebral ischemia in gerbil brain. *Res Exp Med*. 191: 371-378.

Araki T, Kato H, Kogure K. (1992a). Protective effects of vinpocetine against the alterations in binding sites of second messengers after transient cerebral ischemia in gerbils. *Gen Pharmacol*. 23: 115-121.

Araki T, Kato H, Kogure K. (1992b). Mapping of second messenger and rolipram receptors in mammalian brain. *Brain Res Bull*. 28: 843-848.

Araki T, Kato H, Kogure K. (1992c). Protective effect of vinconate, a novel vinca alkaloid derivative, on glucose utilization and brain edema in a new rat model of middle cerebral artery occlusion. *Gen Pharmacol*. 23: 141-146.

Araki T, Kanai Y, Kato H, Kogure K, Shuto K, Ishida Y. (1993a). Effect of vinconate against regional age-related changes in the gerbil brain. *Pharmacol. Biochem Behav*. 44: 17-25.

Araki T, Kanai Y, Murakami F, Kato H, Kogure K. (1993b). Changes of [³H]cyclic adenosine monophosphate binding in the gerbil brain following transient cerebral ischemia: an autoradiographic study and investigation of the effects of vinconate and pentobarbital. *Res Exp Med (Berl)*. 193: 57-64.

Araki T, Kato H, Shuto K, Fujiwara T, Kogure K, Itoyama Y. (1996). Effects of cerebral ischemia on dopamine receptors in the gerbil striatum. *Eur J Pharmacol.* 306: 73-79.

Araki T, Kato H, Shuto K, Fujiwara T, Itoyama Y. (1997). Effect of cerebral ischemia on dopamine receptors and uptake sites in the gerbil hippocampus. *Eur Neuropsychopharmacol.* 7: 275-282

Arias B, Duran R, Alfonso M. (1998). In vivo release of dopamine and its metabolites from rat striatum in response to domoic acid. *Neurochem Res.* 23: 1509-1514.

Astrup J. (1982). Energy-requiring cell functions in the ischemic brain. Their critical supply and possible inhibition in protective therapy. *J Neurosurg.* 56: 482-497.

Ashton AC, Dolly JO. (1988). Characterization of the inhibitory action of botulinum neurotoxin type A on the release of several transmitters from rat cerebrocortical synaptosomes. *J Neurochem.* 50: 1808-1816.

Ayala CA, Jaffe EH. (1993). Pharmacological modulation of endogenous dopamine and DOPAC outflow from nucleus accumbens. *Neuropharmacology.* 32: 1401-1409.

B

Baker AJ, Zornow MH, Scheller MS, Yaksh TL, Skilling SR, Smullin DH, Larson AA, Kuczenski R. (1991). Changes in extracellular concentrations of glutamate, aspartate, glycine, dopamine, serotonin, and dopamine metabolites after transient global ischemia in the rabbit brain. *J Neurochem.* 57: 1370-1379.

Balestreri R, Fontana L, Astengo F. (1987). A double-blind placebo controlled evaluation of the safety and efficacy of vinpocetine in the treatment of patients with chronic vascular senile cerebral dysfunction. *J Am Geriatr Soc.* 35: 425-430.

Bauerfeind R, Galli T, De Camilli P. (1996). Molecular mechanisms in synaptic vesicle recycling. *J Neurocytol.* 25: 701-715.

Beavo JA, Reifsnyder DH. (1990). Primary sequence of nucleotid cyclic phosphodiesterase isoenzymes and design of selective inhibitors. *Trends Pharmacol. Sci.* 11: 150-155.

Beavo JA, Conti M, Heaslip RJ. (1994). Multiple nucleotide phosphodiesterases. *Mol Pharmacol.* 46: 399-405.

Becker A, Grecksch G. (1995). Nootropic drugs have different effects on kindling-induced learning deficits in rats. *Pharmacol. Res.* 32: 115-122.

Bencsath P, Debreczeni L, Takacs L. (1976). Effect of ethyl apovincamate on cerebral circulation of dogs under normal conditions and in arterial hypoxia. *Arzneimittelforschung*. 26: 1920-1923.

Benfenati F, Cimino M, Zoli M, Grimaldi R, Zini I, Agnati LF. (1991a). Decrease in mRNA levels but not in the density of D2 dopamine receptors in rat striatum after transient forebrain ischemia. *Neurosci Lett*. 126: 6-8.

Benfenati F, Pich EM, Zoli M, Grimaldi R, Fuxe K, Agnati LF. (1991b). Changes in striatal mu and delta opioid receptors after transient forebrain ischemia: a quantitative autoradiographic study. *Brain Res*. 546: 171-175.

Bennett MK, Scheller RH. (1993). The molecular machinery for secretion is conserved from yeast to neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90: 2559-2563.

Bentue-Ferrer D, Decombe R, Saïag B, Allain H, Van den Driessche J. (1993). L-type voltage-dependent calcium channels do not modulate aminergic neurotransmitter release induced by transient global cerebral ischaemia: an in vivo microdialysis study in rat. *Exp Brain Res*. 93: 288-92.

Bereczki D, Fekete I. (1999). A systematic review of vinpocetine therapy in acute ischemia stroke. *Eur J Clin Pharmacol*. 55: 349-352.

Berman SB, Hastings TG. (1997). Inhibition of glutamate transporter in synaptosomes by dopamine oxidation and reactive oxygen species. *J Neurochem*. 69: 1185-1195.

Bhardwaj A, Brannan T, Weinberger J. (1990). Pentobarbital inhibits extracellular release of dopamine in the ischemic striatum. *J Neural Transm Gen Sect*. 82: 111-117.

Bhatti JZ, Hindmarch I. (1987). Vinpocetine effects on cognitive impairments produced by flunitrazepam. *Int Clin Psychopharmacol*. 2: 325-331.

Biro K, Karpati E, Szporny L. (1976). Protective activity of ethyl apovincamate on ischaemic anoxia of the brain. *Arzneimittelforschung*. 26: 1918-1920.

Block F, Schwarz M. (1996). Memantine reduces functional and morphological consequences induced by global ischemia in rats. *Neurosci Lett*. 208: 41-44.

Boening JA, Kass IS, Cottrell JE, Chambers G. (1989). The effect of blocking sodium influx on anoxic damage in the rat hippocampal slice. *Neuroscience*. 33: 263-268.

Bonanno G, Raiteri M. (1987). Coexistence of carriers for dopamine and GABA uptake on a same nerve terminal in the rat brain. *Br J Pharmacol*. 91: 237-243.

Bonnet JJ, Costentin J. (1986). GBR 12783, a potent and selective inhibitor of dopamine uptake: biochemical studies in vivo and ex vivo. *Eur J Pharmacol.* 121: 199-209.

Bonnet JJ, Costentin J. (1989). Correlation between [³H]dopamine specific uptake and [³H]GBR 12783 specific binding during the maturation of rat striatum. *Life Sci.* 44: 1759-1765.

Bonoczk P, Balazs G, Adam-Vizi V, Andras N, Karpati E, Kiss B, Kapas M, Szantai C, Koncz I, Zelles T, Vas A. (2000). Role of sodium channel inhibition in neuroprotection: Effect of vinpocetine. *Brain Res Bull.* 53: 245-254.

Borkowska HD, Oja SS, Oja OS, Saransaari P, Hilgier W, Albrecht J. (1999). N-methyl-D-aspartate-evoked changes in the striatal extracellular levels of dopamine and its metabolites in vivo in rats with acute hepatic encephalopathy. *Neurosci Lett.* 268: 151-154.

Borlongan CV, Martinez R, Shytle RD, Freeman TB, Cahill DW, Sanberg PR, (1995). Striatal dopamine-mediated motor behavior is altered following occlusion of the middle cerebral artery. *Pharmacol. Biochem Behav.* 52: 225-229.

Borzeix MG, Cahn J. (1984). Cerebral antioedematous effect of Teproside and of some vincamine derivatives. *Int J Clin Pharmacol Res.* 4: 259-261.

Brown RM, Kehr W, Carlsson A. (1975). Functional and biochemical aspects of catecholamine metabolism in brain under hypoxia. *Brain Res.* 85: 491-509.

Brown CM, Calder C, Alps BJ, Spedding M. (1993). The effect of lifarizine (RS-87476), a novel sodium and calcium channel modulator, on ischaemic dopamine depletion in the corpus striatum of the gerbil. *Br J Pharmacol.* 109: 175-177.

Brown JM, Hanson GR, Fleckenstein AE. (2001). Regulation of the vesicular monoamine transporter-2: a novel mechanism for cocaine and other psychostimulants. *J Pharmacol Exp Ther.* 296: 762-767.

Buisson A, Callebert J, Mathieu E, Plotkine M, Boulu RG. (1992). Striatal protection induced by lesioning the substantia nigra of rats subjected to focal ischemia. *J Neurochem.* 59: 1153-1157.

Bukanova YuV, Solntseva EI. (1998). Nootropic agent vinpocetine blocks delayed rectified potassium currents more strongly than high-threshold calcium currents. *Neurosci Behav Physiol.* 28: 116-120.

Buu NT. (1989). Modification of vesicular dopamine and norepinephrine by monoamine oxidase inhibitors. *Biochem Pharmacol.* 38: 1685-1692.

Buyukuysal RL, Mete B. (1999). Anoxia-induced dopamine release from rat striatal slices: involvement of reverse transport mechanism. *J Neurochem.* 72: 1507-1515.

C

Calakos N, Scheller RH. (1996). The synaptic vesicle biogenesis, docking, and fusion: a molecular approach. *Physiol Rev.* 76: 1-29.

Caldwell MA, Reymann JM, Allain H, Leonard BE, Bentue-Ferrer D. (1997). Lisuride prevents learning and memory impairment and attenuates the increase in extracellular dopamine induced by transient global cerebral ischemia in rats. *Brain Res.* 771: 305-318.

Cao CJ, Shamo AE, Eldefrawi ME. (1990). Cocaine-sensitive, ATP-dependent dopamine uptake into striatal synaptosomes. *Biochem Pharmacol.* 39: R9-14.

Carruba MO, Picotti GB, Zambotti F, Mantegazza P. (1977). Mazindol and amphetamine as inhibitors of the uptake and releasers of [³H]-dopamine by rat striatal synaptosomes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 298: 1-5.

Carter C, Benavides J, Legendre P, Vincent JD, Noel F, Thuret F, Lloyd KG, Arbillia S, Zivkovic B, MacKenzie ET, et al. (1988). Ifenprodil and SL 82.0715 as cerebral anti-ischemic agents. II. Evidence for N-methyl-D-aspartate receptor antagonist properties. *J Pharmacol. Exp Ther.* 247: 1222-1232.

Carvalho CM, Ferreira IL, Duarte CB, Malva JO, Tretter L, Adam-Vizi V, Carvalho AP. (1995). Relation of [Ca^{2+}]_i to dopamine release in striatal synaptosomes: role of Ca^{2+} channels. *Brain Res.* 669: 234-244.

Casale R, Giorgi I, Guarnaschelli C. (1984). Evaluation of the effect of vincamine treposilate on behavioral performance of patients affected with chronic cerebrovascular disease. *Int J Clin pharmacol Res.* 4: 313-319.

Cataldi M, Secondo A, D'alessio A, Sarnacchiaro F, Colao AM, Amoroso S, DiRenzo GF, Annunziato L. (1999). Involvement of phosphodiesterase-GMPc-PKG pathway in intracellular Ca^{2+} oscillations in pituitary GH3 cells. *Biochim Biophys Acta.* 1449: 186-193.

Catterall WA. (2000). From ionic to molecular mechanisms. The structure and function of voltage gated sodium channels. *Neuron.* 26: 13-25.

Chapman CD, Gazzara RA, Howard SG. (1990). Effects of phencyclidine on extracellular levels of dopamine, dihydroxyphenylacetic acid and homovanillic acid in conscious and anesthetized rats. *Neuropharmacology.* 29: 319-325.

Choi DW. (1995). Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death. *Trends Neurosci.* 18: 58-60.

Chagraoui A, Bonnet JJ, Protais P, Costentin J. (1987). In vivo binding of [³H]GBR 12783, a selective dopamine uptake inhibitor, in mouse striatum. *Neurosci Lett.* 78: 175-179.

Chang CJ, Ishii H, Yamamoto H, Yamamoto T, Spatz M. (1993). Effects of cerebral ischemia on regional dopamine release and D1 and D2 receptors. *J Neurochem.* 60: 1483-1490.

Chavko M, Helemikova A, Marsala J. (1987). Axoplasmic transport of monoamine oxidase after ischemia. *Exp Neurol.* 98: 205-211.

Chiu PJ, Tetzloff G, Ahn HS, Sybertz EJ. (1988). Comparative effects of vinpocetine and 8-Br-cyclic GMP on the contraction and ⁴⁵Ca-fluxes in the rabbit aorta. *Am J Hypertens.* 1 (3 Pt 1): 262-268.

Cho S, Volpe BT, Bae Y, Hwang O, Choi HJ, Gal J, Park LC, Chu CK, Du J, Joh TH. (1999). Blockade of tetrahydrobiopterin synthesis protects neurons after transient forebrain ischemia in rat: a novel role for the cofactor. *J Neurosci.* 19: 878-889.

Clemens JA, Phebus LA. (1988). Dopamine depletion protects striatal neurons from ischemia-induced cell death. *Life Sci.* 42: 707-713.

Colliver TL, Pyott SJ, Achalabun M, Ewing AG. (2000). VMAT-Mediated changes in quantal size and vesicular volume. *J Neurosci.* 20: 5276-5282.

Cooper DO, Carlson KR. (1983). Rapid determination of dopamine uptake in synaptosomal preparations. *J Neurosci Methods.* 9: 157-162.

D

Dagani F, Ferrari R, Canevari L. (1990). A pharmacological model for studying the role of Na⁺ gradients in the modulation of synaptosomal free [Ca²⁺]_i levels and energy metabolism. *Brain Res.* 530: 261-266.

David JC, Coulon JF, Cavoy A, Delacour J. (1989). Effects of aging on p- and m-octopamine, catecholamines, and their metabolizing enzymes in the rat. *J Neurochem.* 53: 149-154.

Davis JN, Carlsson A. (1973). The effect of hypoxia on monoamine synthesis, levels and metabolism in rat brain. *J Neurochem.* 21: 783-790.

De Camilli P, Takei K. (1996). Molecular mechanisms in synaptic vesicle endocytosis and recycling. *Neuron.* 16: 481-486.

De Noble VJ, Repetti SJ, Gelpe LW, Wood LM, Keim KL. (1986). Vinpocetine:

nootropic effects on scopolamine induced and hypoxia induced retrieval deficits of a step through passive avoidance response in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 24: 1123-1128.

De Noble VJ. (1987). Vinpocetine enhances retrieval of a step-through passive avoidance response in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 26: 183-186.

Delbarre B, Delbarre G, Rochat C, Calinon F. (1995). Effect of piribedil, a D-2 dopaminergic agonist, on dopamine, amino acids, and free radicals in gerbil brain after cerebral ischemia. *Mol Chem Neuropathol*. 26: 43-52.

Dethy S, Laute MA, Togasaki DM, Przedborski S, Damhaut P, Thiry P, Hildebrand J, Goldman S. (1996). Systemic and intrastriatal theophylline have opposite effects on dopamine and dopamine metabolites measured by intrastriatal microdialysis in the rat. *Neurosci Lett*. 208: 159-162.

Di Chiara G. (1991). Brain dialysis of monoamines. In *microdialysis in neuroscience. Techniques in behavioral and neural sciences vol 7*. Huston JP. Serie editor. Robinson JE, Justice JB. Editors. Elsevier. Pag. 175-188.

Di Monte DA, De Lanney LE, Irwin I, Royland JE, Chan P, Jakowec MW, Langston JW. (1996). Monoamine oxidase-dependent metabolism of dopamine in the striatum and substantia nigra of L-DOPA-treated monkeys. *Brain Res*. 738: 53-59.

