

00322
51

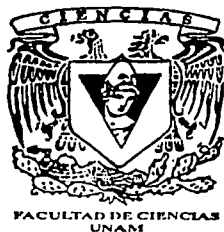


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"DISTRIBUCION DE ZINC EN DIFERENTES REGIONES DEL
CEREBRO DESPUES DE LA ADMINISTRACION DE
1-METIL-4-FENILPIRIDINO, UN MODELO EXPERIMENTAL
DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A:
JAVIER EDGAR FRANCO PEREZ



DIRECTOR DE TESIS: DRA. PATRICIA ROJAS CASTAÑEDA



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A



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.

PAGINACION DISCONTINUA



ESTADOS UNIDOS MEXICANOS
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Distribución de zinc en diferentes regiones del cerebro después
de la administración de 1-metil-4-fenilpiridino, un modelo experimental
de la enfermedad de Parkinson"

realizado por Javier Edgar Franco Pérez

con número de cuenta 9653271-7 , quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

A t e n t a m e n t e

Director de Tesis

Propietario Dra. Patricia Rojas Castañeda

Patricia Rojas S.

Propietario Dra. Patricia Rivas Manzano

Patricia Rivas M.

Propietario Dra. Marcela Esperanza Aguilar Morales.

Marcela Aguilar

Suplente M. en C. Gabriel López Velazquez

G. López

Suplente Biol. Irma Elena López Martínez

Irma López

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

Consejo Departamental de Biología

[Firma]
M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

B

A MIS PADRES

Este es el premio por todo lo que me han dado y no solo estoy hablando de los años de Universidad, si no de todo lo que hemos pasado juntos a lo largo de 26 años; sin ustedes esto no se hubiera logrado. Gracias Mamá. Gracias Papá.

A MÓNICA

No existen palabras para agradecerte todo lo que me has dado y lo que hemos vivido. Gracias por tu amor, tu paciencia, tu comprensión y tu apoyo. Gracias de verdad, por hacer más feliz mi vida.

A CARLOTITA Y A LOW

.....ustedes tenían que ver esto.

A MIS HERMANOS

Gracias a Noe, Isai y Nadia por soportarme durante estos largos años.

A MIS AMIGOS

Nada podía ser mejor al final de la carrera que conocerlos y darme cuenta la clase de personas que son.....mas que mis amigos son mis hermanos.

Gracias a Sara Gonzáles, Dr. Pedro Pérez, Héctor Olguín, David Ortiz, Polo Benítez, Alari Huesca, Roberto Suárez, Jimena Vergara, Mónica Salas y Mónica Adriana.

Gracias por aceptarme en su distinguido grupo y por todo lo que hemos pasado juntos. Esto también es parte de todos ustedes. Gracias, los quiero mucho.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez" por todas las facilidades otorgadas para la realización de esta tesis.

Al Laboratorio de Neurotoxicología y en particular a la Dra. Patricia Rojas Castañeda por permitir el desarrollo de este trabajo bajo su tutela.

A la Biól. Norma Serrano por todo su tiempo y su ayuda técnica durante las diferentes fases de realización de este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgar la beca No. 1644 del proyecto 28605 durante 13 meses.

En especial a la Dra. Patricia Rivas, a la Dra. Marcela Aguilar, al M. en C. Gabriel López y a la Biól. Irma López por aceptar ser mis sinodales y por apoyarme con un poco de su valioso tiempo para revisar esta tesis.

A todos mis amigos y compañeros: Oliva, Aldo, Pablo, Arturo, Adrián, Jesús, Ariel, Demian, Héctor, Mike y Memo. Gracias por todo lo que me enseñaron y por ayudarme a pasar muy buenos momentos a lo largo de mi estancia en la facultad.

A Iñigo y Rosana por permitirme su amistad incondicional y sin mirar defectos.

Gracias a Araceli de la Torre y al Dr. Miguel Ángel Padilla por todo lo que me han apoyado a lo largo de este tiempo, ya son parte de mi familia.

D

INDICE

RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	2
II. ANTECEDENTES	
A. GENERALIDADES DEL ZINC	3
B. METABOLISMO DEL ZINC EN EL CEREBRO	
i. Localización del zinc en el sistema nervioso central	3
ii. Técnicas para localizar zinc en el sistema nervioso central	7
iii. Liberación y recaptura de zinc durante la actividad cerebral	8
iv. Transportadores de zinc en las neuronas	9
v. Transporte de zinc hacia el cerebro por medio de la barrera hematoencefálica	10
vi. Funciones del zinc unido a proteínas	12
vii. Zinc y Superóxido dismutasa	13
viii. Zinc y Metalotioneína	14
ix. Neurotoxicidad del zinc	17
x. Neuroprotección y propiedades antioxidantes del zinc	17
xi. Enfermedades neurodegenerativas y su posible relación con el zinc	18
C. ENFERMEDAD DE PARKINSON	
i. Generalidades y posibles factores de riesgo	20
ii. Tratamientos de la enfermedad de Parkinson	24
iii. Procesos que generan estrés oxidativo en el cerebro	25
iv. Modelos experimentales de la enfermedad de Parkinson	27
D. LA ADMINISTRACIÓN DE LA MPTP COMO UN MODELO EXPERIMENTAL DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON	
i. Parkinsonismo inducido por la MPTP	28
ii. Bioactivación y metabolismo de la MPTP	28
iii. Evidencias del MPP ⁺ como metabolito tóxico	30
iv. Mecanismos de neurotoxicidad	31
III. JUSTIFICACIÓN	35
IV. HIPÓTESIS	36
V. OBJETIVOS	
i. Objetivo general	37
ii. Objetivos específicos	37

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

i. Animales.....	38
ii. Reactivos y drogas.....	38
iii. Administración de MPP ⁺ y preparación del tejido.....	38
iv. Histoquímica.....	39
v. Densitometría.....	39
vi. Análisis del contenido de dopamina estriatal.....	40
vii. Análisis estadístico.....	41

VII. RESULTADOS

i. Cuerpo estriado.....	42
ii. Ventriculos laterales.....	43
iii. Cerebelo.....	44
...iv. Núcleo arcuato.....	44
v. Hipocampo.....	47
vi. Dopamina estriatal.....	53

VIII. DISCUSIÓN.....54

IX. CONCLUSIÓN.....59

X. APENDICES

i. Especies reactivas del oxígeno.....	60
ii. Especies reactivas del nitrógeno.....	61
iii. Mecanismos de protección contra los radicales libres.....	61

XI. BIBLIOGRAFÍA.....63

f

RESUMEN

El zinc es un elemento traza esencial en el sistema nervioso central (SNC) y se localiza a lo largo del cerebro en tres fuentes principales: libre, unido a proteínas, y secuestrado en vesículas presinápticas. El zinc tiene la capacidad para retardar procesos oxidativos por sí mismo, enlazándose a grupos tiol y disminuyendo su oxidación, o induciendo la síntesis de algún otro antioxidante como la metalotioneína. El 1-metil-4-fenilpiridino (MPP⁺), metabolito tóxico de la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridino (MPTP), induce parkinsonismo en humanos, monos y roedores, produciendo una disminución de dopamina y degeneración celular de la vía nigroestriatal. Se ha propuesto que el daño puede ser el resultado de la inhibición del complejo 1 de la cadena respiratoria e inducción de estrés oxidativo en el cual se generan especies reactivas del oxígeno. En este trabajo evaluamos el efecto de la administración del MPP⁺ sobre el contenido de zinc histoquímicamente reactivo en cuerpo estriado, plexos coroideos, epitelio ventricular, cerebelo, núcleo arcuato e hipocampo. Se utilizaron ratones macho de la cepa C-57 black, a los cuales se les administró intracerebroventricularmente una dosis única del MPP⁺ (18 µg/3µl), otro grupo de animales inyectados con solución salina sirvió como control. Los ratones de ambos grupos fueron perfundidos a tiempos variables (1, 2, 24 hrs y 7 días). La detección del zinc se elaboró con el método histoquímico de Timm. El análisis se obtuvo por medio de un microscopio óptico y del software Metamorph Imaging System, cuantificando la densidad óptica de un área conocida en las diferentes regiones. La densidad óptica del zinc disminuye en todos los tiempos analizados en el cuerpo estriado y epitelio ventricular. En el núcleo arcuato y los plexos coroideos solamente se observa una disminución en la tinción a las 1 y 24 hrs respectivamente. Por el contrario, en las regiones del hipocampo se muestra un incremento principalmente en las capas oriens y radiata a diferentes tiempos. El MPP⁺ no afecta la densitometría del zinc en el cerebelo, giro dentado y capas piramidal y molecular del hipocampo.

Finalmente, la neurotoxicidad ocasionada por el MPP⁺ podría ser la causa de la disminución del zinc histoquímicamente reactivo, de igual manera, la deficiencia de este metal puede producir daño oxidativo por la acumulación de especies reactivas del oxígeno.

I. INTRODUCCIÓN

El término "elementos traza" se refiere a un grupo de elementos químicos presentes a bajas concentraciones en diversas células. Algunos de estos elementos llevan a cabo funciones esenciales y deben ser obtenidos del ambiente en cantidades adecuadas para optimizar el metabolismo celular.

Se han considerado a los siguientes 12 elementos como esenciales para los animales: arsénico, cromo, cobalto, cobre, yodo, hierro, manganeso, molibdeno, níquel, selenio, silíce y zinc. Existe alguna evidencia para la esencialidad de cinco elementos ultratraza adicionales (boro, flúor, plomo, litio y vanadio), y muy poca evidencia para otros tres (bromo, cadmio y estaño) (Nielsen, 1984).

Los metales de transición son esenciales para la vida (Chung y cols, 2000), y entre ellos, el zinc es el cuarto ión más abundante en el cerebro y es uno de los más importantes para los sistemas biológicos (Ebadi y Hama, 1986). Las propiedades físico-químicas del zinc son la base para su extensa participación en la estructura de proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos y metabolismo de lípidos, además de la transcripción, división celular y desarrollo (Vallee, 1995).

Existen varias evidencias que sugieren que el zinc podría estar relacionado en varias enfermedades neurológicas. Estudios post-mortem han revelado incrementos en el contenido de zinc en varias regiones del cerebro de humanos con trastornos neurodegenerativos como la enfermedad de Parkinson (Dexter y cols, 1991) y la enfermedad de Alzheimer (Cuajungco y Lees, 1997a; Danscher y cols, 1997), además, se ha observado que los iones de zinc promueven la agregación de la proteína β -amiloide (Bush y cols, 1994), un efecto que podría facilitar el desarrollo de la neuropatología de la Enfermedad de Alzheimer.

II. ANTECEDENTES

A. GENERALIDADES DEL ZINC

El zinc es un elemento del grupo 2b, tiene peso molecular de 65.38, número atómico de 30 y una valencia de 2. Es un metal lustroso, su estructura esta fuertemente empaquetada en un hexágono distorsionado y pierde electrones en sistemas acuosos para formar Zn^{2+} . En nutrición, se considera un elemento traza indispensable, ya que puede influir en numerosas funciones celulares, incluyendo mecanismos inmunes, hormonales y enzimáticos (Budavari y cols, 1989).

El zinc es un pequeño ión y como un metal de transición se enlaza principalmente a ligandos que contienen azufre, nitrógeno y en menos extensión oxígeno (Bettger y O'Dell, 1981).

B. METABOLISMO DEL ZINC EN EL CEREBRO

i. Localización del zinc en el Sistema Nervioso Central

En el sistema nervioso central existen tres fuentes principales de zinc:

1) Zinc vesicular, el cual esta localizado en las vesículas sinápticas de una clase especial de neuronas que son encontradas principalmente en el sistema límbico. Estas neuronas forman una vasta red asociativa cortico-cortical y cortico-límbica que esta especialmente concentrada en regiones hipocampales, amigdalinas y paralímbicas (Frederickson, 1989).

El zinc vesicular puede ser teñido por varias técnicas histoquímicas (Timm, Neo-Timm, Selenio, etc.) y de esta manera es accesible a estudios histológicos e histoanalíticos. Las funciones del zinc dentro de las vesículas y después de la liberación fisiológica en la hendidura sináptica aun están siendo analizadas y son de gran interés en la neurobiología del zinc.

2) Zinc libre, es una fuente completamente hipotética de iones de Zn^{+2} presentes en el citoplasma o fluido intersticial. Existen muchos ligandos (péptidos y proteínas) que enlazan zinc en el cerebro (Itoh y cols, 1983; Ebadi y Hama, 1986), por lo tanto es muy probable que cualquier ión de zinc que sea liberado pueda rápidamente ser enlazado.

3) Zinc que se encuentra firmemente unido en la estructura de muchas proteínas en el cerebro. Esta fuente ocupa aproximadamente 85-95% del zinc que se encuentra en el cerebro y esta involucrada únicamente en las funciones específicas metabólicas y no metabólicas de las proteínas que contienen zinc (Frederickson, 1989).

La concentración de zinc en el cerebro es alta (tabla 1). La cantidad de zinc en el sistema nervioso central de los mamíferos varia, generalmente se presentan cantidades mas bajas en la materia blanca (26-40 ppm en materia blanca cortical) que en la materia gris (60-90 ppm en materia gris cortical). Ciertas regiones del cerebro, como las fibras musgosas del hipocampo, son especialmente ricas en zinc (136-145 ppm) (Choi y Koh, 1998).

Tabla 1. Concentraciones de zinc en varias regiones del cerebro ($\mu\text{g/g}$ de peso seco)

Región	Cerebro humano	Región	Cerebro de rata
Corteza frontal	73.5	Cerebelo	53.5
Corteza cerebelar	74.4	Corteza	68.9
Cuerpo calloso	28.8	Hipocampo	88.2
Hipocampo	107	Hipotálamo	52.0
Pallidum	76.2	Medula oblongata	36.2
Putamen	76.8	Mesencéfalo	49.4
Substancia nigra	66.8	Estriado	67.4

(Tomado de Prohaska, 1987).