Dietrich WD, Busto R, Alonso O, Globus MY, Ginsberg MD. (1993). Intraischemic but not postischemic brain hypothermia protects chronically following global forebrain ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*. 13: 541-549.

Dietze S, Kuschinsky K. (1994). Effect of conditioning with d-amphetamine on the extracellular concentration of dopamine and its metabolites in the striatum of behaving rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 350: 22-27.

Dluzen DE, Anderson LI. (1998). The effects of nicotine on dopamine and DOPAC output from rat striatal tissue. *Eur J Pharmacol*. 341: 23-32.

Domanska-Janik K, Lazarewicz J, Noremborg K, Strosznajder J, Zalewska T, (1985). Metabolic disturbances of synaptosomes isolated from ischemic gerbil brain. *Neurochem Res*. 10: 649-665.

Dragunow M, Young D, Hughes P, MacGibbon G, Lawlor P, Singleton K, Sirimanne E, Beilharz E, Gluckman P. (1993). Is c-Jun involved in nerve cell death following status epilepticus and hypoxic-ischaemic brain injury?. *Brain Res Mol Brain Res*. 18: 347-352.

Dubocovich ML, Zahniser NR. (1985). Binding characteristics of the dopamine uptake inhibitor [³H]nomifensine to striatal membranes. *Biochem Pharmacol*. 34: 1137-1144.

Dubois A, Benavides J, Peny B, Duverger D, Fage D, Gotti B, MacKenzie ET, Scatton B. (1988). Imaging of primary and remote ischaemic and excitotoxic brain lesions. An autoradiographic study of peripheral type benzodiazepine binding sites in the rat and cat. *Brain Res.* 445: 77-90.

Dyck LE, Durden DA, Boulton AA. (1993). Effects of monoamine oxidase inhibitors on the acid metabolites of some trace amines and of dopamine in the rat striatum. *Biochem Pharmacol.* 45: 1317-1322.

E

Edelmann L, Hanson PI, Chapman ER, Jahn R. (1995). Synaptobrevin binding to synaptophysin: a potential mechanism for controlling the exocytotic fusion machine. *EMBO J.* 14: 224-231.

Elchisak MA, Maas JW, Roth RH. (1977). Dihydroxyphenylacetic acid conjugate: natural occurrence and demonstration of probenecid-induced accumulation in rat striatum, olfactory tubercles and frontal cortex. *Eur J Pharmacol.* 41: 369-378.

Elo HA, MacDonald E. (1989). Effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) on biogenic amines and their acidic metabolites in brain and cerebrospinal fluid of rats. *Arch Toxicol.* 63: 127-130.

Elverfors A, Nissbrandt H. (1992). Effects of d-amphetamine on dopaminergic neurotransmission; a comparison between the substantia nigra and the striatum. *Neuropharmacology.* 31: 661-670.

Erdo SL, Cai NS, Wolff JR, Kiss B. (1990). Vinpocetin protects against excitotoxic cell death in primary cultures of rat cerebral cortex. *Eur J Pharmacol.* 187: 551-553.

Erdo SA, Molnar P, Lakics V, Bence JZ, Tomoskozi Z. (1996). Vincamine and vincanol are potent blockers of voltage-gated Na⁺ channels. *Eur J Pharmacol.* 314: 69-73.

Erecinska M, Silver IA. (1989). ATP and brain function. *J Cereb Blood Flow Metab.* 9: 2-19.

Erecinska M, Dagani F. (1990). Relationships between the neuronal sodium/potassium pump and energy metabolism. Effects of K⁺, Na⁺, and adenosine triphosphate in isolated brain synaptosomes. *J Gen Physiol.* 95: 591-616.

Erecinska M, Dagani F, Nelson D, Deas J, Silver IA. (1991). Relationship between intracellular ions and energy metabolism: A study with monensin in synaptosomes, neurons and C6 glioma cells. *J Neurosci* 11: 2410-2421.

Erickson JD, Eiden LE, Hoffman BJ. (1992). Expression cloning of a reserpine-sensitive vesicular monoamine transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89: 10993-10997.

F

Fairbrother IS, Arbutnott GW, Kelly JS, Butcher SP. (1990). In vivo mechanisms underlying dopamine release from rat nigrostriatal terminals: I. Studies using veratrine and ouabain. *J Neurochem.* 54: 1834-1843.

Ferger B, Eberhardt O, Teismann P, de Groote C, Schulz JB. (1999). Malonate-induced generation of reactive oxygen species in rat striatum depends on dopamine release but not on NMDA receptor activation. *J Neurochem.* 73: 1329-1332.

Filloux FM, Adair J, Narang N. (1996). The temporal evolution of striatal dopamine receptor binding and mRNA expression following hypoxia-ischemia in the neonatal rat. *Brain Res Dev Brain Res.* 94: 81-91.

Fitos I, Visy J, Simonyi M. (1991). Binding of vinca alkaloid analogues to human serum albumin and to alpha 1-acid glycoprotein. *Biochem Pharmacol.* 41: 377-383.

Fix JA, Rutledge CO. (1978). Alterations in the buoyant density of noradrenergic and dopaminergic synaptosomes following neurotransmitter accumulation. *Brain Res.* 159: 402-405.

Fleckenstein AE, Haughey HM, Metzger RR, Kokoshka JM, Riddle EL, Hanson JE, Gibb JW, Hanson GR. (1999). Differential effects of psychostimulants and related agents on dopaminergic and serotonergic transporter function. *Eur J Pharmacol.* 382: 45-49.

Fredholm BB, Lindgren E, Lindstrom K, Vernet L. (1983). The effect of some drugs with purported antianoxic effect on veratridine induced purine release from isolated hypothalamic synaptosomes. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenhagen).* 53: 236-244.

Freeman K, Lin P, Lin L, Blank CL. (1993). Monoamines and metabolites in the brain. In *HPLC in neuroscience research*. Edited by Holman RB, Cross AJ, Joseph MH, 1993. IBRO, Published by John Wiley and sons. Pag. 28-55.

Friedman JE, Haddad GG. (1993). Major differences in $[Ca^{2+}]_i$ response to anoxia between neonatal and adult rat CA1 neurons: role of $[Ca^{2+}]_o$ and $[Na^+]_o$. *J Neurosci.* 13: 63-72.

Friedman JE, Haddad GG. (1994a). Removal of extracellular sodium prevents anoxia-induced injury in freshly dissociated rat CA1 hippocampal neurons. *Brain Res.* 641: 57-64.

Friedman JE, Haddad GG. (1994a). Removal of extracellular sodium prevents anoxia-induced injury in freshly dissociated rat CA1 hippocampal neurons. *Brain Res.* 641: 57-64.

Friedman JE, Haddad GG. (1994b). Anoxia induces an increase in intracellular sodium in rat central neurons in vitro. *Brain Res.* 663: 329-334.

Frolich L, Dirr A, Riederer P, Hoyer S. (1993). Effects of long-term recovery from transient cerebral ischemia in rat brain: tissue levels of acetylcholine, monoamines, and their metabolites. *Neurochem Res.* 18: 1239-1244.

Fujita M, Shimada S, Tohyama M, Nishimura T. (1996). Visualization of ischemic insult in caudate putamen with beta-CIT. *J Nucl Med.* 37: 1214-1218.

Fuller RW, Snoddy HD. (1979). Effect of mazindol on brain dopamine turnover in spiperone-treated rats. *J Neural Transm.* 44: 13-19.

Funk KF, Schmidt J. (1984). Changes of dopamine metabolism by hypoxia and the effect of nootropic drugs. *Biomed Biochim Acta.* 43: 1301-1304.

G

Gaal L, Molnar P. (1990). Effect of vinpocetine on noradrenergic neurons in rat locus coeruleus. *Eur J Pharmacol.* 187: 537-539.

Galarraga E, Hernandez-Lopez S, Reyes A, Barral J, Bargas J. (1997). Dopamine facilitates striatal EPSPs through an L-type Ca^{2+} conductance. *Neuroreport.* 8: 2183-6.

Gao J, Gross J, Andreeva N, Glatzel E, Grutzmann H, Heldt J, Husemann B, Jamielson L, Andersson K. (1999). Hypoxia induces differential changes of dopamine metabolism in mature and immature mesencephalic and diencephalic cell cultures. *J Neural Transm.* 106: 111-122.

Garrett MC, Soares-da-Silva P. (1990). Role of type A and B monoamine oxidase on the formation of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) in tissues from the brain of the rat. *Neuropharmacology.* 29: 875-879.

Gartshore G, Dawson D, Patterson J, Macrae IM. (1996). Consequences of transient focal cerebral ischaemia for second messenger and neurotransmitter binding in the rat: quantitative autoradiographic analysis of forskolin, dopamine D1 receptor binding and cerebral blood flow changes. *Eur J Neurosci.* 8: 486-493.

Geppert M, Sudhof TC. (1998). Rab3 and synaptotagmin: The ying and yang of synaptic membrane fusion. *Ann. Rev. Neurosci.* 21: 75-95.

Gerhardt GA, Maloney RE Jr. (1999). Microdialysis studies of basal levels and stimulus-evoked overflow of dopamine and metabolites in the striatum of young and aged Fischer 344 rats. *Brain Res.* 816: 68-77.

Giros B, el Mestikawy S, Godinot N, Zheng K, Han H, Yang-Feng T, Caron MG. (1992). Cloning, pharmacological characterization, and chromosome assignment of the human dopamine transporter. *Mol Pharmacol.* 42: 383-390.

Gleitz J, Beile A, Khan S, Wilffert B, Tegtmeier F. (1993). Anaerobic glycolysis and postanoxic recovery of respiration of rat cortical synaptosomes are reduced by synaptosomal sodium load. *Brain Res.* 611: 286-294.

Globus MY, Ginsberg MD, Harik SI, Busto R, Dietrich WD. (1987). Role of dopamine in ischemic striatal injury: metabolic evidence. *Neurology.* 37: 1712-1719.

Globus MY, Busto R, Dietrich WD, Martinez E, Valdes I, Ginsberg MD. (1988a). Effect of ischemia on the *in vivo* release of striatal dopamine, glutamate, and gamma-aminobutyric acid studied by intracerebral microdialysis. *J Neurochem.* 51: 1455-1464.

Globus MY, Busto R, Dietrich WD, Martinez E, Valdes I, Ginsberg MD. (1988b). Intra-ischemic extracellular release of dopamine and glutamate is associated with striatal vulnerability to ischemia. *Neurosci Lett.* 91: 36-40.

Goldberg WJ, Kadingo RM, Barrett JN. (1986). Effects of ischemia-like conditions on cultured neurons: protection by low Na^+ , low Ca^{2+} solutions. *J Neurosci.* 6: 3144-3151.

Goldberg MP, Choi DW. (1993). Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury. *J Neurosci.* 13: 3510-3524.

Graybiel AM, Moratalla R. (1989). Dopamine uptake sites in the striatum are distributed differentially in striosome and matrix compartments. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86: 9020-9024.

Grimm JW, See RE. (1998). Unique activation of extracellular striato-pallidal neurotransmitters in rats following acute risperidone. *Brain Res.* 801: 182-189.

Gross J, Berndt CH, Lun A, Gruetzmann H, Wustmann CH, Fischer HD. (1989). Influence of hypoxia on the release of DA from striatal preparations of rats. *Biomed Biochim Acta.* 48: S178-182.

Gulyas B, Halldin C, Karlsson P, Chou YH, Swahn CG, Bonock P, Paroczai M, Farde L. (1999). Brain uptake and plasma metabolism of ^{11}C vinpocetine : preliminary PET study in cynomolgus monkey. *J Neuroimaging*. 9: 217-222.

H

Hadjiev D, Yancheva S. (1976). Rheoencephalographic and psychological studies with ethyl apovincamate in cerebral vascular insufficiency. *Arzneimittelforschung*. 26: 1947-1950.

Hagiwara M, Endo T, Hidaka H. (1984). Effects of vinpocetine on cyclic nucleotide metabolism in vascular smooth muscle. *Biochem Pharmacol*. 33: 453-457.

Hagstadius S, Gustafson L, Risberg J. (1984). The effects of bromvincamine and vincamine on regional cerebral blood flow and mental functions in patients with multi-infarct dementia. *Psychopharmacol. (Berl)* 83: 321-326.

Haigney MC, Miyata H, Lakatta EG, Stern MD, Silverman HS. (1992). Dependence of hypoxic cellular calcium loading on $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ exchange. *Circ Res*. 71: 547-557.

Hall ED, Andrus PK, Oostveen JA, Althaus JS, Von Voigtlander PF. (1996). Neuroprotective effects of the dopamine D2/D3 agonist pramipexole against postischemic or methamphetamine-induced degeneration of nigrostriatal neurons. *Brain Res*. 742: 80-88.

Hanson PI, Heuser JE, Jahn R. (1997). Neurotransmitter release - four years of SNARE complexes. *Curr Opin Neurobiol*. 7: 310-315.

Harik SI, Yoshida S, Busto R, Ginsberg MD. (1986). Monoamine neurotransmitters in diffuse reversible forebrain ischemia and early recirculation: increased dopaminergic activity. *Neurology*. 36: 971-976.

Hattori A, Luo Y, Umegaki H, Munoz J, Roth GS. (1998). Intra-striatal injection of dopamine results in DNA damage and apoptosis in rats. *Neuroreport*. 9: 2569-2572.

Hernandez-Lopez S, Bargas J, Surmeier DJ, Reyes A, Galarraga E. (1997). D1 receptor activation enhances evoked discharge in neostriatal medium spiny neurons by modulating an L-type Ca^{2+} conductance. *J Neurosci*. 17: 3334-42.

Hernandez-Lopez S, Tkatch T, Perez-Garci E, Galarraga E, Bargas J, Hamm H, Surmeier DJ. (2000). D2 dopamine receptors in striatal medium spiny neurons reduce L-type Ca^{2+} currents and excitability via a novel PLC[β 1]-IP3-calcineurin-signaling cascade. *J Neurosci*. 20: 8987-95.

Herrera AJ, Machado A, Cano J. (1991). The influence of age on neurotransmitter turnover in the rat's superior colliculus. *Neurobiol Aging*. 12: 289-294.

Hillered L, Hallstrom A, Segersvard S, Persson L, Ungerstedt U. (1989). Dynamics of extracellular metabolites in the striatum after middle cerebral artery occlusion in the rat monitored by intracerebral microdialysis. *J Cereb Blood Flow Metab.* 9: 607-616.

Himori N, Suzuki T, Ueno K. (1995). Aniracetam, a pyrrolidinone-type cognition enhancer, attenuates the hydroxyl free radical formation in the brain of mice with brain ischaemia. *J Pharm Pharmacol.* 47: 253-258.

Hindmarch I, Fuchs HH, Erzigkeit H. (1991). Efficacy and tolerance of vinpocetine in ambulant patients suffering from mild to moderate organic psychosyndromes. *Int Clin Psychopharmacol.* 6: 31-43.

Hirata H, Ogawa N, Haba K, Asanuma M, Chou H, Mori A. (1992). Effects of chronic administration of lisuride hydrogen maleate on aromatic amine and metabolite levels in the gerbil brain following bilateral common carotid ligation. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 315: 5-15.

Hofmann M, Battaini F, Tonon G, Trabucchi M, Spano P. (1979). Interaction of sulpride and ergot derivatives on rat brain DOPAC concentration and prolactin secretion in vivo. *Eur J Pharmacol.* 56: 15-20.

Hollingsworth EB, McNeal ET, Burton JL, Williams RJ, Daly JW, Creveling CR. (1985). Biochemical characterization of filtered synaptoneurosome preparation from guinea pig cerebral cortex: AMPc-generating systems, receptors and enzymes. *J Neurosci* 5: 2240-2253.

Hoyt KR, Reynolds IJ, Hastings TG. (1997). Mechanisms of dopamine-induced cell death in cultured rat forebrain neurons: interactions with and differences from glutamate-induced cell death. *Exp Neurol.* 143: 269-281.