Dansch (1981) fue el primero en poner interés y revisar las técnicas histoquímicas para detectar metales, enfatizando en la técnica de Timm y concluyendo que la extrema sensibilidad y la habilidad del método para localizar metales hasta un

nivel estructural, la coloca como una herramienta muy útil para la localización de los metales en los tejidos.

El método de Timm para la detección histoquímica de metales define con gran precisión muchas terminales en el cerebro de mamíferos. Esta técnica generalmente muestra terminales axonales que contienen zinc (Frederickson y cols, 1992; Danscher, 1981) y por esta razón, es una técnica útil para precisar los campos terminales que contienen zinc en el cerebro.

Slomianka y cols en 1990 identificaron poblaciones extensas de neuronas reactivas al método de Timm en las capas II, III y VI de todas las áreas neocorticales, en las capas superficial y profunda de las áreas prepiriformes, y por último con un alto grado de diferenciación regional, en las cortezas retrosplenial, entorinal, para y presubicular, la formación hipocámpal y el complejo amigdalino.

La distribución laminar específica de zinc ha sido reportada por varios autores en diferentes áreas corticales de ratas, gatos y monos (Dyck y Cynader, 1993; Dick y cols, 1993). Otros resultados han mostrado que en la neocorteza, la concentración más alta de la tinción de zinc se encuentra en las capas I y II, perdiendo progresivamente la intensidad hacia la capa IV, la cual permanece débilmente teñida hasta la parte superior de la capa V la cual se observa intensamente teñida (Czupryn y Skangiel-Kramska, 1997).

Las neuronas que precipitan iones de plata después de la técnica de Timm se han observado en las capas II, V y VI del área entorinal lateral, en el parasubiculum, presubiculum, en la capa piramidal del hipocampo y en la capa granular del giro dentado (Slomianka, 1992); además, las neuronas de la corteza medial mandan axones que terminan en botones positivos a la técnica de Timm en la corteza cerebral (López y Martínez, 1988).

Estos resultados son de vital importancia, porque muestran componentes que contienen zinc, importantes en la red asociativa que interconecta la corteza cerebral y los sistemas amigdalohipocampales en el cerebro.

Todos estos estudios han determinado que los somas que contienen zinc en el cerebro de la rata se encuentran en todos los núcleos amigdalinos excepto en el núcleo medial y central, el núcleo del tracto olfatorio accesorio, el núcleo del tracto olfatorio lateral y el área amigdalina anterior.

Las proyecciones que contienen zinc, extrínsecas a los mismos campos amigdalinos terminales, se originan de las cortezas infralímbica, cingulada, piriforme, peririnal y entorinal, del prosubiculum y región CA1 del hipocampo (Long y cols, 1995).

El hipocampo es una estructura límbica particularmente rica en zinc. En las ratas, este metal presenta un rango de 77.2 a 92.7 ppm y la diferencia promedio entre el hipocampo izquierdo y derecho es de 3.3 ppm. La menor cantidad (35 ppm) se encuentra en la fimbria y la mayor en el hilus (145 ppm). La cantidad de zinc directamente asociada con los axones de las fibras musgosas se estima en aproximadamente el 8% del zinc total en el hipocampo y la concentración de zinc en las fibras musgosas se estima entre 220-300 μ M. La distribución de zinc en el hipocampo de humanos de entre 65 a 80 años se reporta similar a la distribución de la rata (Frederickson y cols, 1983).

La tinción de Timm ha permitido localizar los botones sinápticos intrahipocampales (Kelly y cols, 1982). Niglio y cols (1990) al examinar la intensidad de la tinción de Timm, por medio de técnicas microdensitométricas y análisis cuantitativo de imágenes, encontraron que no existen asimetrías derecha-izquierda en la densidad de la tinción en el giro dentado, la capa dendrítica de los campos CA1 y CA2, las fibras musgosas y el subiculum.

Pérez-Clausell y Danscher en 1986 determinaron que las neuronas corticales son la fuente primaria (probablemente exclusiva), de los botones que contienen zinc en el

estriado, a causa de que la tinción del zinc en los botones del cuerpo estriado se pierde después de lesiones corticales. En otro estudio, también se comprobó que todas las divisiones de la perialocorteza mandan proyecciones a una parte del putamen (Turner y Zimmer, 1984).

Diversos estudios han examinado el patrón de distribución de zinc en el cuerpo estriado de la rata en desarrollo usando el método histoquímico de Timm. Estos estudios indican que la intensidad de la tinción es muy débil en el día 3 después del nacimiento; sin embargo, al día 11 la tinción se torna más homogénea y es similar a la etapa adulta (Vincent y Semba, 1989). Por el contrario, Mancini y cols en 1992 reportaron, mediante la tinción de Timm, que la densidad y distribución de terminales estriatales que contienen zinc disminuyen entre ratas jóvenes y adultas. Aunque la concentración de zinc en el cuerpo estriado es alta, no existen estudios que describan su distribución y la función de este metal en esta región del cerebro.

ii. Técnicas para localizar zinc en el Sistema Nervioso Central

Para determinar el contenido y la localización de los metales de transición, especialmente zinc, se han utilizado en el sistema nervioso central de diversos mamíferos, una gran variedad de técnicas: histoquímicas (Danscher, 1981; Schwerdtfeger y cols, 1985; Holm y cols, 1991; Kesslak y cols, 1987; Niglio y cols, 1990; Sorensen y cols, 1998) que incluyen la de Timm (Danscher, 1981), Ditizona (Frederickson y cols, 1981), Selenio (Danscher, 1982) y fluorescencia de quinolina (Frederickson y cols, 1987); espectrofotometría de absorción atómica (Ono y George, 1999; Ebadi y cols, 1996; Danscher y cols, 1975; Sato y cols, 1984); dilución de isótopo-estable (Frederickson y cols, 1982, 1983); transporte retrógrado/anterógrado (Howell y Frederickson, 1989; Long y cols, 1995; Christensen y Frederickson, 1998); y autorradiografía (Takeda y cols, 1994a, 1998).

Los iones sulfuro fueron usados para procedimientos histoquímicos desde 1850, cuando se usaron para demostrar la localización de fierro. Cien años más tarde, el método de sulfuro de plata, basado en la transformación histoquímica de metales a sulfuros de metal, fue introducido por Timm. La técnica de Timm, consiste en una transformación del zinc disponible en el tejido a sulfuro de zinc, por medio de la perfusión con una solución de sulfuro de sodio. El sulfuro de zinc puede ser visualizado después de la reducción de los iones de plata por medio de un revelador físico. La formación de los sulfuros de zinc es seguida por un procedimiento usando un revelador fotográfico, donde los sulfuros de zinc catalizan la reducción de los iones de plata a plata metálica, la cual permanece unida donde se formó y de esta forma revela la localización precisa del zinc (para referencias ver Danscher, 1981).

iii. Liberación y recaptura de zinc durante la actividad cerebral

Aún no se comprende en su totalidad el papel de los metales de transición divalentes en la función neural. Se ha sugerido que los iones de zinc, los cuales están contenidos en las terminales nerviosas, son expulsados hacia el espacio extracelular durante la actividad neuronal (Howell y cols, 1984; Pérez-Clausell y Danscher, 1986; Assaf y Chung, 1984).

Assaf y Chung (1984) reportaron que los iones de zinc están en altas concentraciones en las fibras musgosas de la formación hipocampal y demostraron por primera vez que una gran cantidad de Zn^{2+} se libera en el espacio extracelular durante la excitación de tejido hipocampal.

Utilizando preparaciones de cortes de hipocampo, se demostró que la estimulación eléctrica aplicada a dendritas de células granulares, selectivamente facilita la recaptura de zinc en las fibras musgosas y en la capa granular (Howell y cols, 1984). Estos resultados revelan que la tasa de pérdida (liberación y recaptura) de zinc en las

fibras musgosas se acelera por la estimulación eléctrica del giro dentado. Y abren la posibilidad de que el zinc participe en las funciones de señalización sináptica de los axones de las fibras musgosas.

Actualmente, es incierto si el zinc participa directamente en la neurotransmisión sináptica o si esta involucrado en funciones de mensajero neuromodulador o neurotrófico.

iv. Transportadores de zinc en las neuronas

Se ha demostrado que el zinc, en las neuronas, utiliza varias vías de entrada y salida las cuales incluyen: (1) liberación presináptica junto con glutamato cuando las vesículas sinápticas vacían su contenido en la hendidura sináptica, (2) canales de Ca^{2+} tipo L cerrados por voltaje que proporcionan una ruta de entrada cuando las células están despolarizadas y que median la toxicidad del zinc extracelular y (3) transportadores de membrana potencialmente presentes en todas las neuronas y que son de vital importancia para la homeostasis del zinc intracelular (para referencias ver Colvin y cols, 2000a).

Hasta el momento se han clonado tres genes para transportadores de zinc en mamíferos: el ZnT-1 que está asociado con la membrana plasmática, el ZnT-2 que muestra asociación con el retículo endoplásmico y el ZnT-3 que se expresa en las membranas de las vesículas sinápticas de regiones del cerebro que son ricas en zinc (Colvin, 1998).

Estudios con microscopía electrónica en ratones y monos, muestran que el ZnT-3 se localiza en las membranas de las pequeñas vesículas sinápticas en los botones de las fibras musgosas (Wenzel y cols, 1997).

La presencia del transportador ZnT-3 en las membranas de las vesículas sinápticas y la habilidad de estas neuronas para liberar zinc después de la excitación,

sugieren que el ZnT-3 es responsable del transporte de zinc dentro de las vesículas sinápticas.

El conocimiento de las vías neuronales de entrada y salida para el zinc es de importancia crítica para que la homeostasis del zinc sináptico pueda ser completamente entendida. Sin embargo, los mecanismos celulares de entrada y salida de zinc son desconocidos en gran forma y existen pocos modelos que describen el transporte celular del zinc.

Los trabajos de Colvin (1998) identificaron un transportador de zinc reversible a través de la membrana plasmática de neuronas y la existencia de un transportador (antiportador) membranar que intercambia Zn^{2+} por H^+ en el cerebro de rata.

Este antiportador $\text{Zn}^{2+}/\text{H}^+$ puede contribuir a la recaptura de zinc para rellenar las vesículas presinápticas después de la estimulación, además puede tener importantes implicaciones fisiopatológicas en el cerebro, ya que el zinc es considerado un factor que contribuye a los mecanismos de excitotoxicidad del glutamato, y este antiporter podría proporcionar un mecanismo para que grandes cantidades de zinc entren en la neurona (Colvin y cols, 2000b).

Por otra parte, en los últimos años se ha observado la presencia de sitios que enlazan Zn^{2+} en varios receptores proteicos del cerebro. Estos incluyen receptores ionotrópicos de glutamato y algunos subtipos del receptor GABA (Peters y cols, 1987). Incluso, existe evidencia directa que el transportador de dopamina humano posee un sitio de alta afinidad para enlace de Zn^{2+} y que este metal es un modulador de la actividad del transportador de dopamina (Norregaard y cols, 1998).

v. Transporte de zinc hacia el cerebro por medio de la barrera hematoencefálica

La afinidad del zinc por los ligandos en el suero es muy importante para entender los mecanismos de transporte del zinc hacia el cerebro por medio de los dos

sistemas biológicos de barrera: la barrera hematoencefálica y la barrera hemato-liquido cefalorraquideo (LCR) (figura 1).

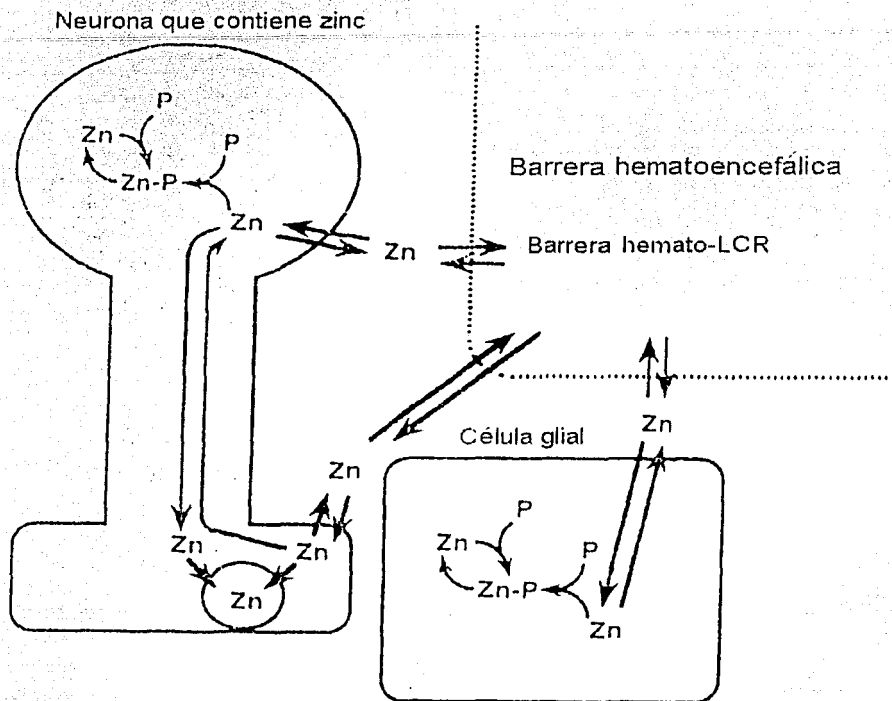


Figura 1. Transporte y utilización de zinc en el cerebro. El zinc es transportado hacia el cerebro por medio de la barrera hematoencefálica y la barrera hemato-LCR. El zinc es tomado por las neuronas, las cuales pueden tener dos sitios de recaptura, por ejemplo, el cuerpo celular y la terminal neuronal, y también por las células gliales para después ser incorporado en proteínas. En neuronas glutamatérgicas, el zinc capturado es transportado en vesículas presinápticas y utilizado como neuromodulador, Zn: zinc, P: proteína (Tomado de Takeda, 2000).