Hunt P, Kannengiesser M, Raynaud J. (1974). Nomifensine: a new potent inhibitor of dopamine uptake into synaptosomes from rat brain corpus striatum. *J Pharm Pharmacol.* 26: 370-371.

I

Iadecola C. (1997). Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends Neurosci.* 20: 132-139.

Iino T, Katsura M, Kuriyama K. (1992). Protective effects of vinconate on ischemia induced neuronal damage in rat hippocampus. *Eur J Pharmacol.* 224: 117-124.

Imamoto T, Tanabe M, Shimamoto N, Kawazoe K, Hirata M. (1984). Cerebral circulatory and cardiac effects of vinpocetine and its metabolite, apovincaminic acid in anesthetized dogs. *Arzneimittelforschung* 34: 161-169.

Inoue H, Ochi M, Shibata S, Watanabe S. (1995). Effects of transient forebrain ischemia on long-term enhancement of dopamine release in rat striatal slices. *Brain Res.* 671: 95-99.

Ishihara K, Katsui H, Sugimura M, Satoh M. (1989). Idebedone and vinpocetine augment long term potentiation in hippocampal slices in the guinea pig. *Neuropharmacol.* 28: 569-573.

Ishii H, Stanimirovic DB, Chang CJ, Mrsulja BB, Spatz M. (1993). Dopamine metabolism and free-radical related mitochondrial injury during transient brain ischemia in gerbils. *Neurochem Res.* 18: 1193-1201.

Ishimaru H, Ikarashi Y, Takahashi A, Maruyama Y. (1993). Acute neurochemical changes in mouse brain following cerebral ischemia. *Eur Neuropsychopharmacol.* 3: 485-491.

Iversen LL, Snyder SH. (1968). Synaptosomes: different populations storing catecholamines and gamma-aminobutyric acid in homogenates of rat brain. *Nature.* 220: 796-798.

J

Jackson DM, Martin LP, Larsson LG, Cox RF, Waszczak BL, Ross SB. (1990). Behavioural, biochemical and electrophysiological studies on the motor depressant and stimulant effects of bromocriptine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 342: 290-299.

Jahkel M, Oehler J, Schumacher HE. (1994). Influence of nootropic and antidepressive drugs on open field and running wheel behavior in spontaneously high and low active mice. *Pharmacol. Biochem Behav.* 49: 263-269.

Jahn R, Sudhof TC. (1994). Synaptic vesicles and exocytosis. *Annu Rev Neurosci.* 17: 219-246.

Janowsky A, Berger P, Vocci F, Labarca R, Skolnick P, Paul SM. (1986). Characterization of sodium-dependent [³H]GBR-12935 binding in brain: a radioligand for selective labelling of the dopamine transport complex. *J Neurochem.* 46: 1272-1276.

Janowsky A, Vocci F, Berger P, Angel I, Zelnik N, Kleinman JE, Skolnick P, Paul SM. (1987). [³H]GBR-12935 binding to the dopamine transporter is decreased in the caudate nucleus in Parkinson's disease. *J Neurochem.* 49: 617-621.

Jentsch JD, Elsworth JD, Redmond DE Jr, Roth RH. (1997). Phencyclidine increases forebrain monoamine metabolism in rats and monkeys: modulation by the isomers of HA966. *J Neurosci.* 17: 1769-1775.

Johnson M, Hanson GR, Gibb JW, Adair J, Filloux F. (1994). Effect of neonatal hypoxia-ischemia on nigro-striatal dopamine receptors and on striatal neuropeptide Y, dynorphin A and substance P concentrations in rats. *Brain Res Dev Brain Res.* 83: 109-118.

K

Kabuto H, Yokoi I, MoonSuk S, Yamamoto M, Mori A. (1994). Effects of kainic acid, quisqualic acid, and their antagonist, pCB-PzDA, on rat electrocorticograms and monoamine metabolite levels in rat striatum. *Neurochem Res.* 19: 267-274.

Kanai Y, Araki T, Murakami F, Kato H, Kogure K. (1993). Effect of pentobarbital on postischemic SCH 23390 and rolipram binding in gerbil brain. *Eur J Pharmacol.* 248: 191-198.

Kandell E., Schwarz JH, Jessel TM. (1994). *Principles of neural science.* Elsevier, third edition.

Kaneko S, Takahashi H, Satoh M. (1990). The use of *Xenopus* oocytes to evaluate drugs affecting brain Ca^{2+} channels: effects of bifemelane and several nootropic agents. *Eur J Pharmacol.* 189: 51-58.

Kaneko S, Sugiyama M, Inoue T, Satoh M. (1991). Effects of several cerebroprotective drugs on NMDA channel function : Evaluation using *Xenopus* oocytes and MK801 binding. *Eur J Pharmacol.* 207: 119-128.

Kanerva L, Tissari AH, Suurhasko BV, Hervonen A. (1977). Ultrastructural characterization of synaptosomes from neonatal and adult rats with special reference to monoamines. *J Comp Neurol.* 174: 631-658.

Kapucu LO, Koc E, Gucuyener K, Zenciroglu A, Atalay Y, Unlu M, van Royen E, (1998). D2 receptor imaging with iodine-¹²³-iodobenzamide brain SPECT in infants with hypoxic-ischemic brain injury. *J Nucl Med.* 39: 1703-1707.

Karoum F, Wyatt RJ, Majchrowicz E. (1976). Brain concentrations of biogenic amine metabolites in acutely treated and ethanol-dependent rats. *Br J Pharmacol.* 56: 403-411.

Karoum F, Chrapusta SJ, Brinjak R, Hitri A, Wyatt RJ. (1994). Regional effects of amphetamine, cocaine, nomifensine and GBR 12909 on the dynamics of dopamine release and metabolism in the rat brain. *Br J Pharmacol.* 113: 1391-1399.

Kass IS, Abramowicz AE, Cottrell JE, Chambers G. (1992). The barbiturate thiopental reduces ATP levels during anoxia but improves electrophysiological recovery and ionic homeostasis in the rat hippocampal slice. *Neuroscience*. 49: 537-543.

Kawano T, Tsutsumi K, Miyake H, Mori K. (1988). Striatal dopamine in acute cerebral ischemia of stroke-resistant rats. *Stroke*. 19: 1540-1543.

Keita H, Lepouse C, Henzel D, Desmonts JM, Mantz J. (1997). Riluzole blocks dopamine release evoked by N-methyl-D-aspartate, kainate, and veratridine in the rat striatum. *Anesthesiology*. 87: 1164-1171.

King GA. (1987). Protective effects of vinpocetine and structurally related drugs on the lethal consequences of hypoxia in mice. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 286: 299-307.

Kiss B, Cai NS, Erdo SL. (1991). Vinpocetine preferentially antagonizes quisqualate /AMPA receptor responses: Evidence from release and ligand binding studies. *Eur J Pharmacol*. 209: 109-112.

Knollema S, Aukema W, Hom H, Korf J, ter Horst GJ. (1995). L-deprenyl reduces brain damage in rats exposed to transient hypoxia-ischemia. *Stroke*. 26: 1883-1887.

Koe BK. (1976). Molecular geometry of inhibitors of the uptake of catecholamines and serotonin in synaptosomal preparations of rat brain. *J Pharmacol. Exp Ther*. 199: 649-661.

Kokaia Z, Andersberg G, Martinez-Serrano A, Lindvall O. (1998). Focal cerebral ischemia in rats induces expression of P75 neurotrophin receptor in resistant striatal cholinergic neurons. *Neuroscience*. 84: 1113-1125.

Koorn R, Kahn RA, Brannan TS, Martinez-Tica J, Weinberger J, Reich DL. (1993). Effect of isoflurane and halothane on in vivo ischemia-induced dopamine release in the corpus striatum of the rat. A study using cerebral microdialysis. *Anesthesiology*. 79: 827-835.

Kopin I. (1985). Catecholamine metabolism. Basic aspects and clinical significance. *Pharmacol Rev* 37: 334-364.

Kopin I. (1994). Basic neurochemistry. Molecular and cellular aspects. 5th edition. pp 899-918.

Kozuka M, Iwata N. (1995). Changes in levels of monoamines and their metabolites in incompletely ischemic brains of spontaneously hypertensive rats. *Neurochem Res*. 20: 1429-1435.

Krieglstein J, Rischke R. (1991). Vinpocetine increases the neuroprotective effect of adenosine in vitro. *Eur J Pharmacol.* 205: 7-10.

Krieglstein K, Unsicker K. (1994). Transforming growth factor-beta promotes survival of midbrain dopaminergic neurons and protects them against N-methyl-4-phenylpyridinium ion toxicity. *Neuroscience.* 63: 1189-1196.

Krueger BK. (1990). Kinetics and block of dopamine uptake in synaptosomes from rat caudate nucleus. *J Neurochem.* 55: 260-267.

Kruk ZL, Zarrindast MR. (1976). Mazindol anorexia is mediated by activation of dopaminergic mechanisms. *Br J Pharmacol.* 58: 367-372.

Kuczenski R. (1977). Differential effects of reserpine and tetrabenazine on rat striatal synaptosomal dopamine biosynthesis and synaptosomal dopamine pools. *J Pharmacol. Exp Ther.* 201: 357-367.

Kuhar MJ, Green AI, Snyder SH, Gfeller E. (1970). Separation of synaptosomes storing catecholamines and gamma-aminobutyric acid in rat corpus striatum. *Brain Res.* 21: 405-417.

Kuhar MJ, Couceyro PR, Lambert PD. (1999). Catecholamines. Basic neurochemistry. Cellular and medical aspects. 6th. Edition. Lippincot-Raven Publishers Philadelphia. p. 244-261.

Kwok RP, Walls EK, Juorio AV. (1985). The concentration of dopamine, 5-hydroxytryptamine, and some of their acid metabolites in the brain of genetically diabetic rats. *Neurochem Res.* 10: 611-616.

L

Laer S, Block F, Huether G, Heim C, Sontag KH. (1993). Effect of transient reduction of cerebral blood flow in normotensive rats on striatal dopamine-release. *J Neural Transm Gen Sect.* 92: 203-211.

Lakics V, Molnar P, Erdo SL. (1995a). Protection against veratridine toxicity in rat cortical cultures: relationship to Na⁺ channel blockade. *Neuroreport* 7: 89-92.

Lakics V, Sebestyen MG, Erdo SL. (1995b). Vinpocetine is a highly potent neuroprotectant against veratridine induced cell death in primary cultures of rat cerebral cortex. *Neurosci lett.* 185: 127-130.

Lamensdorf I, Hrycyna C, He LP, Nechushtan A, Tjurmina O, Harvey-White J, Eisenhofer G, Rojas E, Kopin IJ. (2000a). Acidic dopamine metabolites are actively extruded from PC12 cells by a novel sulfonylurea-sensitive transporter. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 361: 654-664.

- Lamensdorf I, He L, Nechushtan A, Harvey-White J, Eisenhofer G, Milan R, Rojas E, Kopin IJ. (2000b). Effect of glipizide on dopamine synthesis, release and metabolism in PC12 cells. *Eur J Pharmacol*. 388: 147-154.
- Lang DG, Wang CM, Cooper DR. (1993). Lamotrigine, phenytoin and carbamazepine interactions on the sodium current present in N4TG1 mouse neuroblastoma cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 266: 829-835.
- Lazzaro A, Seren MS, Koga T, Zanoni R, Schiavo N, Manev H. (1994). GM1 reduces infarct volume after focal cerebral ischemia. *Exp Neurol*. 125: 278-85.
- Lei B, Adachi N, Nagaro T, Arai T. (1997). The effect of dopamine depletion on the H₂O₂ production in the rat striatum following transient middle cerebral artery occlusion. *Brain Res*. 764: 299-302.
- Leikola-Pelho T, Heinamaki J, Laakso I, Ahtee L. (1990). Chronic nicotine treatment changes differentially the effects of acute nicotine on the three main dopamine metabolites in mouse striatum. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 342: 400-406.
- Lezcano N, Bergson C. (2002). D1/D5 dopamine receptors stimulate intracellular calcium release in primary cultures of neocortical and hippocampal neurons. *J Neurophysiol*. 87: 2167-75.
- Lillestøl IK, Helle KB, Aardal S. (1998). Relaxing effects of cyclic GMP and cyclic AMP-enhancing agents on the long-lasting contraction to endothelin-1 in the porcine coronary artery. *Scand J Clin Lab Invest*. 58: 625-634.
- Lim CC, Cook PJ, James IM. (1980). The effect of an acute infusion of vincamine and ethyl apovincamate on cerebral blood flow in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol*. 9: 100-101.
- Lin MT, Kao TY, Chio CC, Jin YT. (1995). Dopamine depletion protects striatal neurons from heat stroke-induced ischemia and cell death in rats. *Am J Physiol*. 269: H487-H490.
- Liu Y, Edwards RH. (1997). The role of vesicular transport proteins in synaptic transmission and neural degeneration. *Annu Rev Neurosci*. 20: 125-156.
- Ludvig N, Burmeister V, Jobe PC, Kincaid RL. (1991). Electron microscopy immunocytochemistry. Evidence that CaM-phosphodiesterase is localized in postsynaptic sites in rat brain. *Neuroscience*. 44: 491-500.
- Luo Y, Hattori A, Munoz J, Qin ZH, Roth GS. (1999). Intra-striatal dopamine injection induces apoptosis through oxidation-involved activation of transcription factors AP-1 and NF-kappa B in rats. *Mol Pharmacol*. 56: 254-264.

Lynch JJ 3rd, Yu SP, Canzoniero LM, Sensi SL, Choi DW. (1995). Sodium channel blockers reduce oxygen-glucose deprivation-induced cortical neuronal injury when combined with glutamate receptor antagonists. *J Pharmacol Exp Ther.* 273: 554-560.

Lysko PG, Webb CL, Yue TL, Gu JL, Feuerstein G. (1994). Neuroprotective effects of tetrodotoxin as a Na⁺ channel modulator and glutamate release inhibitor in cultured rat cerebellar neurons and in gerbil global brain ischemia. *Stroke.* 25: 2476-2482.

M

Madden KP, Clark WM, Marcoux FW, Probert AW Jr, Weber ML, Rivier J, Zivin JA. (1990). Treatment with conotoxin, an 'N-type' calcium channel blocker, in neuronal hypoxic-ischemic injury. *Brain Res.* 537: 256-262.

Manias B, Taylor DA. (1983). Inhibition of in vitro amine uptake into rat brain synaptosomes after in vivo administration of antidepressants. *Eur J Pharmacol.* 95: 305-309.

Mannisto PT, Tuomainen P. (1991). Effect of high single doses of levodopa and carbidopa on brain dopamine and its metabolites: modulation by selective inhibitors of monoamine oxidase and/or catechol-O-methyltransferase in the male rat. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 344: 412-418.

Marie C, Mossiat C, Beley A, Bralet J. (1992). Alpha-methyl-para-tyrosine pretreatment protects from striatal neuronal death induced by four-vessel occlusion in the rat. *Neurochem Res.* 17: 961-965.

Marshall JF, O'dell SJ, Navarrete R, Rosenstein AJ. (1990). Dopamine high affinity transport site topography in rat brain: major differences between dorsal and ventral striatum. *Neuroscience.* 37: 11-21.

Martin RL, Lloyd HG, Cowan AI. (1994). The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death?. *Trends Neurosci.* 17: 251-257.

Martucci N, Manna V, Agnoli A. (1984). Pharmacology-EEG study of vincamine and on trepide in patients with chronic cerebrovascular disease. *Int J Clin Pharmacol. Res.* 4: 291-302.

Mata M, Fink DJ, Gainer H, Smith CB, Davidsen L, Savaki H, Schwartz WJ, Sokoloff L. (1980). Activity-dependent energy metabolism in rat posterior pituitary primarily reflects sodium pump activity. *J Neurochem.* 34: 213-215.

- Matsui Y, Kumagae Y. (1991). Monoamine oxidase inhibitors prevent striatal neuronal necrosis induced by transient forebrain ischemia. *Neurosci Lett.* 126: 175-178.
- Matsumoto M, Zornow MH, Rabin BC, Maze M. (1993). The alpha 2 adrenergic agonist, dexmedetomidine, selectively attenuates ischemia-induced increases in striatal norepinephrine concentrations. *Brain Res.* 627: 325-329.
- Matthews G. (1996). Neurotransmitter release. *Annu Rev Neurosci.* 19: 219-233.
- Mayo BC, Biggs SR, Hawkins DR, Chasseaud LF, Darragh A, Baldock GA, Whitby BR. (1982). The metabolic fate of 11-bromo-15- ^3H vincamine in rats, dogs and humans. *J Pharmacobiodyn.* 5: 951-964.
- McElvain JS, Schenk JO. (1992). A multisubstrate mechanism of striatal dopamine uptake and its inhibition by cocaine. *Biochem Pharmacol.* 43: 2189-2199.
- McIntosh TK, Yu T, Gennarelli TA. (1994). Alterations in regional brain catecholamine concentrations after experimental brain injury in the rat. *J Neurochem.* 63: 1426-1433.
- McKillop D, Bradford HF. (1981). Comparative effects of benztropine and nomifensine on dopamine uptake and release from striatal synaptosomes. *Biochem Pharmacol.* 30: 2753-2758.
- McLaughlin BA, Nelson D, Erecinska M, Chesselet MF. (1998). Toxicity of dopamine to striatal neurons in vitro and potentiation of cell death by a mitochondrial inhibitor. *J Neurochem.* 70: 2406-2415.
- Meng SZ, Isumi H, Takashima S. (1998). Neuropathological characteristics and alteration of the dopamine D2 receptor in hypoxic-ischemic basal ganglia necrosis. *Brain Dev.* 20: 98-104.
- Meng SZ, Ohyu J, Itoh M, Takashima S. (2000). Dopamine transporter and nitric oxide synthase in hypoxic-ischemic brain. *Pediatr Neurol.* 22: 115-121.
- Meyer EM, Cooper JR. (1981). Correlations between $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase activity and acetylcholine release in rat cortical synaptosomes. *J Neurochem.* 36: 467-475.
- Milusheva EA, Doda M, Baranyi M, Vizi ES. (1996). Effect of hypoxia and glucose deprivation on ATP level, adenylate energy charge and $[\text{Ca}^{2+}]_o$ -dependent and independent release of ^3H dopamine in rat striatal slices. *Neurochem Int.* 28: 501-507.
- Mireylees SE, Brammer NT, Buckley GA. (1986). A kinetic study of the in vitro uptake of ^3H dopamine over a wide range of concentrations by rat striatal preparations. *Biochem Pharmacol.* 35: 4065-4071.

Miskolczi P, Vereczkey L, Szalay L, Gondoc C. (1987). Effect of age on the pharmacokinetics of vinpocetine (Cavinton) and apovincaminic acid. *Eur J Clin Pharmacol.* 33: 185-189.

Miskolczi P, Kozma K, Polgar M, Vereczkey L. (1990). Pharmacokinetics of vinpocetine and its main metabolite apovincaminic acid before and after the chronic oral administration of vinpocetine to humans. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 15: 1-5.

Miyamoto M, Murphy TH, Schnaar RL, Coyle JT. (1989). Antioxidants protect against glutamate induced cytotoxicity in a neuronal cell line. *J Pharmacol. Exp Ther.* 250: 1132-1140.

Miyamoto JK, Uezu E, Yusa T, Terashima S. (1990). Efflux of 5-HIAA from 5-HT neurons: a membrane potential-dependent process. *Physiol Behav.* 47: 767-72.

Miyamoto JK, Uezu E, Terashima S. (1991). Active transport pumps of HVA and DOPAC in dopaminergic nerve terminals. *Physiol Behav.* 49: 141-147.

Miyamoto JK, Uezu E, Jiang PJ, Miyamoto AT. (1993). H⁺-ATPase and transport of DOPAC, HVA, and 5-HIAA in monoamine neurons. *Physiol Behav.* 53: 65-74.

Miyata N, Yamaura H, Tanaka M, Muramatsu M, Tsuchida K, Okuyama S, Otomo S. (1993). Effects of VA-045 a novel apovincaminic derivative on isolated blood vessels: cerebroarterial selectivity. *Life Sci.* 52: 181-186.

Miyazaki M, Nazarali AJ, Boisvert DP, Bayens-Simmonds J, Baker GB. (1989). Inhibition of ischemia-induced brain catecholamine alterations by clonidine. *Brain Res Bull.* 22: 207-211.

Miyazaki M. (1995). The effect of a cerebral vasodilator, vinpocetine, on cerebral vascular resistance evaluated by Doppler ultrasonic technique in patients with cerebrovascular diseases. *Angiology.* 46: 53-58.

Molnar P, Gaal L. (1992). Effect of different subtypes of cognition enhancers on long term potentiation (LTP) in the rat dentate gyrus in vivo. *Eur J Pharmacol.* 215: 17-22.

Molnar P, Gaal L, Horvath C. (1994). The impairment of long term potentiation (LTP) in rats with medial septal lesion and its restoration by cognitive enhancers. *Neurobiology.* (Bp) 2: 255-266.

Molnar P, Erdo SL. (1995). vinpocetine is as potent as phenytoin to block voltage gated Na⁺ channels in rat cortical neurons. *Eur J Pharmacol.* 273: 303-306.

Muhammad N, Adams G, Lee HK. (1988). Kinetics and mechanisms of vinpocetine degradation in aqueous solutions. *J Pharm Sci.* 77: 126-131.

Murakami F, Araki T, Kanai Y, Kato H, Kogure K. (1993). Neuroprotective effect of vinconate against postischemic alterations in binding of [³H]SCH 23390 in the gerbil brain. *Gen Pharmacol.* 24: 23-28.

Murakami A, Furui T. (1994a). Effects of the conventional anticonvulsants, phenytoin, carbamazepine, and valproic acid, on sodium-potassium-adenosine triphosphatase in acute ischemic brain. *Neurosurgery.* 34: 1047-1051.

Murakami F, Araki T, Kanai Y, Kato H, Fujiwara T, Kogure K. (1994b). Effects of vinconate and pentobarbital against postischemic alterations in spirodecanone binding sites in the gerbil brain. *Pharmacology.* 49: 286-295.

N

Nagasawa H, Araki T, Kogure K. (1992). Alteration of dopamine D1 receptor in the strionigral system of the postischemic rat brain. *Neurosci Lett.* 134: 271-274.

Nagatsu T, Stjarne L. (1998). Catecholamine synthesis and release. Overview. *Adv Pharmacol.* 42: 1-14.

Nakane H, Ooboshi H, Ibayashi S, Yao H, Sadoshima S, Fujishima M. (1995). Isradipine, a calcium channel blocker, attenuates the ischemia-induced release of dopamine but not glutamate in rats. *Neurosci Lett.* 188: 151-154.

Near JA, Bigelow JC, Wightman RM. (1988). Comparison of uptake of dopamine in rat striatal chopped tissue and synaptosomes. *J Pharmacol. Exp Ther.* 245: 921-927.

Nemeth G, Cintra A, Herb JM, Ding A, Goldstein M, Agnati LF, Hoyer S, Fuxe K. (1991). Changes in striatal dopamine neurohistochemistry and biochemistry after incomplete transient cerebral ischemia in the rat. *Exp Brain Res.* 86: 545-54.

Nicholls DG. (1989). Release of glutamate, aspartate, and gamma-aminobutyric acid from isolated nerve terminals. *J Neurochem.* 52: 331-341.

Nicholls D, Attwell D. (1990). The release and uptake of excitatory amino acids. *Trends Pharmacol Sci.* 11: 462-468.

Nicholls J. (1994). *Proteins, transmitters and synapsis.* Blackwell Sci. Publ. 253 pp.

Nicholson CD. (1990). *Pharmacology of nootropics and metabolically active compounds in relation to their use in dementia.* *Psychopharmacology. (Berl).* 101: 147-159.

Niemann H, Blasi J, Jahn R. (1994). Clostridial neurotoxins: new tools for dissecting exocytosis. *Trends Cell Biol.* 4: 179-185.

Nirenberg MJ, Chan J, Liu Y, Edwards RH, Pickel VM. (1996a). Ultrastructural localization of the vesicular monoamine transporter-2 in midbrain dopaminergic neurons: potential sites for somatodendritic storage and release of dopamine. *J Neurosci.* 16: 4135-4145.

Nirenberg MJ, Vaughan RA, Uhl GR, Kuhar MJ, Pickel VM. (1996b). The dopamine transporter is localized to dendritic and axonal plasma membranes of nigrostriatal dopaminergic neurons. *J Neurosci.* 16: 436-447.

O

Odarjuk J, Hetey L, Gross J. (1987). Synaptosomal uptake and release of dopamine in rat striatum after hypoxia. *J Neurochem.* 48: 1115-1120.

O'Donnell JM, Frith S. (1999). Behavioral effects of family-selective inhibitors of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Pharmacol Biochem Behav.* 63: 185-192.

Ogura K, Shibuya M, Suzuki Y, Kanamori M, Ikegaki I. (1989). Changes in striatal dopamine metabolism measured by in vivo voltammetry during transient brain ischemia in rats. *Stroke.* 20: 783-787.

Ohta K, Fukuuchi Y, Shimazu K, Komatsumoto S, Ichijo M, Araki N, Shibata M. (1994). Presynaptic glutamate receptors facilitate release of norepinephrine and 5-hydroxytryptamine as well as dopamine in the normal and ischemic striatum. *J Auton Nerv Syst.* 49 Suppl: S195-202.

Okuyama S, Aihara H. (1988). Action of nootropic drugs on transcallosal responses in rats. *Neuropharmacol.* 27: 67-72.

Okuyama S, Hashimoto S, Ogawa S, Imagawa Y, Kawashima K, Kawashima Y, Araki H, Otomo S. (1994). Effects of VA-045 a novel apovincaminic acid derivate on age related impairment evidence in EEG, caudate spindle, a passive avoidance task and cerebral blood flow in rats. *Gen Pharmacol.* 25: 1311-1320.

Olpe HR, Barrionuevo G, Lynch G. (1982). Vincamine: a psychogeriatric agent blocking synaptic potentiation in hippocampus. *Life Sci.* 31: 1947-1953.

Olpe HR, Steinmann MW. (1982). The effect of vincamine, hydergine and piracetam on the firing rate of locus ceruleus neurons. *J Neural Transm.* 55: 101-109.

Ooboshi H, Sadoshima S, Yao H, Nakahara T, Uchimura H, Fujishima M. (1992). Inhibition of ischemia-induced dopamine release by omega-conotoxin, a calcium

channel blocker, in the striatum of spontaneously hypertensive rats: in vivo brain dialysis study. *J Neurochem*. 58: 298-303.

Ooboshi H, Sadoshima S, Ibayashi S, Yao H, Uchimura H, Fujishima M. (1993). Isradipine attenuates the ischemia-induced release of dopamine in the striatum of the rat. *Eur J Pharmacol*. 233: 165-168.

Orvisky E, Soltes L, Stancikova M. (1997). High-molecular-weight hyaluronan--a valuable tool in testing the antioxidative activity of amphiphilic drugs stobadine and vinpocetine. *J Pharm Biomed Anal*. 16: 419-424.

Otomo E, Atarashi J, Araki G, Ito E, Omae T, Kuzuya F, Nukada T, Ebi O. (1985). Comparison of vinpocetine with ifenprodil and dihydroergotoxine mesylate treatment and results of long term treatment with vinpocetine. *Curr. Ther. Res*. 37: 811-821.

P

Palosi E, Szporny L. (1976). Effects of ethyl apovincamate on the central nervous system. *Arzneimittelforschung*. 26: 1926-1929.

Paterson IA, Juorio AV, Berry MD, Zhu MY. (1991). Inhibition of monoamine oxidase B by (-) deprenyl potentiates neuronal responses to dopamine agonists but does not inhibit dopamine catabolism in the rat striatum. *J Pharmacol Exp Ther*. 258: 1019-1026.

Pellegrini-Giampietro DE, Gorter JA, Bennett MVL, Zukin RS. (1997). The GluR2 (Glu-B) hypothesis: Ca²⁺ impermeable AMPA receptors in neurological disorders. *Trends Neurosci*. 20: 464-470.

Pereira C, Agostinho P, Oliveira CR. (2000). Vinpocetine attenuates the metabolic dysfunction induced by amyloid beta-peptides in PC12 cells. *Free Radic Res*. 33: 497-506.

Peter D, Jimenez J, Liu Y, Kim J, Edwards RH. (1994). The chromaffin granule and synaptic vesicle amine transporters differ in substrate recognition and sensitivity to inhibitors. *J Biol Chem*. 269: 7231-7237.

Phebus LA, Mincy RE, Clemens JA. (1995). Ischemia increases tissue and decreases extracellular levels of acid dopamine metabolites in the rat striatum: further evidence for active transport of metabolites. *Life Sci*. 56: 1135-1141.

Polli JW, Kincaid RL. (1992). Molecular cloning of DNA encoding a calmodulin-dependent phosphodiesterase enriched in striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89: 11079-11083.

Polli JW, Kincaid RL. (1994). Expression of a calmodulin-dependent phosphodiesterase isoform (PDE1B1) correlates with brain regions having extensive dopaminergic innervation. *J Neurosci.* 4: 1251-1261.

Przedborski S, Kostic V, Jackson-Lewis V, Cadet JL, Burke RE. (1991). Effect of unilateral perinatal hypoxic-ischemic brain injury in the rat on dopamine D1 and D2 receptors and uptake sites: a quantitative autoradiographic study. *J Neurochem.* 57: 1951-1961.

R

Raiteri M, Cerrito F, Cervoni AM, Del Carmine R, Rivera MT, Levi G. (1978). Release of dopamine from striatal synaptosomes. *Ann Ist Super Sanita.* 14: 97-110.

Reader TA, Ase AR, Hebert C, Amdiss F. (1999). Distribution of dopamine, its metabolites, and D1 and D2 receptors in heterozygous and homozygous weaver mutant mice. *Neurochem Res.* 24: 1455-1470.

Rembliez C, Jolimay N, Wahl A, Pariat C, Piriou A, Huguet F. (1998). Extracellular dopamine and catabolites in rat striatum during lactic acid perfusion as determined by in vivo microdialysis. *Brain Res.* 804: 224-30.

Rembliez C, Pontcharraud R, Tallineau C, Piriou A, Huguet F. (1999a). Lactic acid-induced increase of extracellular dopamine measured by microdialysis in rat striatum: evidence for glutamatergic and oxidative mechanisms. *Brain Res.* 837: 22-28.

Rembliez C, Pontcharraud R, Vandell B, Piriou A, Huguet F. (1999b). Origin of extracellular dopamine increase induced by lactic acid striatal perfusion monitored by microdialysis in the awake rat. *Neuroreport.* 10: 1961-1964.

Ren Y, Li X, Xu ZC. (1997). Asymmetrical protection of neostriatal neurons against transient forebrain ischemia by unilateral dopamine depletion. *Exp Neurol.* 146: 250-257.

Rischke R, Krieglstein J. (1990). Effects of vinpocetine on local cerebral blood flow and glucose utilization seven days after forebrain ischemia in the rat. *Pharmacology.* 41: 153-160.

Rischke R, Krieglstein J. (1991). Protective effect of vinpocetine against brain damage caused by ischemia. *Jpn J Pharmacol.* 56: 349-356.

Rivest R, Marsden CA. (1992). Differential effects of amfonelic acid on the haloperidol- and clozapine-induced increase in extracellular DOPAC in the nucleus accumbens and the striatum. *Synapse.* 10: 71-78.

Rosen AS, Morris ME, Weaver DF. (1994). Effects of Na⁺ channel blockers on the anoxic depolarization in neocortical pyramidal neurons. Soc Neurosci Abstr. 20: 184.

Rothman SM. (1985). The neurotoxicity of excitatory amino acids is produced by passive chloride influx. J Neurosci. 5: 1483-1489.