El zinc en el suero (aproximadamente 15 μM) está dividido en tres fracciones: la forma unida a proteínas, la forma unida a ligandos de bajo peso molecular y el Zn^{2+} libre. El zinc unido a proteínas del suero y a ligandos de bajo peso molecular es cerca de 98% y 1-2% respectivamente, del total de zinc presente en el suero. Por otra parte, la

concentración de zinc libre en el suero de mamíferos ha sido estimada en valores tan bajos como 10^{-9} - 10^{-10} M, con lo que podemos decir que el Zn^{2+} libre es una fracción muy pequeña del zinc intercambiable en el suero (Magneson y cols, 1987).

Los componentes más abundantes de zinc intercambiable en el suero son la albúmina y algunos aminoácidos, como histidina y cisteína. Se ha propuesto que la albúmina tiene dos sitios de unión con la misma afinidad para el zinc y de esta forma puede participar en el transporte de zinc (Takeda, 2000).

Bruxani y cols en 1994 reportaron que el transporte de ^{65}Zn en el cerebro durante una corta perfusión cerebrovascular se incrementa con la adición de *L*-histidina. Estos resultados sugieren que la *L*-histidina esta involucrada en el transporte de zinc hacia el cerebro por medio de las barreras hematoencefálica y hemato-LCR.

Sin embargo, el mecanismo de entrada del zinc hacia las células endoteliales del cerebro y las células epiteliales de los plexos coroideos; así como el mecanismo de secreción de zinc desde estas células hasta el fluido extracelular del cerebro es desconocido.

vi. Funciones del zinc unido a proteínas

El zinc, como uno de los iones divalentes más abundantes en el cerebro, esta involucrado en una amplia gama de funciones fisiológicas, incluyendo el mantenimiento de las funciones de al menos 200 metaloenzimas que participan en numerosas reacciones bioquímicas, incluyendo el metabolismo de proteínas y ácidos nucleicos (Ebadi y Hama, 1986).

Las proteínas que enlazan zinc pueden ser divididas en dos grandes grupos: metaloenzimas y metalotioneínas.

Al parecer no existe una constante asociación entre la concentración de zinc y la actividad de una metaloenzima. Por ejemplo, el zinc esta presente en altas

concentraciones en el hipocampo (Frederickson y cols, 1983; Frederickson, 1989). Sin embargo, la actividad más alta de la anhidrasa carbónica, una metaloenzima, no se encuentra en el hipocampo, sino en la médula *oblongata* (Nair y Bau, 1971).

Las funciones del zinc en más de 200 metaloenzimas pueden ser divididas en cinco grandes categorías (Ebadi y Hama, 1986):

Papel catalítico: el zinc participa directamente en la catálisis de enzimas como la anhidrasa carbónica, carboxipeptidasa y aldolasa.

Papel estructural: el zinc participa en el mantenimiento de la estructura cuaternaria de holoenzimas oligoméricas tales como la aspartato transcarbamilasa.

Papel regulador (modulador): el zinc regula la actividad enzimática activando las enzimas (por ejemplo, leucina aminopeptidasa) o inhibiéndolas (por ejemplo, aminopeptidasa)

Papel no determinado: este metal está involucrado en una forma incierta con metaloenzimas como la alcohol deshidrogenasa o la alcalina fosfatasa.

Papel en el metabolismo de los ácidos nucleicos: el zinc, el cual está presente en el núcleo, nucleolo y cromosomas, es requerido para la síntesis de ácido ribonucleico (ARN), ácido desoxirribonucleico (ADN) y proteínas.

vii. Zinc y Superóxido Dismutasa

El oxígeno es una molécula potencialmente dañina, su toxicidad ha sido atribuida a la formación de H_2O_2 . Sin embargo, la facilidad con la que el oxígeno puede ser reducido al radical libre superóxido (O_2^-) y la existencia de la superóxido dismutasa (SOD) en los tejidos, ha sugerido que la toxicidad del oxígeno es debida a su conversión en superóxido.

La SOD representa aproximadamente el 1% de la proteína total en el cerebro, esta enzima convierte O_2^- en H_2O_2 , el cual es posteriormente metabolizado a agua y oxígeno por la catalasa y glutatión peroxidasa.

La función de la SOD es la de proteger contra los efectos potenciales del superóxido. Esta enzima se encuentra en los principales tejidos aerobios y en diferentes compartimientos de la célula. La forma citosólica, esta compuesta de dos subunidades similares que contienen cada una un equivalente de Cu^{2+} y Zn^{2+} ; en tanto que la enzima mitocondrial contiene Mn^{2+} (Siegel y cols, 1999).

Esta enzima antioxidante ha sido involucrada en enfermedades neurodegenerativas y principalmente se encuentra alterada en la enfermedad de Parkinson (Saggu y cols, 1989; Radunovic, 1997).

viii. Zinc y Metalotioneína

La metalotioneína (MT) es una proteína de bajo peso molecular (6-7 Kda) que enlaza zinc, contiene 61-68 residuos de aminoácidos de los cuales 25-30% son cisteína, no contiene aminoácidos aromáticos o enlaces disulfuro y enlaza 5-7 átomos de zinc por mol de proteína (Sato y Bremner, 1993; Ebadi y cols, 1996 a).

En mamíferos, la familia de la MT consiste de cuatro isoformas similares designadas MT I-MT IV. Las isoformas MT I y MT II se encuentran en el cerebro y en los tejidos periféricos (Itoh y cols, 1983); la MT III posee 7 aminoácidos adicionales y es expresada en el cerebro, seguida del intestino y páncreas (Uchida y cols, 1991; Palmiter y cols, 1992); por último, la isoforma MT IV se localiza en tejidos que contienen células epiteliales escamosas estratificadas (Quaife y cols, 1994).

Aunque la concentración de metales pesados es una de los principales determinantes de los niveles de MT en los tejidos, la inducción de la síntesis de MT también ocurre en respuesta de un amplio rango de factores físicos (rayos x, rayos UV,

restricción de comida, exposición a bajas temperaturas, etc.) y químicos, incluyendo un grupo de compuestos que producen radicales libres (Tabla 2) (Sato y Bremner, 1993).

Se ha propuesto que las isoformas de la MT participan en el transporte, acumulación y compartimentalización de zinc en varias regiones del cerebro, desintoxicación de metales pesados y protección contra especies reactivas del oxígeno (Sato y Bremner, 1993; Ebadi y cols, 1995; Ebadi y cols, 1996 a).

Tabla 2. Compuestos químicos que originan la inducción de síntesis de MT por estrés oxidativo.

AGENTES ALQUILANTES	DROGAS	SOLVENTES
Bromobenceno	Acetaminofen	Tetracloruro de Carbono
Diamida	Adriamicina	Cloroformo
Diethyl maleato	Bleomicina	Etanol
Iodoacetato	Cefaloridina	PROOXIDANTES
Iodometano	Cisplatina	t-BHP
CITOCINAS	Metronidazol	Dimetil sulfoxido
Interleucina I	Menadiona	OTROS
Interferón	HERBICIDAS	Ácido L-ascorbico
Factor de necrosis tumoral	Paraquat	Endotóxicas
Diquat	Metilindol	Estreptozotocina

(Tomado de Sato and Bremner, 1993).

La MT puede ser inducida en respuesta al estrés oxidativo y puede funcionar protegiendo a los tejidos del daño oxidativo (Sato y Bremner, 1993; Aschner y cols, 1997; Ebadi y cols, 1996). El tratamiento con dimetil sulfoxido origina una elevada peroxidación de lípidos y un incremento en los niveles de MT en hígado, sugiriendo así que la elevación en la tasa de peroxidación lipídica podría estar relacionada con la inducción de MT en el hígado (Hidalgo y cols, 1988).

La inducción de la síntesis de MT por procesos generadores de radicales libres ha llevado a la especulación que la MT puede estar involucrada en la protección contra el

estrés oxidativo actuando como un atrapador de radicales libres (para referencias ver Sato y Bremner, 1993).

Los mecanismos por los cuales la MT atrapa especies reactivas del oxígeno (por ejemplo, radicales superóxido e hidroxilo) aún no está clara, aunque existen fuertes evidencias que sugieren que los residuos de cisteína, particularmente los grupos tiolados de la MT, son el blanco primario para la reacción de la MT con las especies reactivas del oxígeno (Maret, 1994; Valle, 1995).

Dentro del sistema nervioso central, la comparación de autorradiografías ha revelado una selectiva expresión de MT-I en el caudado putamen, corteza, septum y lóbulos cerebelares (Hao y cols, 1994).

Al determinar la distribución de la MT-III en el cerebro por hibridación *in situ*, se encontró que el ARN mensajero (ARNm) de la MT-III es particularmente abundante dentro de la corteza cerebral, hipocampo, amígdala y el núcleo basal del cerebelo (Masters y cols, 1994); sugiriendo que existe una marcada correspondencia entre las neuronas que son ricas en ARNm de la MT-III y aquellas neuronas que almacenan zinc en sus vesículas sinápticas.

La MT-III puede ser un importante regulador de zinc en el sistema nervioso, y su ausencia se ha implicado en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer (Uchida y cols, 1991).

La inyección intracerebroventricular de 6-hidroxidopamina, una sustancia neurotóxica que destruye las neuronas dopaminérgicas y produce radicales libres (Hiramatsu y cols, 1994), reduce las concentraciones de zinc y MT en el caudado putamen y eleva dramáticamente los niveles de ARNm de la MT-I en hipocampo, núcleo arcuato, plexos coroideos y la capa granular del cerebelo (Rojas y cols, 1996).

Con todos estos estudios se ha demostrado que la MT puede tener un papel importante en la defensa contra reacciones oxidativas, especialmente en regiones del cerebro que poseen altas concentraciones de zinc.

ix. Neurotoxicidad del zinc

Existen grandes cantidades de zinc presentes en las vesículas sinápticas de los botones excitatorios y al parecer son liberadas durante la actividad sináptica. Además, las elevaciones transitorias de la concentración de zinc extracelular, pueden acompañarse de excitación neuronal intensa (Itoh y Ebadi, 1982).

La exposición de células corticales a concentraciones altas de zinc origina un extenso daño neuronal y glial, que es dependiente de la concentración y del tiempo de exposición (Choi y cols, 1988). Las inyecciones de cloruro de zinc en el hipocampo causan lesiones discretas caracterizadas por necrosis, disminución de la tinción del neurópilo, presencia de neuronas picnóticas y pérdida neuronal de las capas CA1, CA3 y de las células granulares del giro dentado (Lees y cols, 1990). Un estudio *in vivo* demostró que la infusión intranigral de altas dosis de zinc y hierro causa degeneración del sistema dopaminérgico nigroestriatal caracterizada por el incremento de la peroxidación lipídica y la disminución del contenido de dopamina (Lin, 2001)

Todos estos resultados proporcionan evidencia directa de que el zinc puede ser una neurotoxina y gliotoxina, relativamente potente y de rápida acción en el sistema nervioso central.

x. Neuroprotección y propiedades antioxidantes del zinc

En los últimos años se ha reconocido la propiedad del zinc para retardar procesos oxidativos. En general, los mecanismos de antioxidación pueden ser divididos en efectos crónicos y agudos. Los efectos crónicos involucran la exposición a largo plazo de un

organismo al zinc dando como resultado la inducción de alguna otra molécula que finalmente actúa como antioxidante, un ejemplo importante de este efecto es la MT. Por otra parte, los efectos antioxidantes agudos son manifestados generalmente con la presencia de un incremento a corto plazo de los niveles de zinc (Powell, 2000).

Se sabe que la exposición al zinc induce la síntesis de MT en diferentes órganos como el hígado (McCormick y cols, 1981), riñón (Swerdel y Cousins, 1982) y cerebro (Ebadi y cols, 1996).

Por el contrario, Oteiza y cols en 1995 comprobaron que la deficiencia de zinc origina un incremento en la producción de radicales libres y en el daño celular resultado de la exposición al estrés oxidativo. Además, la deficiencia de este metal origina un incremento en la tasa de peroxidación lipídica en el cerebro (Yousef y cols, 2002).

Básicamente, como parte de los efectos antioxidantes agudos se han descrito dos mecanismos en donde el zinc podría estar involucrado: estabilización del grupo sulfidrilo y reducción en la formación de radicales hidroxilo a partir de peróxido de hidrógeno y superóxido por medio del antagonismo de los metales redox de transición (cobre y hierro) activos. Las vías para la estabilización de los grupos sulfidrilo incluyen: (1) enlace directo del zinc al sulfidrilo; (2) enlace en algún otro sitio de la proteína muy cercano al grupo sulfidrilo, originando un obstáculo estérico; o (3) enlace a algún otro sitio de la proteína, provocando un cambio conformacional, y como resultado neto una reducción en la reactividad del grupo sulfidrilo (Powell, 2000).

xi. Enfermedades neurodegenerativas y su posible relación con el zinc

La etiología de la muerte neuronal en las enfermedades neurodegenerativas permanece en incógnita. Avances recientes en genética molecular y neuroquímica han contribuido al descubrimiento de dos procesos fundamentales involucrados en la muerte celular: el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial.

Algunos estudios han mostrado que las deficiencias de energía no solo están limitadas a los desórdenes en los cuales el suministro de sustratos está reducido (isquemia e hipoglucemia) (Sapolsky y Pulsinelli, 1985), sino también en pacientes con enfermedades crónicas de inicio tardío como Corea de Huntington, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Alzheimer (Lees, 1993).