Rubinstein M, Phillips TJ, Bunzow JR, Falzone TL, Dziewczapolski G, Zhang G, Fang Y, Larson JL, McDougall JA, Chester JA, Saez C, Pugsley TA, Gershanik O, Low MJ, Grandy DK. (1997). Mice lacking dopamine D4 receptors are supersensitive to ethanol, cocaine, and methamphetamine. Cell. 90: 991-1001.

Rudnick G, Steiner-Mordoch SS, Fishkes H, Stern-Bach Y, Schuldiner S. (1990). Energetics of reserpine binding and occlusion by the chromaffin granule biogenic amine transporter. Biochemistry. 29: 603-608.

S

Santos MS, Moreno AJ, Carvalho AP. (1996). Relationships between ATP depletion, membrane potential, and the release of neurotransmitters in rat nerve terminals. An in vitro study under conditions that mimic anoxia, hypoglycemia, and ischemia. Stroke. 27: 941-950.

Santos MS, Duarte AI, Moreira PI, Oliveira CR. (2000). Synaptosomal response to oxidative stress: Effects of vinpocetine. Free Rad Res. 32: 57-66.

Sauer D, Rischke R, Beck T, Rossberg C, Mennel HD, Bielenberg GW, Kriegstein J. (1988). Vinpocetine prevents ischemic cell damage in rat hippocampus. Life Sci. 43: 1733-1739.

Sauter A, Rudin M, Weiderhold KH. (1988). Reduction of neural damage in irreversible cerebral ischemia by calcium antagonists. Neurochem Pathol. 9: 211-236.

Schmidt J. (1984). Nootropic drugs reduce immobility in behavioural despair test in mice. Biomed Biochim Acta. 43: 1295-1299.

Schoemaker H, Nickolson VJ. (1983). Dopamine uptake by rat striatal synaptosomes: time- and temperature-dependent decay and protection by dithiothreitol and dopamine. J Neurochem. 40: 922-928.

Schoepp DD, Azzaro AJ. (1985). Further studies on the nature of postsynaptic dopamine uptake and metabolism in rat striatum: sodium dependency and investigation of a possible role for carrier-mediated uptake into serotonin neurons. J Neurochem. 44: 1747-1752.

Schuldiner S. (1994). A molecular glimpse of vesicular monoamine transporters. *J Neurochem.* 62: 2067-2078.

Schweri MM, Skolnick P, Rafferty MF, Rice KC, Janowsky AJ, Paul SM. (1985). [³H]Threo-(+/-)-methylphenidate binding to 3,4-dihydroxyphenylethylamine uptake sites in corpus striatum: correlation with the stimulant properties of ritalinic acid esters. *J Neurochem.* 45: 1062-1070.

Shiekhattar R, Ghasemzadeh MB, Adams RN. (1992). Intracerebral infusion of DOPAC decreases striatal dopamine. *Brain Res Bull.* 29: 891-896.

Shih JC, Chen K, Ridd MJ. (1999). Monoamine oxidase: from genes to behavior. *Annu Rev Neurosci.* 22: 197-217.

Silverstein F, Johnston MV. (1984). Effects of hypoxia-ischemia on monoamine metabolism in the immature brain. *Ann Neurol.* 15: 342-347.

Sitges M, Possani LD, Bayon A. (1986). A short chain toxin from the mexican scorpion *Centruroides noxius*, induces transmitter release by blocking K⁺ permeability. *J neurosci.* 6: 1570-1574.

Sitges M. (1987). Mecanismo de acción de toxinas del alacrán mexicano *Centruroides noxius* sobre terminales nerviosas aisladas de cerebro de ratón, Tesis de doctorado. UACPyP-CCH, UNAM, México D.F., 126 pp.

Sitges M. (1989). Effect of organic and inorganic calcium channel blockers on gamma-amino-n-butyric acid release induced by monensin and veratrine in the absence of external calcium. *J Neurochem.* 53: 436-441.

Sitges M, Chiu LM, Ramon de la Fuente J. (1990). The effect of verapamil on GABA and dopamine release does not involve voltage-sensitive calcium channels. *Brain Res.* 534: 51-59.

Sitges M, Talamo BR. (1993). Sphingosine, W-7, and trifluoperazine inhibit elevation in cytosolic calcium induced by high potassium depolarization in synaptosomes. *J Neurochem.* 61: 443-450.

Sitges M, Chiu LM, Gonzalez L. (1993). Vesicular and carrier-mediated depolarization-induced release of [³H]GABA: inhibition by amiloride and verapamil. *Neurochem Res.* 18: 1081-1087.

Sitges M, Reyes A, Chiu LM. (1994). Dopamine transporter mediated release of dopamine: role of chloride. *J Neurosci Res.* 39: 11-22.

Sitges M, Chiu LM. (1995a). omega-Aga IVA selectively inhibits the calcium-dependent fraction of the evoked release of [³H]GABA from synaptosomes. *Neurochem Res.* 20: 1065-1071.

Sitges M, Chiu LM. (1995b). Characterization of the type of calcium channel primarily regulating GABA exocytosis from brain nerve endings. *Neurochem Res.* 20: 1073-1080.

Sitges M, Peña F, Chiu LM, Guarneros A. (1998). Study on the possible involvement of protein-kinases in the modulation of brain presynaptic sodium channels; comparison with calcium channels. *Neurochem int.* 32: 177-190.

Sitges M, Nekrassov V. (1998). Characterization of vinpocetine mechanism of action in rat striatum synaptosomes. *J Neurochem* 71 (suppl): S19A.

Sitges M, Nekrassov V. (1999). Vinpocetine selectively inhibits neurotransmitter release triggered by sodium channel activation. *Neurochem Res.* 24: 1585-1591.

Sitges M, Nekrassov V, Guarneros A. (2000). Simultaneous action of MK-801 (dizclopine) on dopamine, glu, asp, and GABA release from striatum isolated nerve endings. *Brain Res.* 854: 48-56.

Slivka A, Brannan TS, Weinberger J, Knott PJ, Cohen G. (1988). Increase in extracellular dopamine in the striatum during cerebral ischemia: a study utilizing cerebral microdialysis. *J Neurochem.* 50: 1714-1718.

Sokoloff L. (1993). Sites and mechanisms of function-related changes in energy metabolism in the nervous system. *Dev. Neurosci* 15: 194-206.

Sollner T, Bennett MK, Whitehead SW, Scheller RH, Rothman JE. (1993). A protein assembly disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation and fusion. *Cell* 75: 409-418.

Solntseva EI, Bukanova YuV. (1999). Cyclic GTP imitates the potentiating effect of the nootrope vinpocetine on the high-threshold A-current in mollusk neurons. *Neurosci Behav Physiol.* 29: 671-675.

Solntseva EI, Bukanova JV, Skrebitsky VG. (2001). The nootropic drug vinpocetine modulates different types of potassium currents in molluscan neurons. *Comp Biochem Physiol C Toxicol. Pharmacol.* 128: 275-280.

Spatz M, Yasuma Y, Strasser A, Kawai N, Stanimirovic D, McCarron R. (1995). Modulation of striatal dopamine release in cerebral ischemia by L-arginine. *Neurochem Res.* 20: 491-496.

Stamford JA, Isaac D, Hicks CA, Ward MA, Osborne DJ, O'Neill MJ. (1999). Ascorbic acid is neuroprotective against global ischaemia in striatum but not hippocampus: histological and voltammetric data. *Brain Res.* 835: 229-240.

- Stevens CF, Williams JH. (2000). Kin & run exocytosis at hippocampal synapses. *Proc Natl Acad Sci.* 97: 12828-12833.
- Strasser A, Yasuma Y, McCarron RM, Ishii H, Stanimirovic D, Spatz M. (1994). Effect of nitro-L-arginine on cerebral blood flow and monoamine metabolism during ischemia/reperfusion in the mongolian gerbil. *Brain Res.* 664: 197-201.
- Stys PK, Waxman SG, Ransom BR. (1992). Ionic mechanism of anoxic injury in mammalian CNS white matter: role of Na⁺ channels and Na⁺-Ca²⁺ exchanger. *J Neurosci* 12: 430-439.
- Subhan Z, Hindmarch I. (1985). Psychopharmacological effects of vinpocetine in normal healthy volunteers. *Eur J Pharmacol.* 28: 567-571.
- Sudhof TC. (1995). The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature.* 375: 645-653.
- Sudhof TC. (1999). Intracellular trafficking. *Basic Neurochemistry. Cellular and medical aspects.* 6th. Edition. Siegel GJ. Editor., Lippincott-Raven Publishers., Philadelphia, USA, pp.175-188.
- Sugawa M, Koide T, Kohda A, Takato M. (1990). A novel dibenzoxazepine derivative (BY-1949) increases regional cerebral blood flow. *Eur J Pharmacol.* 178: 225-228.
- Surmeier DJ,argas J, Hemmings HC Jr, Nairn AC, Greengard P. (1995). Modulation of calcium currents by a D1 dopaminergic protein kinase/phosphatase cascade in rat neostriatal neurons. *Neuron.* 14: 385-97.
- Surratt CK, Persico AM, Yang XD, Edgar SR, Bird GS, Hawkins AL, Griffin CA, Li X, Yabs EW, Uhl R. (1993). A human synaptic vesicular monoamine transporter cDNA predicts post-translational modifications, reveals chromosome 10 gene localization and identifies Taq I RFLP. *FEBS Lett* 318: 325-330.
- Szakall S, Boros I, Balkay L, Emri M, Fekete I, Kerényi L, et al. (1998). Cerebral effects of a single dosis of intravenous vinpocetine in chronic stroke patients: A PET study. *J Neuroimaging.* 8: 197-204.
- Szatkowski M, Attwell D. (1994). Triggering and execution of neuronal death in brain ischaemia: two phases of glutamate release by different mechanisms. *Trends Neurosci.* 17: 359-365.

T

- Tang L, Todd RD, O'Malley KL. (1994). Dopamine D2 and D3 receptors inhibit dopamine release. *J Pharmacol Exp Ther.* 270: 475-479.
- Tasker RC, Coyle JT, Vornov JJ. (1992). The regional vulnerability to hypoglycemia-induced neurotoxicity in organotypic hippocampal culture: protection by early tetrodotoxin or delayed MK-801. *J Neurosci.* 12: 4298-4308.
- Taylor CP, Meldrum BS. (1995). Na⁺ channels as targets for neuroprotective drugs. *Trends Pharmacol Sci.* 16: 309-16.
- Taylor CP, Narasimhan LS. (1997). Sodium channels and therapy of central nervous system diseases. In *advances in pharmacology.* vol. 39, p 47-99.
- Thal LJ, Salmon DP, Lasker B, Bower D, Klauber MR. (1989). The safety and lack of efficacy of vinpocetine in Alzheimer's disease. *J Am Geriatr Soc.* 37: 515-520.
- Thompson WJ. (1993). Cyclic nucleotide-phosphodiesterase, pharmacology, biochemistry and function. In *intracellular messengers.* Taylor CW, editor. Pergamon Press UK, p. 287-313
- Tohgi H, Sasaki K, Chiba K, Nozaki Y. (1990). Effect of vinpocetine on oxygen release of hemoglobin and erythrocyte organic polyphosphate concentrations in patients with vascular dementia of the Binswanger type. *Arzneimittelforschung.* 40: 640-643.
- Toner CC, Stamford JA. (1997). Involvement of N- and P/Q- but not L- or T-type voltage-gated calcium channels in ischaemia-induced striatal dopamine release in vitro. *Brain Res.* 748: 85-92.
- Toner CC, Stamford JA. (1999). Effects of metabolic alterations on dopamine release in an in vitro model of neostriatal ischaemia. *Brain Res Bull.* 48: 395-399.
- Tretter L, Adam-Vizi V. (1998). The neuroprotective drug vinpocetine prevents veratridine-induced [Na⁺]_i and [Ca²⁺]_i rise in synaptosomes. *Neuroreport.* 9: 1849-1853.
- Trimble WS, Lenial M, Scheller RH. (1991). Cellular and molecular biology of the presynaptic nerve terminal. *Annu Rev neurosci.* 14: 93-122.
- Tsubota S, Adachi N, Chen J, Yorozuya T, Nagaro T, Arai T. (1999). Dexamethasone changes brain monoamine metabolism and aggravates ischemic neuronal damage in rats. *Anesthesiology.* 90: 515-523.
- Turner TJ, Adams ME, Dunlap K. (1993). Multiple Ca²⁺ channel types coexist to regulate synaptosomal neurotransmitter release. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90: 9518-9522.

Twist EC, Mitchell SN, Corn TH, Campbell IC. (1991). Effect of chronic ritanserin or clorgyline on amine and metabolite levels in rat frontal cortex. *Eur J Pharmacol.* 196: 157-160.

U

Uchiyama TY, Okuyama S, Araki H. (1996). VA-045 a novel apovincaminic derivative attenuates neuronal injury induced by hypoxia or by excitatory aminoacids of rat cortices. *Life Sci* 59: 1571-1578.

Uhl GR, Hartig PR. (1992). Transporter explosion: update on uptake. *Trends Pharmacol Sci.* 13: 421-425.

Umino A, Takahashi K, Nishikawa T. (1998). Characterization of phencyclidine induced increase in prefrontal cortical dopamine metabolism in the rat. *Br J Pharmacol.* 124: 377-385.

Urenjak J, Obrenovitch TP. (1996). Pharmacological modulation of voltage-gated Na⁺ channels: a rational and effective strategy against ischemic brain damage. *Pharmacol. Rev.* 48: 21-67.

V

Van Staveren WC, Markerink-van Ittersum M, Steinbusch HW, de Vente J. (2001). The effects of phosphodiesterase inhibition on cyclic GMP and cyclic AMP accumulation in the hippocampus of the rat. *Brain Res.* 888: 275-286.

Vereczkey L, Czira G, Tamas J, Szentirmay Z, Botar Z, Szporny L. (1979a). Pharmacokinetics of vinpocetine in humans. *Arzneimittelforschung* 29: 957-60.

Vereczkey L, Szentirmay Z, Szporny L. (1979b). Kinetic metabolism of vinpocetine in the rat. *Arzneimittelforschung.* 29: 953-956.

Vornov JJ, Tasker RC, Coyle JT. (1994). Delayed protection by MK-801 and tetrodotoxin in a rat organotypic hippocampal culture model of ischemia. *Stroke.* 25: 457-465.

W

Wakade AR, Przywara DA, Bhave SV, Chowdhury PS, Bhave A, Wakade TD. (1993). Massive exocytosis triggered by sodium-calcium exchange in sympathetic neurons is attenuated by co-culture with cardiac cells. *Neuroscience.* 55: 813-821.

Warpman U, Zhang X, Nordberg A. (1996). Effect of tacrine on in vivo release of dopamine and its metabolites in the striatum of freely moving rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 277: 917-922.

Weber ML, Taylor CP. (1994). Damage from oxygen and glucose deprivation in hippocampal slices is prevented by tetrodotoxin, lidocaine and phenytoin without blockade of action potentials. *Brain Res.* 664: 167-177.

Wei H, Fiskum G, Rosenthal RE, Perry DC. (1997a). Global cerebral ischemia and reperfusion alters NMDA receptor binding in canine brain. *Mol Chem Neuropathol.* 30: 25-39.

Wei Y, Shi NC, Zhong CS, Zheng P, Liang ZJ. (1997b). Inhibitory effects of vinpocetine on sodium current in rat cardiomyocytes. *Zhongguo Yao Li Xue Bao.* 18: 411-415.

Weinberger J, Cohen G. (1982). The differential effect of ischemia on the active uptake of dopamine, gamma-aminobutyric acid, and glutamate by brain synaptosomes. *J Neurochem.* 38: 963-968.

Werling LL, Jacocks HM 3d, Rosenthal RE, Fiskum G. (1993). Dopamine release from canine striatum following global cerebral ischemia/reperfusion. *Brain Res.* 606: 99-105.