Por otra parte, los radicales libres son formados durante los procesos oxidativos normales, pero la producción se estimula durante el desajuste en el funcionamiento de la cadena transportadora de electrones y por el incremento en los tejidos de las concentraciones de metales pesados libres. Los radicales libres y otras especies reactivas del oxígeno parecen estar íntimamente involucrados causando daño cerebral tanto agudo como crónico, originando mutagénesis y oxidación del ADN (Halliwell, 1992).

El sistema nervioso central comparado con otros tejidos, puede ser particularmente susceptible al daño oxidativo debido a su alta tasa de actividad metabólica oxidativa, alta concentración de ácidos grasos poliinsaturados, bajos niveles de catalasa, glutatión peroxidasa y posiblemente SOD; oxidaciones y autooxidaciones neuroquímicas y regiones con alto contenido de hierro y ascorbato (para referencias ver Lees, 1993).

Los mecanismos por los cuales la muerte neuronal ocurre pueden depender, al menos en parte, de cambios inducidos en el metabolismo energético, formación de radicales libres y/o excitotoxicidad.

Existe gran evidencia que indica que el metabolismo del zinc está alterado en trastornos como la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson, y un creciente número de reportes apuntan hacia anomalías en la recaptura y distribución de zinc.

En la enfermedad de Alzheimer existen alteraciones en los niveles extra e intracelular de zinc en varias regiones del cerebro (Cuajungco y Lees, 1997b; Danscher y

cols, 1997). Además el zinc, cobre y fierro se encuentran concentrados en las placas amiloides y la rápida agregación *in vitro* de la proteína β -amiloide esta mediada por el zinc (Huang y cols, 2000).

De acuerdo con Dexter y cols (1989), los estudios postmortem en cerebros humanos con enfermedad de Parkinson, revelan que los niveles de ácidos grasos poliinsaturados en la sustancia *nigra* están reducidos en comparación con otras regiones del cerebro y con cerebros normales, y por el contrario, los niveles de malondialdehído están elevados en esta región, sugiriendo la aparición de peroxidación lipídica.

El zinc, fierro y la actividad de la SOD citoplasmática y mitocondrial también se encuentran marcadamente elevados en la sustancia *nigra* de pacientes con enfermedad de Parkinson (Dexter y cols, 1987; Dexter y cols, 1991; Jenner y cols, 1992).

Por otra parte, en modelos experimentales se comprobó que la inyección intracerebroventricular (icv) de 6-hidroxidopamina, una droga que produce radicales libres (Kaakkola y Teravainen, 1990), reduce la concentración de zinc en la sustancia *nigra* y de MT en el caudado-putamen pero no tiene efecto en otras regiones del cerebro (Rojas y cols, 1996).

C. ENFERMEDAD DE PARKINSON

i. Generalidades y posibles factores de riesgo

La enfermedad de Parkinson (EP) es considerada uno de los mayores desórdenes neurológicos que afecta principalmente a la población senil, ya que cerca del 3% de la población que cuenta con 65 años o más presenta esta enfermedad (Olanov, 1996).

La EP es una enfermedad lenta y progresiva que se caracteriza por temblor de las extremidades durante el reposo (tremor), rigidez muscular, lentitud (bradicinesia) y dificultad para iniciar los movimientos (acinesia). Estos síntomas son atribuidos a la

pérdida de neuronas dopaminérgicas en la *pars compacta* de la sustancia *nigra* y por la presencia de inclusiones citoplasmáticas intraneuronales llamadas cuerpos de Lewy .

Las causas de la degeneración de las neuronas dopaminérgicas aun no son conocidas. Sin embargo, se asume que las interacciones entre toxinas externas (las cuales surgen de factores ambientales, dietéticos y de estilo de vida) y toxinas internas (del metabolismo normal) que ocurren continuamente, pueden ser determinantes en esta enfermedad (Prasad y cols, 1999).

Incluso, varios estudios epidemiológicos han sugerido como factores potenciales de riesgo para la EP a la vida rural, el consumo de agua de pozos o cisternas y la exposición a algunos herbicidas y pesticidas (por ejemplo dieldrin y ditiocarbamatos) (Golbe y cols, 1988; Seidler y cols, 1996).

Cualquier interacción adversa entre las toxinas y los componentes genéticos podría iniciar la degeneración en las neuronas dopaminérgicas. La naturaleza de esta reacción adversa no esta bien comprendida, y los factores de riesgo externos o internos no han sido completamente identificados excepto en dos casos.

En uno de ellos, la exposición de mineros a cantidades excesivas de manganeso incrementa la incidencia de parkinsonismo (Mena y cols, 1969). Esto se origina por causa de los elevados niveles cerebrales de manganeso libre que puede incrementar la producción de radicales libres, quienes pueden causar entonces daño a las neuronas dopaminérgicas.

En otro caso, se reportó una marcada incidencia de parkinsonismo entre los usuarios de una droga de producción ilícita, llamada meperidona, la cual contenía 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridino (MPTP), un biproducto neurotóxico formado durante la síntesis de ésta droga (Langston y cols, 1983). Al menos uno de los efectos tóxicos de la MPTP en las neuronas dopaminérgicas es mediado por radicales libres (Ballard y cols, 1985).

Las neuronas están expuestas constantemente a toxinas externas e internas en el cerebro. Uno de los mecanismos de acción más comunes de dichas toxinas esta mediado por estrés oxidativo debido a una producción excesiva de especies reactivas del oxígeno y especies reactivas del nitrógeno.

Estas especies pueden causar mutaciones puntuales y/o sobreexpresión de ciertos genes los cuales pueden iniciar la degeneración y eventualmente la muerte de las neuronas dopaminérgicas en la EP idiopática. Sin embargo, tales defectos genéticos aún no se han demostrado en la EP idiopática.

El polimorfismo en ciertos genes, como aquellos que codifican para el transportador de dopamina (Le Couteur y cols, 1997), alfa-1-antiquimotripsina (Yamamoto y cols, 1997), monoamino oxidasa B (Costa y cols, 1997) y citocromo P4501A1 (Takakubo y cols, 1996), ha sido asociado con un incremento en el riesgo de EP idiopática.

En un estudio reciente, Kitada y cols (1998) reportaron que las mutaciones en el gen PARKIN están asociadas con Parkinsonismo juvenil autosómico recesivo (PJAR). El producto proteínico normal de este gene podría estar relacionado con la familia de la ubiquitina; cuyas alteraciones han sido asociadas con muchos desórdenes neurodegenerativos incluyendo la enfermedad de Parkinson.

A pesar de que los factores de riesgo externos en la incidencia de la EP no han sido específicamente identificados, es muy cierto que los radicales libres, potencialmente dañinos, son constantemente formados extra e intracelular como parte del metabolismo normal en las neuronas dopaminérgicas.

Los sistemas de defensas antioxidantes representados por enzimas antioxidantes, antioxidantes sintetizados y antioxidantes de la dieta pueden atacar a los radicales libres; sin embargo, si estos radicales son producidos en exceso o los niveles de antioxidantes están reducidos, puede ocurrir daño neuronal.

De esta forma, un balance apropiado entre los niveles de radicales libres y antioxidantes es esencial para la viabilidad de las neuronas. Cualquier inclinación en favor de los radicales libres podría iniciar la degeneración por alteraciones en las neuronas dopaminérgicas (figura 2).

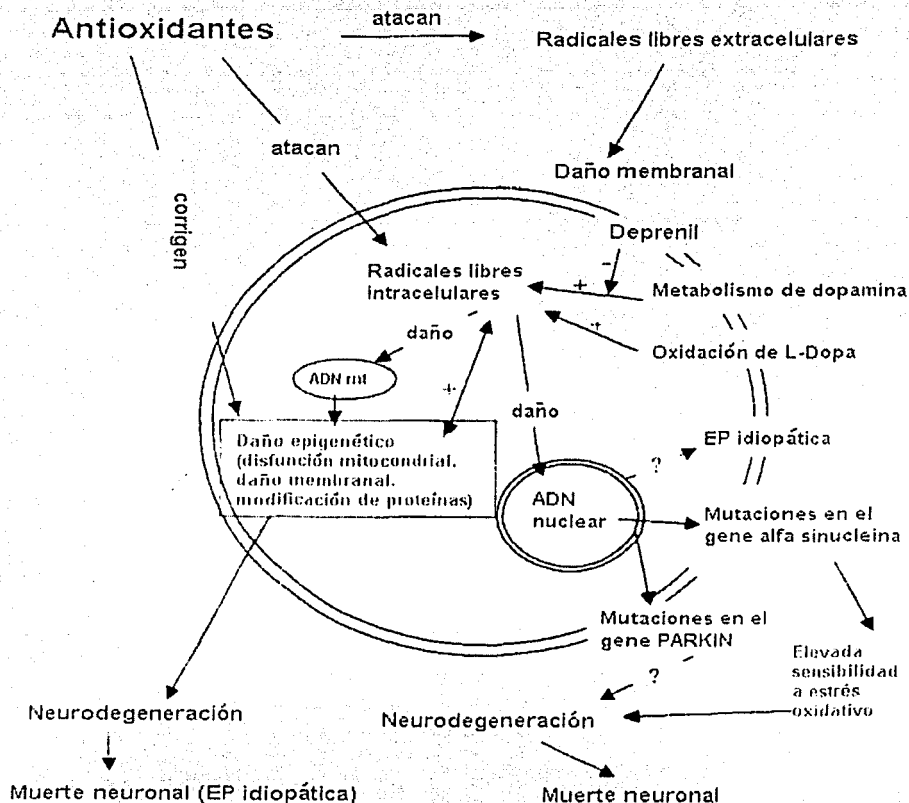


Figura 2. Vista esquemática de la participación de los radicales libres como un factor común de riesgo para muchos eventos neurotóxicos en la patogénesis de la enfermedad de Parkinson (Tomado de Prasad, 1999).

Se han propuesto varias hipótesis para explicar el mecanismo de degeneración neuronal en la EP.

Estas incluyen: (a) producción de elevados niveles de radicales libres durante el metabolismo oxidativo de la dopamina. Varias características bioquímicas del sistema dopaminérgico incrementan el riesgo de daño oxidativo. La monoamino oxidasa (MAO) cataboliza la dopamina intraneuronal originando peróxido de hidrógeno (Coyle y Puttfarcken, 1993).

(b) Disfunción mitocondrial, la cual puede causar migración de los radicales libres de la mitocondria hacia el citoplasma y el núcleo. La producción de radicales superóxido y peróxido de hidrógeno se incrementa por la disminución en la eficiencia de la cadena transportadora de electrones (Bowling y Beal, 1995; Mann y cols, 1992).

(c) Elevada acumulación de hierro libre (Dexter y cols, 1987). El hierro está implicado en muchas funciones celulares; y como parte del complejo citocromo, está involucrado en la respiración mitocondrial. Sin embargo, este metal facilita la formación de especies reactivas del oxígeno (Coyle y Puttfarcken, 1993).

(d) Niveles reducidos de nutrientes antioxidantes (ácido ascórbico, vitamina E) y enzimas antioxidantes (catalasa y glutatión peroxidasa) (Riederer y cols, 1989; Perry y cols, 1982; Sofic y cols, 1992).

Todos estos estudios revelan que el estrés oxidativo puede jugar un papel crítico en la degeneración de las neuronas dopaminérgicas en la EP.

ii. Tratamientos de la Enfermedad de Parkinson

Uno de los tratamientos de la EP avanzada incluye a la L-dihidroxi-fenilalanina (L-dopa), un precursor de la síntesis de dopamina. La administración de L-dopa puede elevar la generación de radicales libres (Ogawa y cols, 1994), aunque esto no ha sido demostrado en pacientes con la EP.

Los efectos colaterales, que han sido observados después de cinco años de terapia con L-dopa, pueden ser debidos a un incremento en la producción de radicales libres durante el metabolismo oxidativo de L-dopa y dopamina (Sax y Tarsy, 1971). Es posible que el uso de múltiples antioxidantes en combinación con L-dopa pueda reducir ciertos efectos secundarios de la terapia.

El deprenil y el α -tocoferol fueron los primeros dos componentes, que se evaluaron clínicamente como candidatos potenciales para el tratamiento neuroprotector contra la EP.

El deprenil, un inhibidor de la MAO-B, aparece en algunos estudios como un agente neuroprotector reduciendo la producción de radicales libres (Mytilineou y cols, 1997). Por si solo, el deprenil no previene la progresión de la EP; sin embargo, cuando se usa en combinación con L-dopa, los niveles de dopamina en las neuronas dopaminérgicas se elevan (Ogawa y cols, 1994).

El deprenil usado conjuntamente con L-dopa podría reducir los niveles elevados de radicales libres que surgen de la oxidación de dopamina, pero no aquellos que se originan de la oxidación de L-dopa.

El tratamiento con α -tocoferol puede ejercer algunos efectos neuroprotectores, probablemente atrapando radicales libres y de esta forma inhibiendo los procesos citotóxicos como la peroxidación lipídica. Sin embargo, hasta la fecha no se han demostrado beneficios clínicos después de la ingestión oral (Parkinson Study Group, 1993).

iii. Procesos que generan estrés oxidativo en el cerebro

El cerebro consume una gran cantidad de O_2 , y deriva su energía casi exclusivamente del metabolismo oxidativo de la cadena respiratoria. La mitocondria se encuentra en los cuerpos neuronales pero también se distribuye a través de las dendritas,

axones y botones sinápticos, donde las ATPasas mantienen los gradientes iónicos a través de la membrana neuronal (para referencias ver Coyle y Puttfarcken, 1993).

La migración de electrones de alta energía a lo largo de la cadena transportadora en la mitocondria genera la formación de radicales superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Recientes evidencias han mostrado que las mutaciones y pérdidas hereditarias del ADN mitocondrial están asociadas con síndromes caracterizados por degeneración, lo que podría indicar que las mutaciones adquiridas con la edad pueden interrumpir la eficiencia del transporte de electrones y aumentar el estrés oxidativo (Schapira y Cooper, 1992).