Werling LL, Hoehner PJ, Hurt KJ, Fox LG, Blanck TJ, Rosenthal RE, Fiskum G. (1994). Increased activation of L-type voltage-dependent calcium channels is associated with glycine enhancement of N-methyl-D-aspartate-stimulated dopamine release in global cerebral ischemia/reperfusion. *J Neurochem.* 63: 215-221.

Westerink BH, Spaan SJ. (1982). Simultaneous determination of the formation rate of dopamine and its metabolite 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) in various rat brain areas. *Brain Res.* 252: 239-245.

Wheeler DD, Edwards AM, Chapman BM, Ondo JG. (1993). A model of the sodium dependence of dopamine uptake in rat striatal synaptosomes. *Neurochem Res.* 18: 927-936.

Wieloch T, Miyauchi Y, Lindvall O. (1990). Neuronal damage in the striatum following forebrain ischemia: lack of effect of selective lesions of mesostriatal dopamine neurons. *Exp Brain Res.* 83: 159-163.

Wood ER, Coury A, Blaha CD, Phillips AG. (1992). Extracellular dopamine in the rat striatum during ischemia and reperfusion as measured by in vivo electrochemistry and in vivo microdialysis. *Brain Res.* 591: 151-159.

Wu SN, Li HF, Chiang HT. (2001). Vinpocetine-induced stimulation of calcium-activated potassium currents in rat pituitary GH3 cells. *Biochem Pharmacol.* 61: 877-892.

Wustmann C, Blaschke M, Rudolph E, Fisher HD, Schmidt J. (1990). Influence of nootropic drugs on the age dependent K^+ coupling of transmitter release. *Biomed Biochim Acta.* 49: 619-624.

X

Xie Y, Zacharias E, Hoff P, Tegtmeier F. (1995). Ion channel involvement in anoxic depolarization induced by cardiac arrest in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 15: 587-594.

Xu C, Coffey LL, Reith ME. (1995). Translocation of dopamine and binding of 2 beta-carbomethoxy-3,beta-(4-fluorophenyl) tropane (WIN 35, 428) measured under identical conditions in rat striatal synaptosomal preparations. Inhibition by various blockers. *Biochem Pharmacol.* 49: 339-350.

Xu K, Dluzen DE. (1998). Alteration in L-DOPA evoked dopamine and DOPAC output under conditions of impaired vesicular dopamine storage. *J Neural Transm.* 105: 1091-1101.

Y

Yamada S, Okuyama S, Kamata K. (1995a). Effects of VA-045, a novel apovincaminic acid derivative, on rabbit basilar artery. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* 90: 269-276.

Yamada S, Yamaguchi K, Okuyama S. (1995b). Effects of VA-045 on peripheral and central circulation in anesthetized dogs. *Gen Pharmacol.* 26: 1419-1424.

Yamada K, Goto S, Yoshikawa M, Ushio Y. (1996). Gabaergic transmission and tyrosine hydroxylase expression in the nigral dopaminergic neurons: an in vivo study using a reversible ischemia model of rats. *Neuroscience.* 73: 783-789.

Yang YL, Lin MT. (1999). Heat shock protein expression protects against cerebral ischemia and monoamine overload in rat heat stroke. *Am J Physiol.* 276: H1961-1967.

Yao H, Sadoshima S, Ishitsuka T, Nagao T, Fujishima M, Tsutsumi T, Uchimura H. (1988). Massive striatal dopamine release in acute cerebral ischemia in rats. *Experientia.* 44: 506-508.

Yao H, Ooboshi H, Sadoshima S, Takano K, Ibayashi S, Fujishima M. (1990). Ischemic flow threshold for striatal dopamine release in rats. *Neurochem Res.* 15: 547-549.

Yasui M, Yano I, Oshima A. (1990). Calcium, phosphorus and aluminium concentrations in CNS, liver and kidney of rabbits with experimental

atherosclerosis: preventive effects of vinpocetine on the deposition of these elements. *J Int Med Res.* 18: 142-152.

Yu J, Wolda SL, Frazier AL, Florio VA, Martins TJ, Snyder PB, Harris EA, McCaw KN, Farrell CA, Steiner B, Bentley JK, Beavo JA, Ferguson K, Gelin R. (1997). Identification and characterisation of a human calmodulin-stimulated phosphodiesterase PDE1B1. *Cell Signal.* 9: 519-529.

Z

Zaleska MM, Erecinska M. (1987). Involvement of sialic acid in high-affinity uptake of dopamine by synaptosomes from rat brain. *Neurosci Lett.* 82: 107-112.

Zapater P, Moreno J, Horga JF. (1997). Neuroprotection by PCA 50938, nimodipine and flunarizine in gerbil global ischemia. *Brain Res.* 772: 57-62.

Zetterstrom T, Sharp T, Collin AK, Ungerstedt U. (1988). In vivo measurement of extracellular dopamine and DOPAC in rat striatum after various dopamine-releasing drugs implications for the origin of extracellular DOPAC. *Eur J Pharmacol.* 148: 327-334.

Zumstein A, Karduck W, Starke K. (1981). Pathways of dopamine metabolism in the rabbit caudate nucleus in vitro. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 316: 205-217.

Research report

Characterization of vinpocetine effects on DA and DOPAC release in striatal isolated nerve endings

Francisco Trejo^a, Vladimir Nekrassov^b, María Sitges^{a,*}

^aInstituto de Investigaciones Biomédicas, Apartado Postal 70228, Ciudad Universitaria 04510, Mexico, D.F.

^bInstituto Nacional de la Comunicación Humana, SSA, Mexico, D.F.

Accepted 1 May 2001

Abstract

The effect of vinpocetine, a nootropic drug with anti-ischemic potential, on the release of DA and its main metabolite, DOPAC, was investigated in striatum isolated nerve endings under resting and depolarized conditions. Vinpocetine does not modify the baseline release of DA or the exocytotic release of DA evoked by high K^+ , but inhibits the release of DA evoked by veratridine reversal of the DA transporter. In addition to these results, which confirm the vinpocetine selective blockade of voltage-sensitive presynaptic Na^+ channels (VSSC) previously reported [Neurochem. Res. 24 (1999) 1585], vinpocetine increases DOPAC release either under resting, veratridine or high K^+ depolarized conditions. This latter effect, which does not involve VSSC, was characterized. The parallel determination of the released and retained catecholamine concentrations revealed that vinpocetine increases DOPAC release at the expense of internal DA in a dose-dependent manner (low μM range). In contrast to vinpocetine, the selective MAO-A inhibitor, clorgyline, increases DA and decreases DOPAC formation. The combined action of vinpocetine and clorgyline does not indicate, however, that the activation of MAO is the mechanism responsible for the increase in DOPAC caused by vinpocetine. Reserpine, although more potent and efficient than vinpocetine, qualitatively exerts the same pattern of changes on DA and DOPAC concentrations. It is concluded that, in addition to the inhibition of presynaptic VSSC permeability, which selectively inhibits the transporter-mediated release of all neurotransmitters, vinpocetine increases DOPAC by impairing the vesicular storage of DA. Our results indicate that the cytoplasm extravesicular DA is metabolized by MAO to DOPAC. Most of the DOPAC formed is exported to the extracellular medium. © 2001 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Neuroprotection; MAO-A; Ischemia; Synaptic vesicle; Na^+ channel; Striatal synaptosome

1. Introduction

Evidence from human patients and experimental animal models suggests the protective potential of the nootropic drug vinpocetine against ischemic-induced neuronal damage [2,3,6,10,19,22]. The pharmacological 'down modulation' of voltage-sensitive Na^+ channels (VSSC) has been proposed to be an effective strategy against brain damage induced by ischemia [37]. In agreement with this hypothesis we have recently shown that vinpocetine inhibits the elevation of internal Na^+ induced by activation of presynaptic VSSC, and the release of glutamate and aspartate mediated by reversal of the excitatory amino acid transmitter transporters [29]. A relationship between the elevation of glutamate release and/or overstimulation of NMDA

receptors and the neuronal damage induced by ischemia has been reported [11,34]. However, it has also been demonstrated in several models of experimental ischemia that a massive release of the neurotransmitter DA accompanied by a decrease in its metabolites DOPAC and HVA takes place [7,9,33,35,38]. The reduction of ATP levels caused by ischemia [21] is expected to raise intracellular Na^+ by inactivating Na^+/K^+ ATPase and by activating VSSC. For instance, the direct inhibition of Na^+/K^+ ATPase by ouabain has been shown to increase neurotransmitter release in a TTX-sensitive manner [4,12]. As a decrease or reversal of the electrochemical Na^+ gradient also triggers the DA transporter (DAT)-mediated release of DA [18,32], it is reasonable to postulate that the DA released by this means after ischemia could contribute to the ischemic damage.

It is amply documented that depolarization-evoked neurotransmitter release is composed of a Ca^{2+} -dependent

*Corresponding author. Tel.: +52-5622-3866; fax: +52-5622-3897.
E-mail address: sitges@servidor.unam.mx (M. Sitges).

187

fraction released by exocytosis and a Na^+ -dependent fraction released from the cytosol by reversal of the neurotransmitter transporters. Release of the exocytotic fraction can be selectively induced by high K^+ and release mediated by reversal of the neurotransmitter transporters can be induced by veratridine or ouabain [1,14,24–26,28]. In the present investigation the effects of vinpocetine on the DAT-mediated release of DA, on the exocytotic release of DA and on the concentrations of DA and DOPAC released and retained in striatal synaptosomes were explored. Results indicate that, besides the selective inhibition of the DAT-mediated release of DA, vinpocetine increases DOPAC formation by a VSSC-independent mechanism.

2. Materials and methods

2.1. Source of materials

Eburnamenine-14-carboxylic acid ethyl ester (vinpocetine), *n*-methyl-*n*-propargyl-3-(2,4-dichloro-phenoxy)propylamine (clorgyline), veratridine, 1-octanesulfonic acid and pargyline were from Sigma (St. Louis, MO, USA). Reserpine and TTX were obtained from Research Biochemicals International. 3,4-Ring-2,5,6-[^3H]-dopamine-HCl (specific activity 40 Ci/mmol) was obtained from New England Nuclear (Boston, MA, USA). All other reagents were of analytical grade.

2.2. Preparation of striatal synaptosomes

Dissected striata of four male Wistar rats (250–300 g) were immediately placed in cold isotonic sucrose (1:10, wt/vol) and homogenized (six strokes at 2000 rpm, 0.15 mm pestle–vessel clearance). The resulting suspensions were centrifuged at $1500\times g$ for 10 min, and supernatants obtained from this centrifugation were centrifuged for another 20 min at $9000\times g$. The resulting pellets containing striatal synaptosomes were resuspended in oxygenated HEPES buffer (KRH). The composition of the KRH was (mM): 127 NaCl, 1.18 KH_2PO_4 , 3.73 KCl, 1 CaCl_2 , 1.18 MgSO_4 , 20 HEPES and 5.6 dextrose, pH 7.4, bubbled with a O_2/CO_2 mixture.

It is important to note that the buffers used to perfuse synaptosomes preloaded with the radioactive DA contained the MAO inhibitor pargyline at the concentration (100 μM) most commonly used in studies designed to follow preloaded [^3H]DA release. All the buffers used in the endogenous DA and DOPAC release and retain experiments did not contain pargyline.

2.3. Endogenous catecholamine release experiments

Rat striatal synaptosomes (391 ± 21 μg protein) suspended in 500 μl of KRH were preincubated at 37°C for 5

min and then incubated at 37°C for 10 min under the experimental conditions to be investigated. For instance, treatment with vehicle, vinpocetine, TTX, reserpine or clorgyline under resting or depolarized (20 μM veratridine or 30 mM KCl) conditions. In some experiments the preparation was treated with vinpocetine or reserpine in combination with clorgyline. The incubation was stopped by centrifugation. The supernatants resulting from this centrifugation (containing the DA and the DOPAC released) were transferred to clean vials, treated with an aliquot of a perchloric acid (PCA)/EDTA mixture to obtain 0.1 M and 0.1 mM final concentration, respectively, and stored at -40°C for later analysis. The resulting pellets were resuspended in 500 μl of a 0.1 M PCA/0.1 mM EDTA pH 1.4 solution and vigorously vortex mixed. These drastic conditions guarantee a complete discharge of the catecholamines (DA and DOPAC) inside the synaptosomes. In order to standardize catecholamine concentrations per milligram of synaptosomal protein, the vortex mixed suspension containing the disrupted synaptosomes was centrifuged. The supernatants resulting from this centrifugation (containing the catecholamines inside each sample of synaptosomes) were stored at -40°C for later analysis, and the pellets were used for protein determination by the method of Lowry after suspension in 1 ml of a 5 mM NaOH solution. The catecholamine-containing samples were injected into the HPLC system within a week after the experiment. Results are expressed as the concentration in pmoles per mg of synaptosomal protein of catecholamine released or retained inside synaptosomes. Endogenous DA release refers to the balance between the released DA and the DA taken up again for 10 min. Total DA (or total DOPAC) refers to the sum of the DA (or DOPAC) released plus the DA (or DOPAC) retained by an aliquot of synaptosomes exposed to a specific experimental condition. Total catecholamines concentration refers to the sum of total DA plus total DOPAC.

2.4. Determination of DA and DOPAC concentrations

Twenty microliters of the catecholamine-containing samples in PCA/EDTA were injected into a Waters HPLC system for analysis. The HPLC system consists of a delivery pump (Model 600), a Rheodyne injector, an analytical column (resolve, C_{18} , 150×3.9 mm internal diameter, particle size 5 μm , controlled at 30°C) and an electrochemical detector (Model DECADE), with glassy carbon used at a voltage of +0.8 V versus a Ag/AgCl reference electrode (range 1 nA). A mobile phase composed of 50 mM orthophosphoric acid/50 mM citric acid buffer, pH 3.1, adjusted with KOH, containing 5% (v/v) methanol, 100 mg/l octanesulfonic acid and 20 mg/l EDTA, at a flow rate of 1 ml/min, was applied for catecholamine elution. DA and DOPAC concentrations in the experimental samples were calculated from calibration curves obtained from the injection of increasing con-

centrations of external standard monoamine mixtures into the HPLC system.

2.5. Preloaded [^3H]DA release experiments

The method used to load striatal synaptosomes with [^3H]DA and to study its subsequent release has been described previously [27]. Briefly, about 5 mg of striatal synaptosomes suspended in KRH (1 mg/ml) were incubated with [^3H]DA (4 μCi , 0.1 pmol) at 37°C for 25 min. Aliquots (600 μl) of the [^3H]DA preloaded striatal synaptosomes were then transferred to Millipore filters lying on multiperforated chambers. The radioactivity not incorporated into the preparation was removed by superfusion with KRH. After adjusting the flow rate to 0.5 ml/min, fractions were collected at 1 min intervals. After 6 min, the KRH medium (control) or KRH containing 15 μM vinpocetine was rapidly substituted for the respective perfusion medium also containing 20 μM veratridine and additional (min 7–12) perfusate fractions were collected. The radioactivity released in each collected fraction and that remaining in the filters at the end of the perfusion experiment was counted. Results are expressed as the percentage released per minute of total radioactivity. Total radioactivity equals the radioactivity released during the 12 min of perfusion plus that remaining in the filter at the end of the experiment.

2.6. Statistics

Student's *t*-test was used for statistical evaluations. $P < 0.05$ indicates that differences between data were considered statistically significant. However, when a statistically significant difference between data was found, it was highly significant. For instance, $P < 0.03$ in the worst cases.

3. Results

3.1. Effect of vinpocetine on veratridine-evoked release of endogenous DA and endogenous DOPAC

Vinpocetine does not change the baseline release of endogenous DA, but practically abolishes the dramatic release of DA evoked by veratridine. Veratridine depolarization increases DA release from control values (10 ± 1 pmol/mg) to 122 ± 10 pmol/mg. In the presence of vinpocetine, this veratridine-evoked release of DA falls to 18 ± 1 pmol/mg (Fig. 1a). In the presence of the selective Na^+ channel blocker TTX at a concentration of 1 μM the veratridine-evoked release of DA falls to 14 ± 2 pmol/mg (data not shown in Fig. 1a).