Varias enzimas presentes en el cerebro, incluyendo la MAO, tirosina hidroxilasa y L-amino oxidasa producen H_2O_2 como un biproducto normal de su actividad. La auto-oxidación de sustancias endógenas, como por ejemplo, el ácido ascórbico y las catecolaminas, las cuales están concentradas diferencialmente en ciertos sistemas neuronales, generan H_2O_2 (Chan y Fishman, 1980).

El estrés oxidativo también puede ser generado por la activación, mediada por el Ca^{2+} , de receptores de glutamato (Chan y Fishman, 1980).

La formación de óxido nítrico (ON) es catalizada por la ON sintetasa. Esta enzima es activada por el Ca^{2+} y regulada por receptores de neurotransmisores. El ON puede reaccionar rápidamente con el O_2^- para producir el anión peroxinitrito, el cual se descompone hasta el radical hidroxilo (OH) (Beckman y cols, 1990).

El radical hidroxilo no es generado directamente por alguna reacción enzimática conocida. Sin embargo, el H_2O_2 lentamente se descompone a OH, en un proceso que es acelerado por la presencia de Fe^{2+} mediante la reacción de Fenton (para referencias ver Facchinetti y cols, 1998).

iv. Modelos experimentales de la Enfermedad de Parkinson

Con el fin de conocer a fondo los mecanismos celulares y bioquímicos que ocurren en la EP idiopática, se han desarrollado varios modelos experimentales, que se asemejan a la EP idiopática en la destrucción de las neuronas de la vía nigroestriatal.

Se han utilizado lesiones estereotáxicas en la vía nigroestriatal que causan daño a las terminales dopaminérgicas, además de rigidez e hipocinesia (Zigmond y Stricker, 1984) y una gran variedad de fármacos entre ellos agonistas colinérgicos que inducen temblor (Duvoisin, 1976).

La reserpina es una droga que altera el almacenamiento de dopamina, noradrenalina y serotonina conduciendo principalmente a una disminución en los niveles de dopamina (Hornykiewicz, 1966). Otra neurotoxina que genera radicales libres y es tóxica a las neuronas dopaminérgicas es la 6-hidroxidopamina (Kaakkola y Teravainen, 1990), cuya administración en la sustancia *nigra* de roedores origina hipocinesia, adipsia y afagia (Ungerstedt, 1971).

La 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidopiridina (MPTP) origina déficits motores en humanos y otros primates que están asociados con una pérdida relativamente selectiva de células en la pars compacta de la sustancia *nigra* además de notables reducciones en las concentración de dopamina, noradrenalina y serotonina en el cuerpo estriado (Gerlach y cols, 1991).

De todos los modelos mencionados anteriormente, el más usado y que más se asemeja con las alteraciones encontradas en la EP idiopática es la administración de la MPTP.

D. LA ADMINISTRACIÓN DE LA MPTP COMO UN MODELO EXPERIMENTAL DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

i. Parkinsonismo inducido por la administración de la MPTP

Los primeros estudios que mencionan la aparición de síndromes parkinsonianos en pacientes jóvenes en la bahía de San Francisco, se remontan a 1979 (Davis y cols, 1979). Estos trabajos reportan que la MPTP, una impureza formada durante la producción ilícita de una droga llamada nueva heroína, tiene la propiedad de producir efectos estrechamente parecidos a los síntomas que se presentan en la EP idiopática.

La MPTP es una droga que produce una destrucción selectiva de las neuronas dopaminérgicas en la pars compacta de la sustancia *nigra* cuando se administra a humanos (Davis y cols, 1979; Langston y cols, 1983), monos (Burns y cols, 1983; Langston y cols, 1984) y roedores (Schneider y Denaro, 1988).

La MPTP aplicada en animales es uno de los modelos más usados en la actualidad por su gran semejanza con la EP idiopática.

Una de las dos principales hipótesis sobre la causa de la destrucción en las neuronas dopaminérgicas por la MPTP, sugiere que el daño puede resultar de la generación intraneuronal de superóxidos y otros radicales libres citotóxicos (Gerlach y cols, 1991).

ii. Bioactivación y metabolismo de la MPTP

La figura 3 muestra los pasos del metabolismo de la MPTP (Sayre, 1989; Tipton y Singer, 1993; Przedborski y cols, 2000).

Este compuesto es altamente lipofílico y puede rápidamente atravesar la barrera hematoencefálica. Después de tan solo un minuto de la inyección de la MPTP, se han detectado niveles considerables de esta neurotoxina en el cerebro (Makey y cols, 1984).

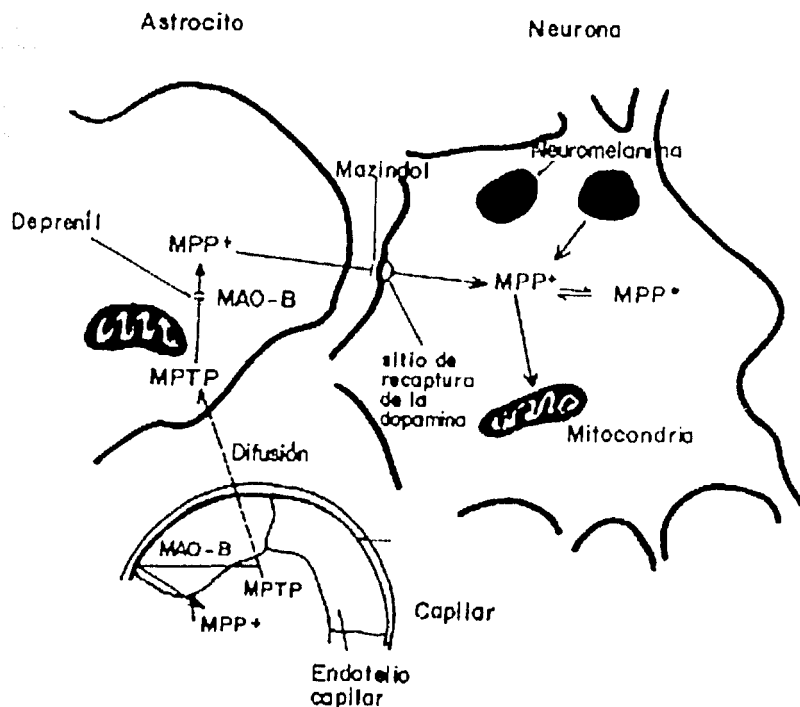


Figura 3. Bioactivación y metabolismo de la MPTP (Tomado de Kopin, 1986).

Una vez localizada en el cerebro, la MPTP es entonces metabolizada al 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridino (MPDP⁺) por la enzima MAO-B en la mitocondria de las células astrogiales (Javitch y Snyder, 1984) o en las neuronas serotoninérgicas (Nakamura y Vincent, 1986). Después de este paso, la MPDP⁺ es oxidada al metabolito activo de la MPTP, el 1-metil-4-fenilpiridino (MPP⁺) (figura 4). De esta forma, el MPP⁺ es liberado hacia el espacio extracelular, donde es tomado por los transportadores de dopamina y se concentra dentro de las neuronas dopaminérgicas donde ejerce sus efectos tóxicos (Sayre, 1989; Tipton y Singer, 1993).

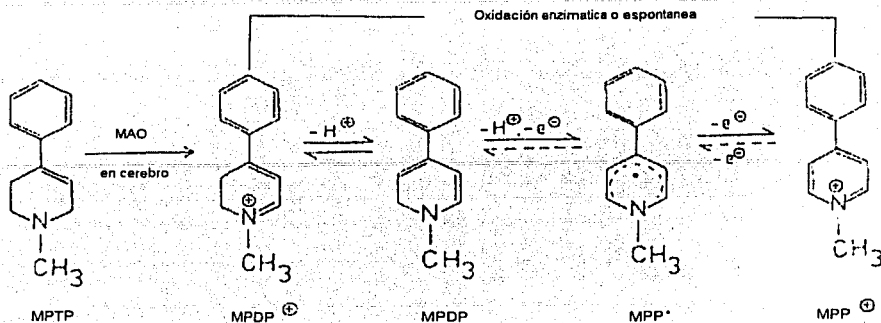


Figura 4. Activación tóxica de la MPTP (Tomado de Sayre, 1989).

iii. Evidencias del MPP⁺ como metabolito tóxico

Aunque el papel de los metabolitos en el desarrollo de la neurotoxicidad de la MPTP aún no ha sido probado, existen evidencias que apuntan hacia el MPP⁺ como el responsable de los efectos tóxicos:

- a) La inyección intraestriatal e intranigral de MPP⁺ en ratas es tóxica para las neuronas dopaminérgicas (Schneider y Denaro, 1988).
- b) El MPP⁺ es una potente toxina que afecta a las neuronas dopaminérgicas en cultivo y hepatocitos aislados (Sánchez y cols, 1986).
- c) El pretratamiento con inhibidores del sistema de recaptura de dopamina (por ejemplo mazindol) previene la entrada del MPP⁺ en las neuronas dopaminérgicas y por lo tanto bloquea la toxicidad dopaminérgica (Heikkila y cols, 1985).
- d) El MPP⁺ inhibe las principales enzimas involucradas en la biosíntesis de dopamina (Ozaki y cols, 1988).
- e) El MPP⁺ induce la formación de radicales libres, a partir de la oxidación de la dopamina dentro del citoplasma para después desplazarse desde los sitios de

almacenamiento vesicular. Así, junto con el desajuste energético, el estrés oxidativo dependiente de la dopamina es un importante contribuyente en la toxicidad del MPP⁺ (Chang y Ramírez, 1986; Lotharius y O'Malley, 2000).

f) El pretratamiento con inhibidores de la MAO-B, como el deprenil, previene la biotransformación de la MPTP a MPP⁺ y bloquea la toxicidad dopaminérgica (Makey y cols, 1984).

g) El contenido estriatal de MPP⁺ correlaciona linealmente con los efectos tóxicos dopaminérgicos en ratones (Giovanni y cols, 1991).

iv. Mecanismos de neurotoxicidad

Una de las dos principales hipótesis de la destrucción de las neuronas dopaminérgicas por el MPP⁺ propone como responsables a los radicales hidroxilo y superóxido, generados durante la reducción y reoxidación de la neurotoxina.

a) Se ha propuesto que la sobreproducción de especies reactivas del oxígeno es un importante mecanismo que contribuye a la citotoxicidad del MPP⁺ (Przedborski y cols, 1996). Algunos estudios han mostrado que algunas dosis de MPP⁺, capaz de dañar hasta el 70% de neuronas dopaminérgicas en cultivo, producen un incremento en los radicales superóxido e hidroxilo (Chacon y cols, 1987; Kopin, 1986; Lotharius y cols, 1999).

Numerosos estudios *in vivo* e *in vitro* han observado que el MPP⁺ induce una salida rápida y masiva de dopamina que subsecuentemente puede ser oxidada (Chang y Ramírez, 1986; Sirinathsinghi y cols, 1988).

A causa de que la dopamina redistribuida puede ser fácilmente autooxidada y producir una gran variedad de especies reactivas del oxígeno, incluyendo radicales superóxido, Lotharius y O'Malley (2000) propusieron que la producción de radicales superóxido inducida por el MPP⁺ surge del metabolismo de la dopamina.

Por otro lado, el tratamiento con MPP⁺ produce un incremento significativo de los radicales superóxido que puede ser completamente bloqueado por el atrapador de radicales libres carboxifulereno isómero C₃ (Lotharius y O'Malley, 2000).

La generación de radicales libres durante el metabolismo de la MPTP ha sido propuesta para explicar su neurotoxicidad (Lewin, 1984). Se ha reportado que la MAO B cataliza la oxidación de la MPTP generando peróxido de hidrógeno (H₂O₂) durante la incubación de MPTP y MAO B. Con estos estudios se demostró, que la oxidación de la MPTP catalizada por la MAO B puede causar reducción divalente del oxígeno para formar H₂O₂ (Sandri y cols, 1990).

Ya que el O₂ no puede aceptar dos electrones simultáneamente (por la restricción del spin) para formar H₂O₂, la generación de esta especie puede ser secundaria a la producción de radicales superóxido.

Zang y Misra (1993) proporcionaron gran evidencia sobre la producción de especies reactivas del oxígeno (O₂[•], H₂O₂ y OH[•]) durante la oxidación de la MPTP catalizada por la MAO B. Parece probable que la toxicidad nigroestriatal del MPTP, que origina un síndrome parkinsonico, en parte pueda ser mediada a través de las especies reactivas del oxígeno.

b) El MPP⁺ es acumulado selectivamente en las células dopaminérgicas por medio de los transportadores de dopamina y causa la muerte de las neuronas dopaminérgicas (Gerlach y cols, 1991). El MPP⁺, como la rotenona, es un inhibidor de la NADH-ubiquinona oxidoreductasa (complejo I) en la cadena respiratoria mitocondrial (Ramsay y cols, 1987). La inhibición del complejo I (figura 5) no solo lleva a la pérdida en la producción de ATP mitocondrial, sino también causa la generación de radicales superóxido e induce peroxidación de lípidos (Rojas y Ríos, 1993).

Las especies reactivas del oxígeno y la pérdida de ATP están implicadas en la muerte celular inducida por el MPP⁺.

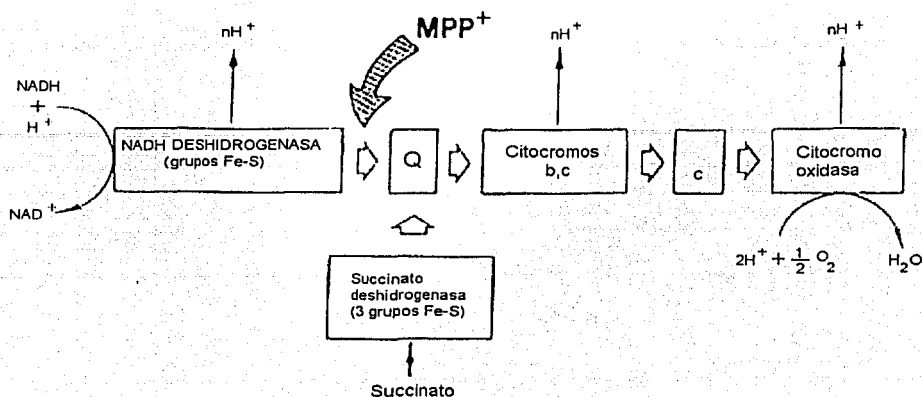


Figura 5. Sitio de reacción del MPP⁺ en la cadena respiratoria mitocondrial (Tomado de Singer y Ramsay, 1990).

De acuerdo con esta afirmación, ratones transgénicos que sobreexpresan la SOD cobre-zinc (Przedborski y cols, 1992) y los ratones mutantes que carecen de la óxido nítrico sintetasa neuronal (Przedborski y cols, 1996) son resistentes a la neurotoxicidad dopaminérgica inducida por la MPTP. Así, el MPP⁺ funciona como un agente que origina estrés oxidativo en la mitocondria *in vivo*.

El mantenimiento de la integridad del ADN mitocondrial es esencial para el correcto funcionamiento de la cadena respiratoria en la mitocondria. Sin embargo, Miyako y cols en 1997 demostraron que el MPP⁺ disminuye hasta una tercera parte el contenido de ADN mitocondrial, inhibiendo selectivamente la replicación del material genético de ese organelo (Miyako y cols, 1999).

El desajuste energético predispone a las neuronas a la excitotoxicidad, por lo que la mitocondria representa un blanco para los mecanismos excitotóxicos. De esta forma, el daño mitocondrial puede agravar el daño inicial liberando Ca²⁺, especies reactivas del

oxígeno y factores esenciales para la activación de la proteasa apoptótica (Leist y Nicotera, 1997).

c) Otra hipótesis de toxicidad involucra al calcio intracelular. Los antagonistas del NMDA, que inhiben el flujo excesivo de Ca^{2+} a través de sus canales, protegen a la sustancia *nigra* de la neurotoxicidad del MPP⁺ (Turski y cols, 1991). En otro estudio, Kaas y cols (1988) relacionaron el calcio con la MPTP, demostrando que la MPTP incrementa la concentración de Ca^{2+} en hepatocitos, provocando un colapso del gradiente transmembranal del Ca^{2+} .

d) La mejor característica que distingue a las neuronas dopaminérgicas de la sustancia *nigra* es la presencia de un polímero color negro llamado neuromelanina. Los complejos de melanina contienen radicales libres y quinonas reactivas redox; además, se ha observado que la neuromelanina se incrementa junto con la edad (Graham, 1978).

Snyder y D'Amato (1986) demostraron que la neuromelanina posee una alta afinidad por el MPP⁺ y esto podría explicar la selectiva susceptibilidad de la sustancia *nigra* a los efectos tóxicos de la MPTP.

Estos descubrimientos podrían sugerir la participación de este polímero en estados neurodegenerativos relacionados con la edad.

III. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años, se ha apoyado la hipótesis de que el zinc puede actuar como un antioxidante evitando los procesos oxidativos por sí mismo, mediante la estabilización de los grupos sulfidrilo o por medio de la inducción de alguna otra molécula antioxidante. Por otro lado, la administración de MPP⁺ es un modelo experimental de la enfermedad de Parkinson, que causa daño a la vía dopaminérgica nigroestriatal a través de la sobreproducción de especies reactivas del oxígeno y la inhibición del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial.

La enfermedad de Parkinson afecta a un gran porcentaje de la población; sin embargo, hasta la fecha no existen estudios que demuestren los efectos de esta enfermedad y de los modelos experimentales sobre los antioxidantes más importantes presentes en el cerebro.

IV. HIPÓTESIS

Si se sabe que un posible mecanismo de neurotoxicidad del MPP⁺ es el estrés oxidativo, en el cual se generan especies reactivas del oxígeno; y por otra parte se ha establecido que el zinc es un antioxidante y por sí mismo puede reducir el daño oxidativo enlazándose a los grupos sulfidrilo o induciendo la síntesis de otras moléculas antioxidantes, entonces podríamos esperar alteraciones en la distribución y metabolismo del zinc después de la administración del MPP⁺.

V. OBJETIVOS

i. Objetivo General

Evaluar las alteraciones del zinc en diferentes regiones del cerebro y de dopamina en el cuerpo estriado de ratón después de la administración de MPP⁺.

ii. Objetivos Específicos

Cuantificar la densidad óptica del zinc, en cortes histológicos de varias regiones del cerebro, teñidos con la tinción de Timm y mediante un sistema de imágenes por computadora.

Cuantificar el contenido de dopamina en el cuerpo estriado a diferentes tiempos después de la administración de MPP⁺, por cromatografía de líquidos de alta resolución con detección electroquímica.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

i. Animales

Se utilizaron 40 ratones macho de la cepa C57 black (25-30 g de peso), los cuales se mantuvieron en cajas con una cama de aserrín, con una temperatura entre 21-22°C y con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas. Los ratones se alimentaron con Purina Chow y se les proporcionó agua *ad libitum*.

ii. Reactivos y drogas

El yoduro de MPP⁺ fue adquirido de Research Biochemicals Incorporated (Wayland, MA). Los demás reactivos (goma arábica, ácido cítrico, citrato de sodio, hidroquinona y lactato de plata) se obtuvieron de Sigma (México).

iii. Administración de MPP⁺ y preparación del tejido

Los animales se dividieron al azar en 8 grupos (n=5 cada uno), 4 grupos experimentales y 4 grupos control. Cada grupo experimental se sacrificó con su respectivo grupo control a las 1, 2, 24 horas y 7 días después de la inyección icv.

Una dosis de MPP⁺ (18 µg/3 µl) fue inyectada por vía icv a los ratones del grupo experimental. El grupo control fue tratado con solución salina al 0.9%.

Los ratones de ambos grupos fueron anestesiados por exposición a éter y se perfundieron por vía intracardiaca a tiempos variables (1, 2, 24 hrs y 7 días), después de la administración de MPP⁺ o solución salina.

La perfusión se realizó con solución de sulfuro de sodio (0.1 M de Na₂S en 0.2 M de NaH₂PO₄) seguido de una solución de glutaraldehído en buffer de fosfatos 0.15 M y pH 7.4.

Después de la perfusión, los cerebros fueron extraídos e inmediatamente se colocaron en solución fijadora de paraformaldehído (1.0%), glutaraldehído (1.25%) y sacarosa al 30%. El tejido se mantuvo en el refrigerador durante 72 horas o hasta que el cerebro alcanzara el fondo del frasco.

Se realizaron cortes horizontales y coronales de 20 μm de grosor en un micrótomos por congelación de CO_2 , y después se montaron en laminillas cubiertas con una solución preparada con polvo de gelatina al 0.5%.

iv. Histoquímica

La detección del zinc se elaboró con el método histoquímico de Timm descrito por Danscher (1981), utilizando goma arábica como coloide protector, buffer de citratos, hidroquinona como agente reductor y un aporte de iones de plata.

La tinción se elaboró en un cuarto oscuro durante 60 minutos. La reacción se detuvo con agua corriente, los cortes fueron contrateñidos con violeta de cresilo, posteriormente se deshidrataron con una serie de alcoholes graduados y finalmente se aclararon con xilol.

Para minimizar la variabilidad en la tinción de Timm, los cortes de ambos grupos fueron procesados simultáneamente.

v. Densitometría

El análisis densitométrico de la tinción de Timm se realizó automáticamente utilizando un sistema de imágenes por computadora (Metamorph Imaging System) acoplado a un microscopio de luz (Nikon Eclipse E600) por medio de una cámara de alta resolución con un mecanismo de carga acoplada (Sony CCD-Iris). La señal de la video cámara fue digitalizada utilizando un convertidor de flash de 8 bits con una resolución de

512 por 480 píxeles proporcionando valores en la escala de grises entre 0 (negro) y 255 (blanco).

El corte bajo observación fue ajustado en el microscopio hasta que la región de interés fue claramente visible en el monitor de la computadora. Esta imagen se digitalizó y se almacenó en la memoria. Todas las siguientes evaluaciones fueron hechas sin correcciones en la imagen.

Para cada grupo y tiempo se cuantificó la densidad óptica del cuerpo estriado, epitelio ventricular, plexos coroideos, capa granular del cerebelo, núcleo arcuato, capas oriens, piramidal, radiata y molecular de los campos CA1, CA2 y CA3 del hipocampo, incluyendo la capa granular del giro dentado.

La cantidad de tinción de Timm en cada región del cerebro fue examinada a un aumento de 10X y en todas las regiones se determinó que no había variación visible de la tinción entre todos los cortes obtenidos. De esta manera, la densidad óptica en cada región fue medida colocando 50 círculos con un diámetro de 40 μm cada uno, a lo largo de 10 cortes seleccionados al azar por región en cada animal.

Finalmente, las medidas de densidad óptica para cada área en todas las regiones fueron proporcionadas en unidades arbitrarias automáticamente por el sistema de imágenes.

vi. Análisis del contenido de dopamina estriatal

Otro lote de animales también se dividió al azar en 6 grupos ($n=6$ cada uno), 3 grupos experimentales y 3 grupos control.

Los grupos experimentales y controles se administraron como se describió previamente en el inciso iii. Cada grupo experimental se sacrificó con su respectivo grupo control a las 2, 24 horas y 7 días después de la inyección icv.

El cerebro se extrajo rápidamente y se homogenizó en 500 μ l de solución antioxidante (metabisulfito de sodio 0.5 mM y ácido perclórico 0.1 % p/v). Utilizando un sonicador Lab-line ultratip labsonic system (Lab-line instruments, Melrose Park, IL). Las muestras se centrifugaron a 4000 g durante 15 minutos en una centrifuga Beckman J-21C a 4° C, el sobrenadante se filtro en Millipore 0.22 μ m antes de la inyección en el cromatógrafo. Para determinar el contenido de dopamina se empleo el cromatógrafo de líquidos LC 250 Perkin Elmer con una asa de 20 μ l y detector electroquimico Metrohm 656. los picos se integraron automáticamente en el integrador Hewlett-Packard 3396-II. La curva de calibración se construyó y las concentraciones se obtuvieron mediante interpolación en la curva estándar.

La fase móvil utilizada contenía una solución amortiguadora de fosfatos 0.1 mM con un pH de 3.1, octil sulfato de sodio 0.2 mM, EDTA 0.1 mM y metanol al 15 % v/v. El potencial del detector fue ajustado a 0.8 V contra Ag/AgCl electrodo de referencia.

Se utilizó una columna para analizar catecolaminas de 100 x 4.8 mm con un diámetro de partícula de 3 μ m (Alltech, Deerfield, IL). El flujo utilizado fue de 1.2 ml/min. los resultados se expresaron como μ g de catecolamina/g de tejido húmedo.

vii. Análisis estadístico

Los valores de densitometría fueron analizados para determinar su significancia estadística comparando los grupos control de cada tiempo con su respectivo grupo experimental utilizando una prueba *t* de Student con un nivel de significancia de ***p* < 0.01 y **p* < 0.05.

Para analizar el contenido de dopamina estriatal se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) de una vía y posteriormente los datos se evaluaron con una prueba *post hoc* de Tukey.

VII. RESULTADOS

Todas las medias y los errores estándar obtenidos en las diferentes regiones del cerebro se muestran en la tabla 1.

i. Cuerpo estriado

Como se observa en la figura 1, la densidad óptica del zinc en el cuerpo estriado disminuye significativamente en todos los tiempos después de la administración del MPP⁺ ($p < 0.01$ a las 1, 2 y 24 horas) ($p < 0.05$ a los 7 días).

Después de 1 hora de la aplicación de MPP⁺ se observa una disminución del 18% en la densidad óptica de la tinción. La máxima disminución (24%) se encontró a las 2 horas seguida de un 14% y 10% a las 24 horas y 7 días respectivamente.

La figura 4 (a y b) muestra una fotografía, con un aumento de 10X, del cuerpo estriado a las 2 horas, en donde se puede apreciar la disminución en la intensidad de la tinción.

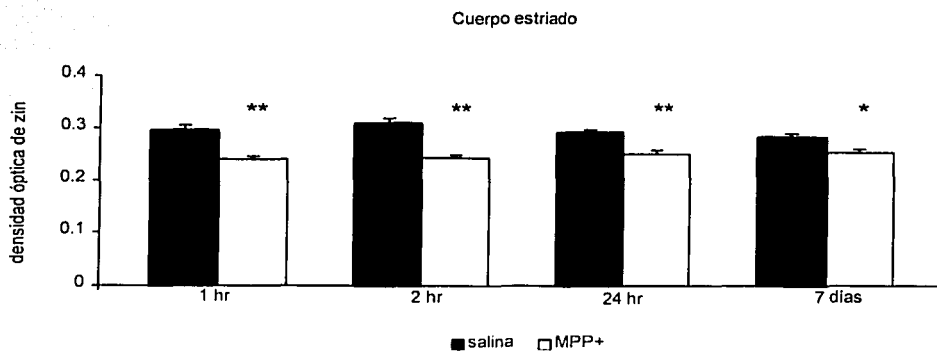


Figura 1. La densidad óptica (media $\pm$ error estándar) del zinc en el cuerpo estriado, disminuye significativamente en todos los tiempos analizados después de la administración icv de MPP⁺. Las medias fueron comparadas estadísticamente usando una prueba *t* de Student. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

ii. Ventriculos laterales

El análisis densitométrico en el epitelio de los ventriculos laterales nos indica una disminución significativa ($p < 0.01$) de la densidad óptica en todos los tiempos probados (figura 2), mostrando la disminución más drástica (44%) después de dos horas de la administración por vía icv de MPP⁺. Los tiempos 1, 24 horas y 7 días también muestran una disminución del 21%, 29% y 15% respectivamente.