In addition to DA release, the main DA metabolite, DOPAC, is released in high concentrations, while the other DA metabolites, HVA and 3-MT, are undetectable. In

control and veratridine-treated synaptosomes, DOPAC release is comparable, but in the control or veratridine synaptosomes also treated with vinpocetine it increases significantly (Fig. 1b).

Vinpocetine-induced DOPAC release and inhibition of DA release by veratridine are both evident in the chromatograms (i.e. before standardizing per milligram of synaptosomal protein). This is illustrated in Fig. 1c and d, which show that, in synaptosomes exposed to veratridine (Fig. 1c), the DA peak is much higher than in synaptosomes exposed to veratridine plus vinpocetine (Fig. 1d), and that the DOPAC peak increases when vinpocetine is present (Fig. 1d).

3.2. Effect of vinpocetine on high K^+ -evoked release of endogenous DA and endogenous DOPAC

High K^+ (30 mM) increases DA release about two-fold over resting values (i.e. from 10 to 35 ± 3 pmol/mg). This increase in DA release with high K^+ is unchanged by vinpocetine or by TTX (Fig. 2a).

DOPAC release in synaptosomes depolarized with high K^+ alone or in combination with TTX does not change, but in synaptosomes depolarized with high K^+ in combination with vinpocetine an increase in DOPAC release is again observed (Fig. 2b).

3.3. Effect of vinpocetine on DA and DOPAC distribution inside and outside striatum isolated nerve endings

The effect of vinpocetine on the concentrations of DA and DOPAC inside synaptosomes was measured in parallel with the released catecholamines. Vinpocetine at increasing concentrations (1.5, 5, 15 and 50 μM) progressively decreases internal DA and increases DOPAC release, but does not change DA baseline release or internal DOPAC significantly (Fig. 3a and b). Comparison of total DA and total DOPAC in synaptosomes exposed to vinpocetine at increasing concentrations shows a dose-response relationship between DA loss and DOPAC formation (Fig. 3c). Total DA plus total DOPAC values are not significantly changed by vinpocetine at any concentration tested (Fig. 3d).

3.4. Single and combined effects of vinpocetine and clorgyline on DA and DOPAC distribution inside and outside striatum synaptosomes

Monoamino-oxidase A (MAO-A) is the enzyme responsible for DOPAC generation [23]. The selective inhibitor of MAO-A, clorgyline, was tested at a low concentration (0.1 μM) for its ability to inhibit DA metabolism in striatal synaptosomes. Clorgyline increases DA, particularly inside synaptosomes (100 pmol DA/mg for 10 min), and causes a modest but statistically significant increase in DA baseline

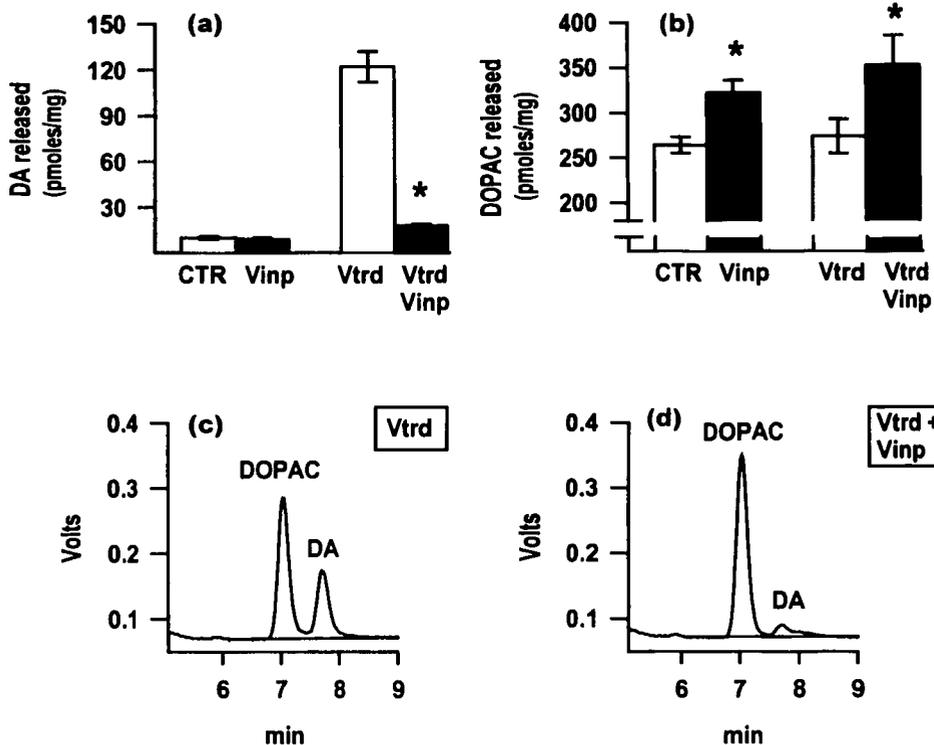


Fig. 1. Effect of vinpocetine on DA and DOPAC release under resting and veratridine depolarized conditions. Striatal synaptosomes were incubated (37°C) for 10 min in: KRH (CTR), KRH with 15 μ M vinpocetine (Vinp), KRH with 20 μ M veratridine (Vtrd), or KRH with 20 μ M veratridine and 15 μ M vinpocetine (Vtrd, Vinp). Incubation was stopped by centrifugation. The supernatants containing released DA and DOPAC were prepared for HPLC analysis and the pellets used for protein determination. (a) DA released, $*P < 0.00001$ between Vtrd and Vtrd plus Vinp. (b) DOPAC released, $*P < 0.01$ between CTR and Vinp and $*P < 0.02$ between Vtrd and Vtrd plus Vinp. Results are the mean \pm S.E.M. values of 22, six, 10 and five independent experiments for CTR, Vinp, Vtrd and Vinp plus Vtrd respectively. (c) Chromatogram obtained from the injection of 20 μ l of the supernatant of a representative veratridine-treated experimental sample and (d) chromatogram obtained from the supernatant of a representative veratridine plus vinpocetine-treated experimental sample.

release. This clorgyline-induced increase in DA is accompanied by a decrease in both the DOPAC released and the DOPAC inside synaptosomes (Table 1, row 2). These effects result in a pronounced increase of total DA and a pronounced decrease of total DOPAC (Table 2, row 2).

In contrast to clorgyline, vinpocetine decreases internal DA, and in synaptosomes treated with vinpocetine and clorgyline their effects are cancelled (Table 1, column 1).

Vinpocetine increases DOPAC release, but is unable to reverse the decrease in DOPAC release induced by clorgyline (Table 1, column 2, first four values). Vinpocetine also does not change the decrease in internal DOPAC caused by clorgyline (Table 1, column 3, first four values).

Vinpocetine does not change DA baseline release and clorgyline only increases DA baseline release moderately.

However, when synaptosomes are treated with both drugs simultaneously the release of DA induced by clorgyline alone is facilitated (Table 1, column 4, first four values).

3.5. Single and combined effects of reserpine and clorgyline on DA and DOPAC distribution inside and outside striatum synaptosomes

Since it is amply documented that reserpine induces an increase in DOPAC formation [5,8,15], the effect of reserpine, alone and in combination with clorgyline, was tested. Reserpine at 1 μ M markedly decreases internal DA, further decreases DA baseline release and increases DOPAC release, without changing internal DOPAC significantly (Table 1, row 5). As for the case of vinpocetine, these effects result in a pronounced decrease in total DA

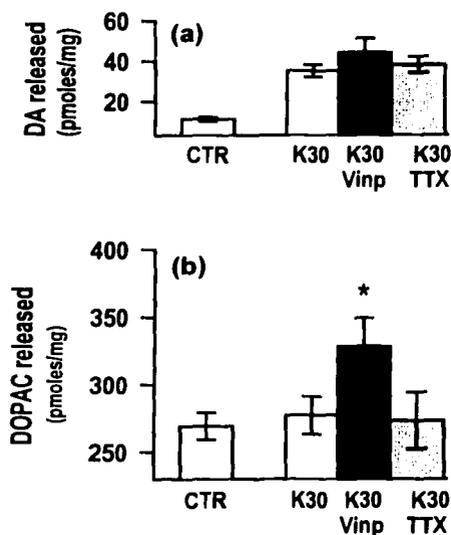


Fig. 2. Effect of vinpocetine on DA and DOPAC release in high K⁺ depolarized synaptosomes. Striatal synaptosomes were incubated for 10 min in: KRH (CTR), 30 mM high K⁺ buffer (K30), high K⁺ buffer with 15 μM vinpocetine (K30, Vinp) or high K⁺ buffer with 1 μM TTX (K30, TTX). (a) DA released, (b) DOPAC released. **P* < 0.03 between K30 and K30 and Vinp. Results are the mean ± S.E.M. values of 22, nine, seven and five independent experiments for CTR, K30, K30 plus Vinp and K30 plus TTX, respectively.

and in a pronounced increase in total DOPAC (Table 2, row 5). Reserpine does not change the total catecholamines (total DA plus total DOPAC) concentration.

The decrease in internal DA induced by reserpine and the increase in internal DA induced by clorgyline cancel each other in synaptosomes simultaneously treated with both drugs (Table 1, column 1). Also, similarly to vinpocetine, reserpine increases DOPAC release, does not change internal DOPAC significantly, and is unable to reverse the decrease in both DOPAC release and internal DOPAC induced by clorgyline (Table 1, columns 2 and 3).

Interestingly, the moderate facilitation caused by vinpocetine on the clorgyline-induced release of DA results in a dramatic potentiation in the case of reserpine. The 17 ± 2 pmol of DA released in clorgyline-treated synaptosomes increases to 112 ± 3 pmol when 1 μM reserpine is also present and only to 35 ± 8 pmol when vinpocetine is also present (Table 1, column 4).

3.6. Effect of vinpocetine on baseline and veratridine-evoked release of [³H]DA

The single and combined effects of vinpocetine and veratridine (at the concentrations used in the experiments of Fig. 1) were tested on [³H]DA release. In striatal

synaptosomes continuously superfused with buffers containing 100 μM pargyline, although 15 μM vinpocetine increases the baseline release of [³H]DA, it markedly diminishes the subsequent release of [³H]DA evoked by 20 μM veratridine (Fig. 4).

4. Discussion

In the present study the effect of vinpocetine on the release of DA and its metabolite DOPAC was investigated in striatum isolated nerve endings under resting and depolarized conditions.

We have shown that vinpocetine markedly inhibits the DAT-mediated release of endogenous DA (Fig. 1a) and preloaded [³H]DA (Fig. 4, min 7–12) triggered by the veratridine-induced increase in VSSC permeability. While vinpocetine does not influence the exocytotic release of DA evoked by high K⁺ depolarization, that does not involve VSSC (Fig. 2). These results are consistent with our previous findings that vinpocetine (5 and 15 μM) inhibits the rise in internal [Na⁺] induced by veratridine and does not influence the rise in internal [Ca²⁺] evoked by high K⁺ [30] in striatal synaptosomes, and confirm our previous conclusion that vinpocetine blocks presynaptic VSSC but does not block presynaptic Ca²⁺ channels (as has been suggested previously [36]). The present investigation shows, in addition, that vinpocetine increases DOPAC formation at the concentrations required to block presynaptic VSSC in vitro. However, the blockade of presynaptic VSSC by vinpocetine is unlikely to be linked to the mechanism responsible for vinpocetine-induced DOPAC formation, because vinpocetine increases DOPAC release independently of the state of presynaptic VSSC, either under resting or under high K⁺ or veratridine depolarized conditions (Figs. 1b and 2b). Another result confirming this conclusion is that although vinpocetine and the Na⁺ channel blocker TTX both inhibit DA release evoked by veratridine and do not modify DA release evoked by high K⁺, only vinpocetine increases DOPAC release (Figs. 1 and 2).

As a first approach to understanding the origin of the DOPAC released by vinpocetine the internal catecholamine concentrations were measured. From these experiments it became clear that vinpocetine increases DOPAC release by decreasing internal DA dose dependently (Fig. 3). In contrast to vinpocetine, the MAO inhibitor clorgyline increases total DA and decreases total DOPAC (Table 2). However, it is unlikely that vinpocetine increases MAO-A activity, as vinpocetine fails to modify the inhibition of DOPAC formation caused by clorgyline (Table 2).

Since the cytoplasm extravesicular DA (and not the DA stored inside synaptic vesicles) is the MAO substrate, compounds capable of increasing DA in the extravesicular compartment will be expected to increase DOPAC formation. In agreement with this, the reserpine-induced release

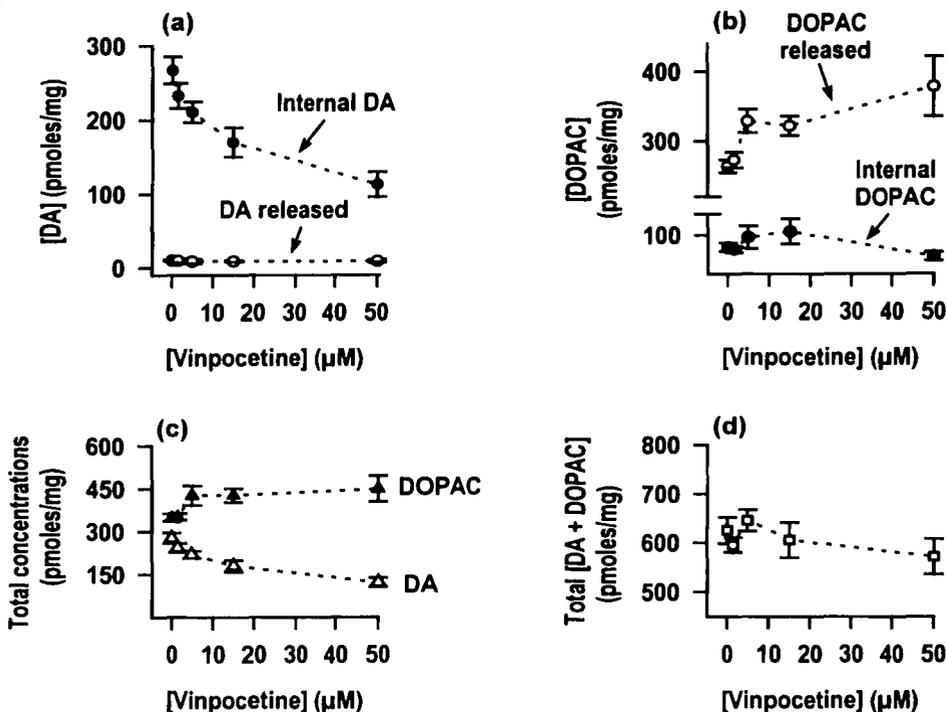


Fig. 3. Progressive effect of increasing vinpocetine concentrations on DA metabolism. Results are the mean \pm S.E.M. values of 22, three, three, six and seven independent experiments for 0 (control), 1.5, 5, 15 and 50 μ M vinpocetine, respectively. * $P < 0.05$. (a) DA concentration inside (●) and outside (○) striatum isolated nerve endings. (b) DOPAC concentration inside (●) and outside (○) striatum isolated nerve endings. (c) Internal plus external DOPAC (▲) and internal plus released DA (Δ). (d) Sum of internal and external catecholamines (squares).

of DA from the vesicular storage sites to the cytosol [16] increases DOPAC formation very efficiently (Table 2). As for the case of reserpine, vinpocetine increases DOPAC release (Table 1, column 2), decreases internal DA (Table

1, column 1) and loses this capability when MAO-A is inhibited by clorgyline (Table 1), indicating that a reserpine-like mechanism is involved in the vinpocetine-induced increase in DOPAC formation. The similitude of the changes induced by vinpocetine and reserpine, along

Table 1

Single and combined effects of clorgyline and vinpocetine (or reserpine) on the concentrations of DA and DOPAC released and retained in striatum synaptosomes

n	Experimental conditions	Internal DA	DOPAC released	Internal DOPAC	DA released
21	Control	267 \pm 18	264 \pm 9	83 \pm 6	10 \pm 1
5	Clorg.	367 \pm 30*	200 \pm 14*	15 \pm 3*	17 \pm 2*
7	Vinp.	113 \pm 17*	379 \pm 43*	70 \pm 6	9 \pm 2
4	Vinp. + Clorg.	272 \pm 25	220 \pm 14*	12 \pm 5*	35 \pm 8*
4	Reserp.	51 \pm 3*	375 \pm 11*	94 \pm 5	3 \pm 1*
4	Reserp. + Clorg.	268 \pm 3	208 \pm 9*	3 \pm 1*	112 \pm 3*

DA and DOPAC concentrations are in pmol/mg. Clorg., 0.1 μ M clorgyline; Vinp., 5 μ M vinpocetine; Reserp., 1 μ M reserpine. Results are the mean \pm S.E.M. of the indicated number (n) of independent experiments.