De todas las regiones evaluadas, la disminución mas grande se encontró en el epitelio ventricular en el grupo de 2 horas y esto se puede observar en la figura 4 (b y c).

Por el contrario, el zinc histoquímicamente reactivo de los plexos coroideos no se observa afectado a las 1, 2 horas y 7 días de la administración del MPP⁺; sin embargo, a las 24 horas de la administración, la densidad óptica se reduce ($p < 0.05$) el 11% (figura 3).

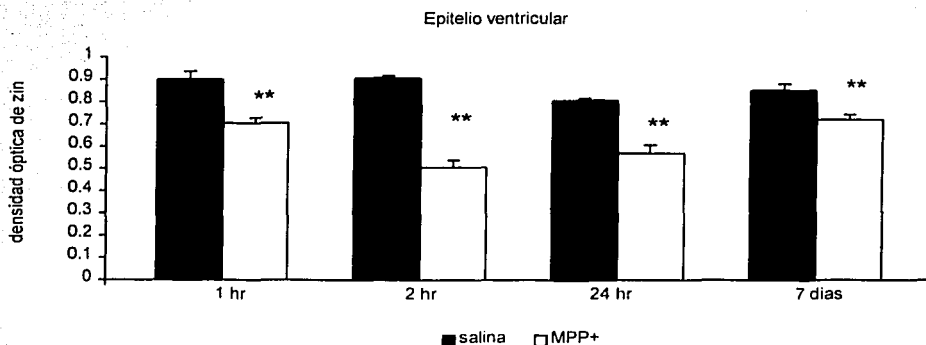


Figura 2. Densidad óptica (media $\pm$ error estándar) del zinc en el epitelio ventricular de ratones de la cepa C57 black después de la administración icv de MPP⁺. Todos los tiempos probados muestran reducción de la densidad, incluso a las 2 hrs dicha disminución alcanza el 44%. Las medias fueron comparadas estadísticamente usando una prueba *t* de Student, ** $p < 0.01$.

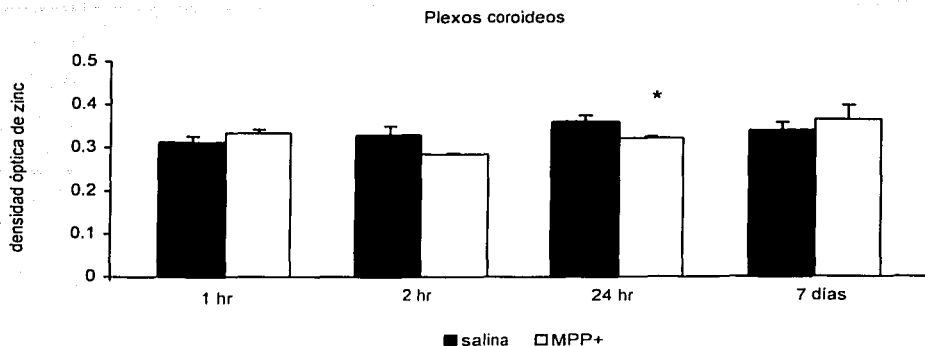


Figura 3. Densidad óptica (media $\pm$ error estándar) del zinc en los plexos coroideos de los ventrículos laterales de ratones de la cepa C57 black después de la administración icv de MPP⁺. El zinc histoquímicamente reactivo, solo se reduce a las 24 hrs. Las medias fueron comparadas estadísticamente usando una prueba *t* de Student, * $p < 0.05$.

iii. Cerebelo

La administración icv de MPP⁺ no afecta la intensidad de la tinción de Timm en la capa de células granulares del cerebelo (figura, 5).

iv. Núcleo arcuato

En este núcleo, la densidad óptica solo se observa disminuida el 9%, tan solo 1 hora ($p < 0.05$) después de la administración de esta neurotóxina (figura 6).

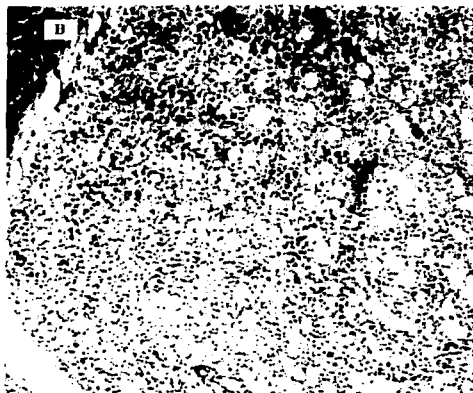
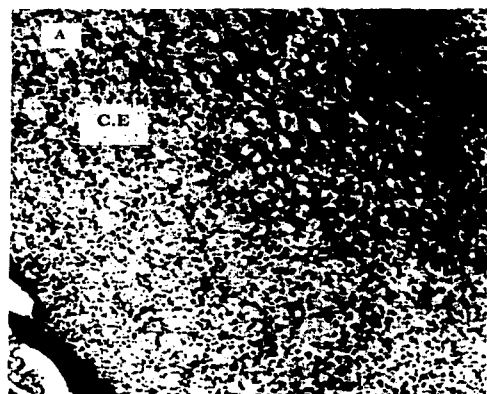


Figura 4. Fotografías de cortes coronales, teñidos con el método de Timm, del cuerpo estriado y de los ventrículos laterales de ratones control (A,C) y tratados con MPP⁺ (B,D). En las secciones de ratones tratados con MPP⁺ se observa una disminución significativa en la intensidad de la tinción de Timm, lo que nos indica una pérdida de zinc histoquímicamente reactivo; C.E. cuerpo estriado, P.C. plexos coroides, E.V. epitelio ventricular.

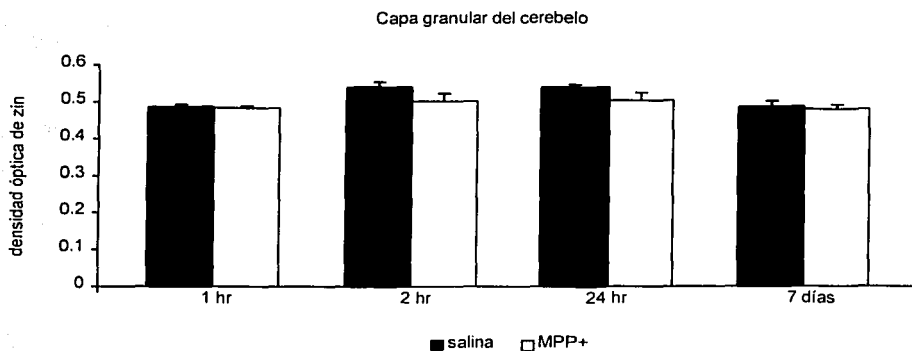


Figura 5. Densidad óptica (media $\pm$ error estándar) del zinc en las células granulares del cerebelo de ratones de la cepa C57 black después de la administración icv de MPP⁺. La neurotoxina no afecta la tinción de Timm en esta capa celular. Las medias fueron comparadas estadísticamente usando una prueba *t* de Student. No existen diferencias en los grupos experimentales con respecto al control.

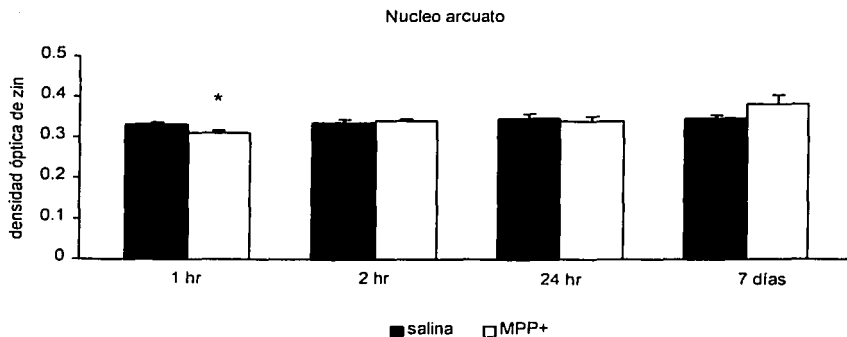


Figura 6. La densidad óptica (media $\pm$ error estándar) del zinc en el núcleo arcuato de ratones de la cepa C57 black únicamente se afecta 1 hr después de la administración icv de MPP⁺. Las medias fueron comparadas estadísticamente usando una prueba *t* de Student, * $p < 0.05$.

v. Hipocampo

Los valores densitométricos de la tinción de Timm en el hipocampo nos muestran una serie de alteraciones a lo largo de las cuatro capas (oriens, piramidal, radiata y molecular) en las tres grandes regiones que lo constituyen (CA1, CA2 y CA3).

En el campo CA1, se observa que el MPP⁺ eleva la densidad óptica en la capa oriens 22% en 1 hora ($p<0.05$), 50% a las 24 horas ($p<0.01$) y 41% a los 7 días ($p<0.05$).

En la capa radiata se encontró una disminución del 21% ($p<0.05$) a las 2 horas y un incremento del 39% y del 47% a las 24 horas ($p<0.01$) y 7 días ($p<0.05$) respectivamente (figura 7).

En el campo CA2, la capa oriens también se encuentra afectada reportando incrementos del 13% y 25% después de 1 hora y 7 días ($p<0.05$) respectivamente.

En este campo, la densidad óptica de la capa radiata se eleva significativamente ($p<0.01$) 41% respecto al control (figura 8).

En el campo CA3, la administración de MPP⁺ afecta, al igual que en el CA1 y CA2, las capas oriens y radiata.

Después de 2 horas de la aplicación de la neurotoxina, la densidad óptica de la tinción de zinc en la capa oriens disminuye 14% ($p<0.05$); y por el contrario, aumenta 26% ($p<0.05$) hasta los 7 días.

La capa radiata presenta incrementos del 14% y 39% ($p<0.05$) a las 24 horas y 7 días respectivamente (figura 9).

La administración del MPP⁺ directamente en el ventrículo lateral derecho no tiene ningún efecto sobre la intensidad de la tinción de Timm en la capa granular del giro dentado (figura 10) ni en las capas piramidal y molecular de las regiones CA1, CA2 y CA3 del hipocampo. Todas las alteraciones que se presentan en las regiones del hipocampo se pueden apreciar en la figura 11.

Región CA1 del Hipocampo

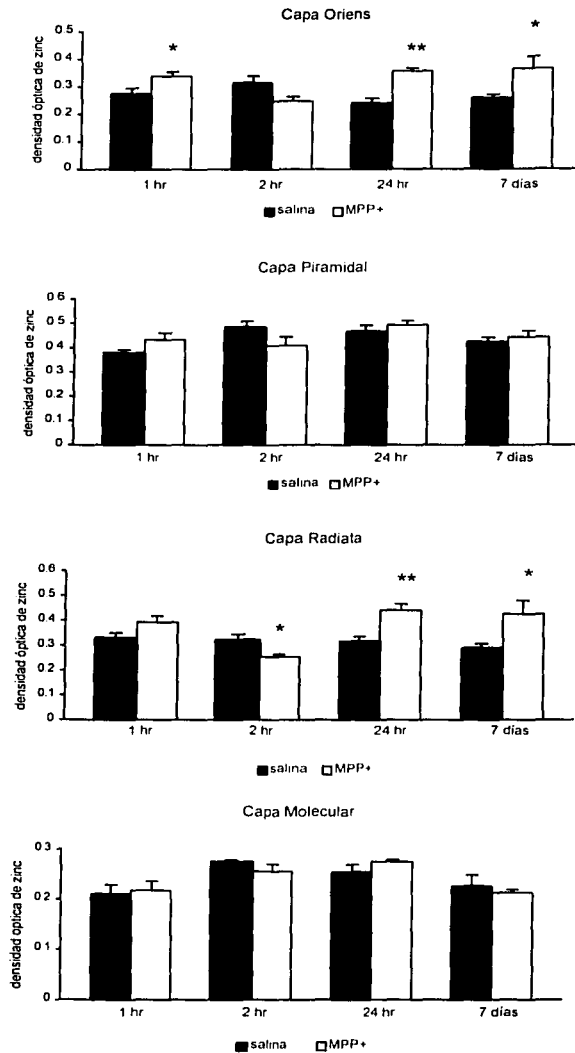


Figura 7. La densidad óptica (media $\pm$ error estándar) del zinc, se altera en las capas oriens y radiata de la región CA1 del hipocampo de ratones de la cepa C57 black después de la administración icv de MPP+. Las medias fueron comparadas estadísticamente usando una prueba *t* de Student. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