* $P < 0.05$, between control and drug-treated synaptosomes.

Table 2

Single and combined actions of clorgyline and vinpocetine (or reserpine) on total DA and DOPAC concentrations

n	Experimental conditions	Total DA	Total DOPAC
21	Control	277 \pm 18	349 \pm 13
5	Clorg.	384 \pm 30*	215 \pm 17*
7	Vinp.	122 \pm 16*	449 \pm 45*
4	Vinp. + Clorg.	308 \pm 27	232 \pm 16*
4	Reserp.	53 \pm 2*	469 \pm 13*
4	Reserp. + Clorg.	380 \pm 5*	211 \pm 9*

DA and DOPAC concentrations are in pmol/mg. Vinp., 50 μ M vinpocetine; Clorg., 0.1 μ M clorgyline; Reserp., reserpine 1 μ M. Results are the mean \pm S.E.M. of the indicated number (n) of independent experiments.

* $P < 0.05$, between control and drug-treated synaptosomes.

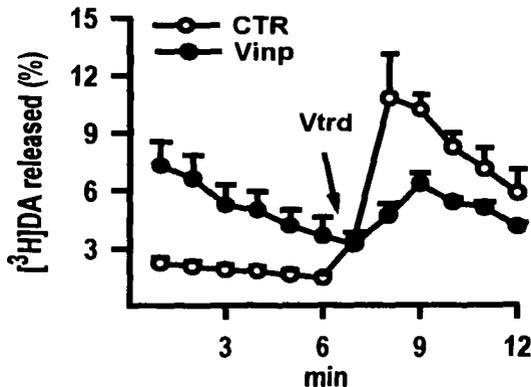


Fig. 4. Single and combined effects of vinpocetine and veratridine on [^3H]DA release. Striatal synaptosomes preloaded with [^3H]DA were superfused with KRH without (\bullet) or containing 15 μM vinpocetine (\circ). Perfusate fractions were collected at 1 min intervals. Where indicated (arrow) the respective superfusion media also contained 20 μM veratridine (Vtrd). After this treatment, additional perfusate fractions were collected. All of these superfusion media contained 100 μM pargyline. Results are the mean \pm S.E.M. values of four independent experiments.

with the structural similarity between the two drugs, strongly suggests that vinpocetine and reserpine raise DOPAC by increasing the availability of the cytoplasm extravesicular DA, which is the substrate metabolized by MAO to DOPAC.

An interesting point that emerges from the present study is that DA baseline release depends on the concentration of DA in the cytoplasm extravesicular compartment. For instance, clorgyline, which impairs degradation of the cytoplasm extravesicular DA, increases DA baseline release, and when the cytoplasm extravesicular DA is substantially increased by simultaneous treatment with reserpine (which translocates vesicular DA to the cytosol [16]) and clorgyline (which impairs cytosolic DA metabolism) DA baseline release increases remarkably (Table 1, column 4). This dramatic potentiation caused by reserpine also found for vinpocetine. However, in comparison with reserpine, vinpocetine only causes a moderate facilitation of the clorgyline-induced release of DA (Table 1, column 4). This quantitative difference is unlikely to be due to the concentration of vinpocetine, because vinpocetine was used at a maximal concentration. Whether or not the quantitative differences between the two drugs are related to the moiety of reserpine absent in the vinpocetine molecule is unknown. Reserpine inhibition of DA storage has been reported to be practically irreversible [20]. Future investigations directed at testing the reserpine-like effect of vinpocetine on other monoamines would help to establish

possible differences between vinpocetine and drugs known to compromise monoamine storage into synaptic vesicles, such as reserpine.

Most *in vitro* studies (including various in our own laboratory) directed at testing drug effects on DA release are carried out in striatal synaptosomes preloaded with radioactive DA, using superfusion buffers containing the MAO inhibitor pargyline at a high concentration (100 μM) in order to prevent radioactivity labeling of the transmitter metabolites. The experiments with preloaded [^3H]DA reported here confirm the blockade of VSSC by vinpocetine, as evidenced by the marked reduction of the veratridine-evoked release of [^3H]DA (Fig. 4, min 7–12). In these experiments the tritium released must be labeled DA (and not labeled DOPAC), as [^3H]DA metabolism is inhibited by pargyline. It is interesting to note that vinpocetine, which by itself does not influence the baseline release of endogenous DA (Fig. 1a and Table 1, column 4, rows 1 and 3), increases the baseline release of radioactive DA (Fig. 4, min 1–6). This apparent controversy is explained by the impairment of [^3H]DA storage by vinpocetine under conditions where [^3H]DA metabolism is inhibited by pargyline. This result also indicates that the facilitation produced by vinpocetine on the clorgyline-induced release of endogenous DA (Table 1, column 4) can be extended to other MAO inhibitors. Moreover, the conclusion that the baseline release of DA depends on the concentration of DA in the cytoplasm extravesicular compartment is also supported by the increase of [^3H]DA baseline release observed in vinpocetine-treated synaptosomes, because in synaptosomes exposed to pargyline and vinpocetine all the preloaded [^3H]DA might be localized in the cytoplasm extravesicular compartment, as [^3H]DA metabolism is inhibited and [^3H]DA storage is impaired. In control synaptosomes the [^3H]DA concentration in the extravesicular compartment might be reduced by the partial storage of preloaded [^3H]DA inside synaptic vesicles.

In summary, the inhibition of neurotransmitter release triggered by the increase in presynaptic VSSC permeability is likely to contribute to the vinpocetine neuroprotective capability in the CNS, because the inhibition by vinpocetine of the veratridine-evoked release of DA shown here is extended to the excitatory amino acid neurotransmitters [30], which are 1000 times more concentrated than DA, even in the population of striatum isolated nerve endings [31]. Whether or not the effect of vinpocetine on the vesicular storage of DA, which increases the concentration of DOPAC exported to the synapse, also contributes to the neuroprotective capability of vinpocetine in ischemia, one of the main causes of neuronal damage, is unknown. Nevertheless, it is interesting that DOPAC release has been shown to be ATP-dependent [13] and that the reduction of ATP levels by ischemia particularly

reduces the release of DA metabolites, including DOPAC [7,17,33,35].

Acknowledgements

The authors thank Luz María Chiu and, especially, Araceli Guarneros for their excellent technical assistance. This work was supported financially by project IN201300 from PAPIIT, UNAM and by project 35122-N from SEP-CONACYT.

References

- [1] V. Adam-Vizi, External Ca^{2+} -independent release of neurotransmitters, *J. Neurochem.* 58 (1992) 395–405.
- [2] T. Araki, H. Kato, K. Kogure, Comparative protective effects of vincoate, baclofen, and pentobarbital against neuronal damage following repeated brief cerebral ischemia in the gerbil brain, *Res. Exp. Med.* 191 (1991) 371–378.
- [3] R. Balestreri, L. Fontana, F. Astengo, A double-blind placebo controlled evaluation of the safety and efficacy of vinpocetine in the treatment of patients with chronic vascular senile cerebral dysfunction, *J. Am. Geriatr. Soc.* 35 (1987) 425–430.
- [4] I.S. Fairbrother, G.W. Arbuthnot, J.S. Kelly, S.P. Butcher, In vivo mechanisms underlying dopamine release from rat nigrostriatal terminals: I. Studies using veratrine and ouabain, *J. Neurochem.* 54 (1990) 1834–1843.
- [5] M.I. Fekete, T. Szentendrei, J.P. Herman, B. Kanyicska, Effects of reserpine and antidepressants on dopamine and DOPAC (3,4-dihydroxyphenylacetic acid) concentrations in the striatum, olfactory tubercle and median eminence of rats, *Eur. J. Pharmacol.* 64 (1980) 231–238.
- [6] D. Hadjiev, S. Yancheva, Rheoencephalographic and psychological studies with ethyl apovincamine in cerebral vascular insufficiency, *Arzneimittelforschung* 26 (1976) 1947–1950.
- [7] L. Hillered, A. Hallstrom, S. Segersvard, L. Persson, U. Ungerstedt, Dynamics of extracellular metabolites in the striatum after middle cerebral artery occlusion in the rat monitored by intracerebral microdialysis, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 9 (1989) 607–616.
- [8] A. Imperato, G. Di Chiara, Trans-striatal dialysis coupled to reverse phase high performance liquid chromatography with electrochemical detection: a new method for the study of the in vivo release of endogenous dopamine and metabolites, *J. Neurosci.* 4 (1984) 966–977.
- [9] T. Kawano, K. Tsutsumi, H. Miyake, K. Mori, Striatal dopamine in acute cerebral ischemia of stroke-resistant rats, *Stroke* 19 (1988) 1540–1543.
- [10] G.A. King, Protective effects of vinpocetine and structurally related drugs on the lethal consequences of hypoxia in mice, *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 286 (1987) 299–307.
- [11] R.L. Martin, H.G.E. Lloyd, A.I. Cowan, The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death?, *Trends Neurosci.* 17 (1994) 251–257.
- [12] E.M. Meyer, J.R. Cooper, Correlations between Na^{+} - K^{+} ATPase activity and acetylcholine release in rat cortical synaptosomes, *J. Neurochem.* 36 (1981) 467–475.
- [13] J.K. Miyamoto, E. Uezu, S.I. Terashima, Active transport pumps of HVA and DOPAC in dopaminergic nerve terminals, *Physiol. Behav.* 49 (1991) 141–147.
- [14] D.G. Nicholls, Release of glutamate, aspartate, and gamma-aminobutyric acid from isolated nerve terminals, *J. Neurochem.* 52 (1989) 331–341.
- [15] T. Oishi, R.J. Wurtman, Effect of tyrosine on brain catecholamine turnover in reserpine-treated rats, *J. Neural Transm.* 53 (1982) 101–108.
- [16] D. Peter, J. Jimenez, Y. Liu, J. Kim, R.H. Edwards, The chromaffin granule and synaptic vesicle amine transporters differ in substrate recognition and sensitivity to inhibitors, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 7231–7237.
- [17] L.A. Phebus, R.E. Mincey, J.A. Clemens, Ischemia increases tissue and decreases extracellular levels of acid dopamine metabolites in the rat striatum: further evidence for active transport of metabolites, *Life Sci.* 56 (1995) 1135–1141.
- [18] M. Raiteri, F. Cerrito, A.M. Cervoni, R. Del Carmine, M.T. Ribera, G. Levi, Release of dopamine from striatal synaptosomes, *Ann. Ist. Super. Sanita* 14 (1978) 97–110.
- [19] R. Rischke, J. Kriegstein, Effects of vinpocetine on local cerebral blood flow and glucose utilization seven days after forebrain ischemia in the rat, *Pharmacology* 41 (1990) 153–160.
- [20] G. Rudnick, S.S. Steiner-Mordoch, H. Fishkes, Y. Stern-Bach, S. Schuldiner, Energetics of reserpine binding and occlusion by the chromaffin granule biogenic amine transporter, *Biochemistry* 29 (1990) 603–608.
- [21] M.S. Santos, A.J. Moreno, A.P. Carvalho, Relationships between ATP depletion, membrane potential and the release of neurotransmitters in rat nerve terminals. An in vitro study under conditions that mimic anoxia, hypoglycemia, and ischemia, *Stroke* 27 (1996) 941–950.
- [22] D. Sauer, R. Rischke, T. Beck, C. Rozberg, H.D. Mennel, G.W. Bielenberg, J. Kriegstein, Vinpocetine prevents ischemic cell damage in rat hippocampus, *Life Sci.* 43 (1988) 1733–1739.
- [23] J.C. Shih, K. Chen, M.J. Ridd, Monoamine oxidase: from genes to behavior, *Annu. Rev. Neurosci.* 22 (1999) 197–217.
- [24] M. Sitges, Effect of organic and inorganic calcium channel blockers on γ -amino-n-butyric acid release induced by monensin and veratrine in the absence of external calcium, *J. Neurochem.* 53 (1989) 436–441.
- [25] M. Sitges, L.M. Chiu, Characterization of the type of calcium channel primarily regulating GABA exocytosis from brain nerve endings, *Neurochem. Res.* 20 (1995) 1072–1079.
- [26] M. Sitges, L.M. Chiu, w-Aga IVA selectively inhibits the calcium dependent fraction of the evoked release of [^3H]GABA from synaptosomes, *Neurochem. Res.* 20 (1995) 1065–1071.
- [27] M. Sitges, L.M. Chiu, J.R. de la Fuente, The effect of verapamil on GABA and dopamine release does not involve voltage-sensitive calcium channels, *Brain Res.* 534 (1990) 51–59.
- [28] M. Sitges, L.M. Chiu, L. González, Vesicular and carrier-mediated depolarization-induced release of ^3H -GABA: inhibition by verapamil and amiloride, *Neurochem. Res.* 18 (1993) 1081–1087.
- [29] M. Sitges, V. Nekrassov, Characterization of vinpocetine mechanism of action in rat striatum synaptosomes, *J. Neurochem.* 71 (Suppl.) (1998) S19A.
- [30] M. Sitges, V. Nekrassov, Vinpocetine selectively inhibits neurotransmitter release triggered by sodium channel activation, *Neurochem. Res.* 24 (1999) 1585–1591.
- [31] M. Sitges, V. Nekrassov, A. Guarneros, Simultaneous action of MK-801 (dizelopine) on dopamine, glutamate, aspartate and GABA release from striatum isolated nerve endings, *Brain Res.* 854 (2000) 48–56.
- [32] M. Sitges, A. Reyes, L.M. Chiu, Dopamine transporter mediated release of dopamine: role of chloride, *J. Neurosci. Res.* 39 (1994) 11–22.
- [33] A. Slivka, T.S. Brannan, J. Weinberger, P.J. Knott, G. Cohen, Increase in extracellular dopamine in the striatum during cerebral ischemia: a study utilizing cerebral microdialysis, *J. Neurochem.* 50 (1988) 1714–1718.

- [34] M. Szatkowski, D. Attwell, Triggering and execution of neuronal death in brain ischaemia: two phases of glutamate release by different mechanisms, *Trends Neurosci.* 17 (1994) 359–365.
- [35] C.C. Toner, J.A. Stamford, Effects of metabolic alterations on dopamine release in an in vitro model of neostriatal ischaemia, *Brain Res. Bull.* 48 (1999) 395–399.
- [36] L. Tretter, V. Adam-Vizi, The neuroprotective drug vinpocetine prevents veratridine-induced $[Na^+]_i$ and $[Ca^{2+}]_i$ rise in synaptosomes, *Neuroreport* 9 (1998) 1849–1853.
- [37] J. Urenjak, T.P. Obrenovitch, Pharmacological modulation of voltage-gated Na^+ channels: a rational and effective strategy against ischemic brain damage, *Pharmacol. Rev.* 48 (1996) 21–67.
- [38] H. Yao, S. Sadoshima, T. Ishitsuka, T. Nagao, M. Fujishima, T. Tsutsumi, H. Uchimura, Massive striatal dopamine release in acute cerebral ischemia in rats, *Experientia* 44 (1988) 506–508.