Región CA2 del Hipocampo

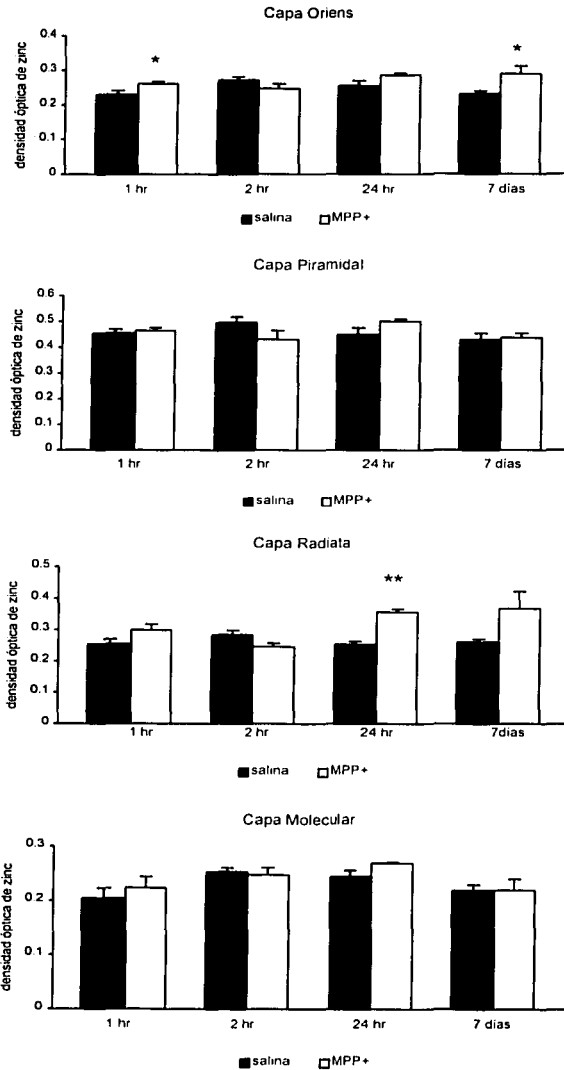


Figura 8. En esta región, al igual que en el CA1 y CA3, el zinc aumenta en las capas oriens y radiata después de la administración icv de MPP+. Las medias ($\pm$ error estándar) fueron comparadas estadísticamente usando una prueba *t* de Student. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

Región CA3 del Hipocampo

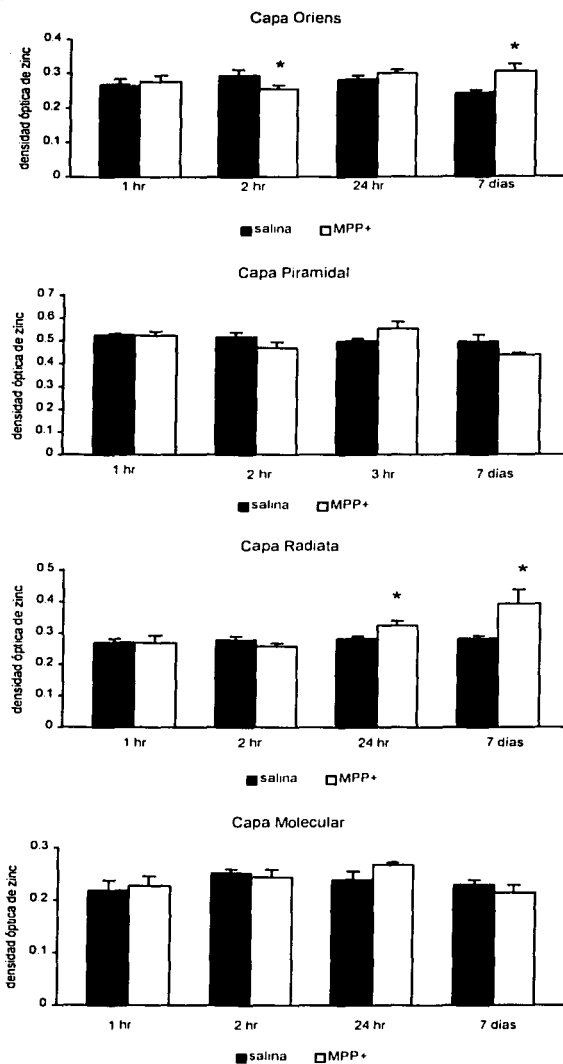


Figura 9. La tinción de Timm se altera en las capas oriens y radiata de la región CA3 del hipocampo después de la administración icv de MPP+. Las medias ($\pm$ error estándar) fueron comparadas estadísticamente usando una prueba *t* de Student, * $p < 0.05$.

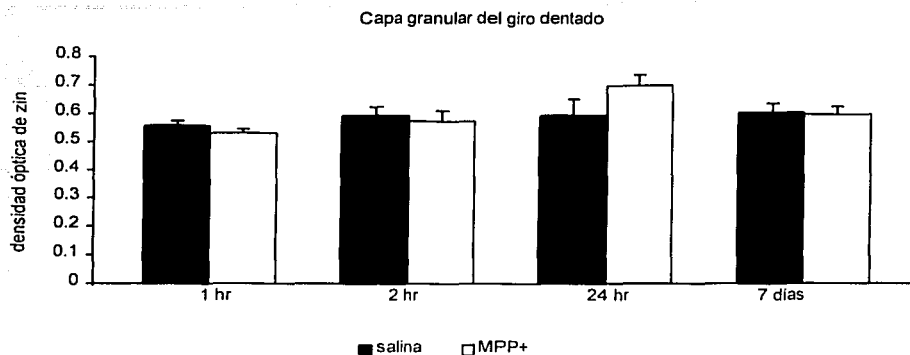


Figura 10. Densidad óptica (media $\pm$ error estándar) del zinc en la capa granular del giro dentado. La administración icv de MPP⁺ no tiene ningún efecto sobre la intensidad de la tinción de Timm en esta capa celular. Las medias fueron comparadas estadísticamente usando una prueba *t* de Student.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

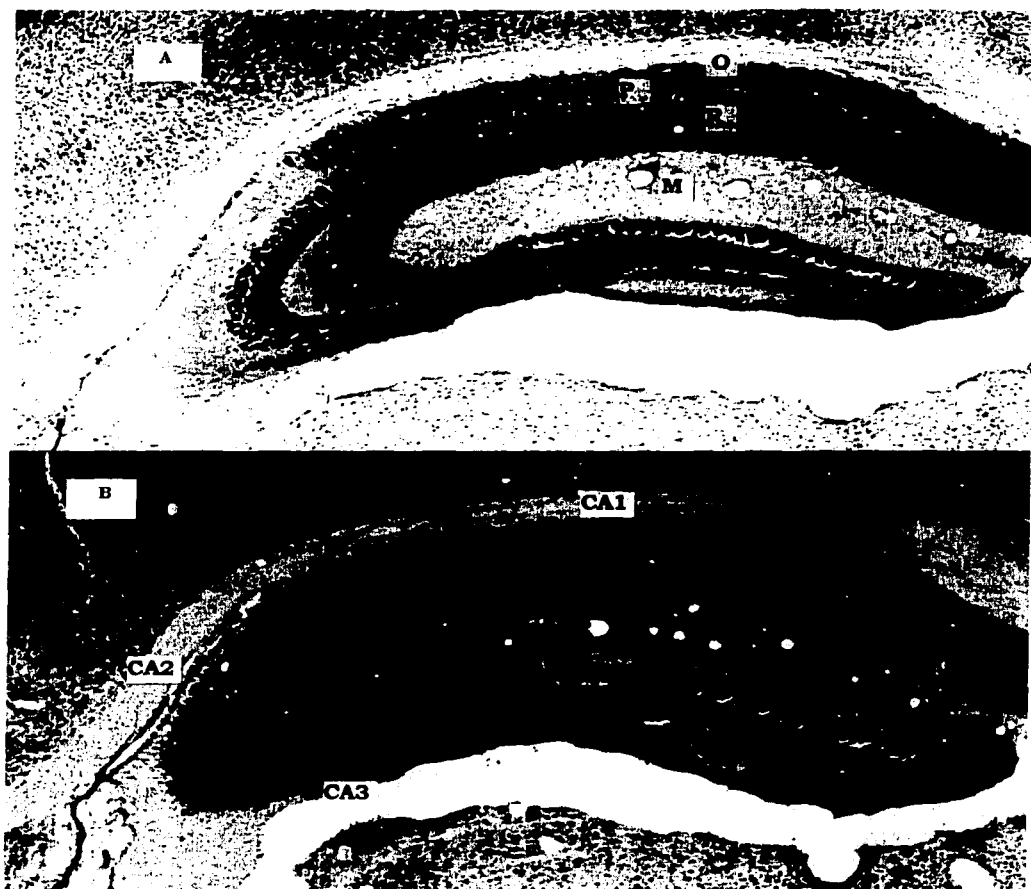


Figura 11. Fotografías de cortes coronales, teñidos con el método de Timm, del hipocampo de ratones control (A) y tratados con MPP⁺ (B). En las secciones de ratones tratados con MPP⁺ se observa un incremento considerable en la intensidad de la tinción de Timm; O. capa oriens, P. capa piramidal, R. capa radiata, M. capa molecular.

vi. Dopamina estriatal

La administración de MPP⁺ a 2 horas no provocó efectos en el contenido de dopamina en el cuerpo estriado; sin embargo, después de 24 horas se observó una disminución significativa de dopamina del 40 % y de 37 % a los 7 días cuando se comparó con el grupo control (figura 12).

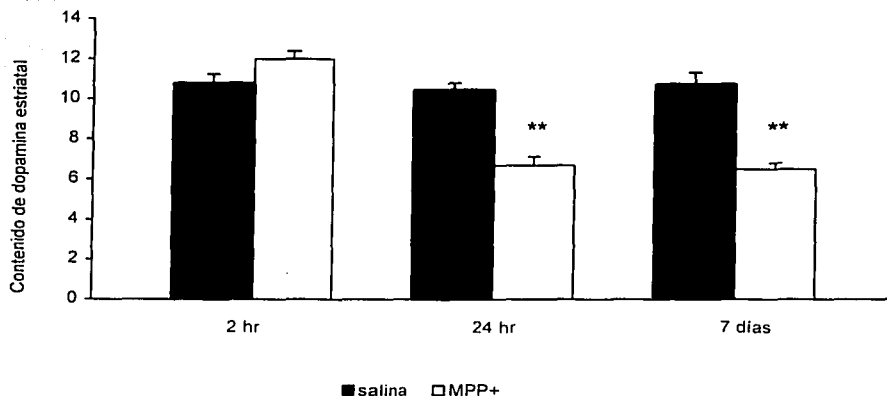


Figura 12. Contenido de dopamina estriatal a diferentes tiempos después de la administración icv de MPP⁺. Los resultados muestran una disminución de dopamina a las 24 hrs y 7 días de la administración y están expresados como el promedio en µg/g $\pm$ error estándar. ** $p < 0.01$ respecto al control en prueba de Tukey.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

VIII. DISCUSIÓN

El zinc es considerado un elemento traza esencial para los sistemas biológicos y es el cuarto ión más abundante en el cerebro (Nielsen, 1984; Ebadi y Hama, 1986).

La deficiencia de zinc durante el desarrollo causa malformaciones y afecta la memoria a corto y largo plazo (Sandstead, 1978). Por otra parte, varias evidencias sugieren que una consecuencia de la deficiencia de zinc puede ser el incremento del daño oxidativo. El zinc puede estar involucrado en varios componentes del sistema de defensa antioxidante (Bray y Bettger, 1990), incluyendo: 1) como un componente esencial de la SOD cobre-zinc, 2) por medio de su asociación con la MT, la cual es rica en grupos tiol, y 3) por medio de la competencia con el cobre y fierro por los sitios de enlace en la membrana y de esta manera reduciendo el potencial para la formación de radicales hidroxilo.

Los resultados obtenidos en este trabajo, muestran que la inyección de MPP⁺ en el ventrículo lateral derecho reduce la densidad óptica del zinc en el cuerpo estriado. Esta región no muestra recuperación en la densidad óptica, incluso 7 días después de la administración de la toxina.

Estudios recientes han mostrado que el zinc participa en el control de la sobreproducción de radicales libres como un compuesto de enzimas importantes como la MT y la SOD (Bray y Bettger, 1990). El mecanismo por el cual el MPP⁺ induce la pérdida del zinc en el cuerpo estriado podría ser la disminución en la retención del zinc por medio de proteínas, como por ejemplo la MT. Es interesante mencionar que la administración de MPP⁺ reduce la concentración de MT en el estriado (Rojas y cols, 2000). Todo esto sugiere que el MPP⁺ puede reducir el contenido de zinc por medio de la disminución en la concentración de enzimas antioxidantes que atrapan zinc como la MT.

Sin embargo, se ha observado que la actividad de la SOD se encuentra elevada en la sustancia nigra de pacientes parkinsonianos (Saggu y cols, 1989) y en el cuerpo estriado de animales tratados con MPTP (Thiffault y cols, 1995). Estos incrementos pueden reflejar un cambio fisiológico compensatorio después de la disminución de MT.

El incremento de la SOD reportado en el estriado (Thiffault y cols, 1995) podría ser poco significativo en relación a la concentración de zinc, ya que esta enzima solo enlaza 1 átomo de zinc por mol de proteína (Siegel y cols, 1999). En comparación, la MT puede atrapar hasta 7 átomos de zinc por mol de proteína (Kägi y Schaffer, 1988); de esta forma, la disminución en la MT podría afectar de manera más importante la concentración de zinc a diferencia del incremento en la SOD.

El estrés oxidativo es el resultado de la pérdida del balance entre la producción de especies reactivas del oxígeno y los mecanismos antioxidantes de la célula. La deficiencia y privación a largo plazo del zinc proporciona a los organismos mayor susceptibilidad al daño inducido por una gran variedad de agentes que causan estrés oxidativo (Oteiza y cols, 1995)

El cuerpo estriado es una región altamente vulnerable al estrés oxidativo y esta vulnerabilidad se incrementa, de manera considerable, como resultado de la reducción de antioxidantes celulares importantes como el zinc y la MT después de la administración de MPP⁺.

Estos resultados apoyan la hipótesis de que existe una relación entre el estado de los metales y la susceptibilidad al daño estriatal inducido por radicales libres y causado por la administración de MPP⁺. Esto es muy importante, ya que se han reportado alteraciones en los niveles de algunos metales, como la reducción de cobre y manganeso en el cuerpo estriado después de la administración de MPTP (Ríos y cols, 1995) y MPP⁺ (Alcaraz y cols, 2001).

Se necesitan de posteriores experimentos para explicar por que el zinc y otros metales se pierden del tejido estriatal después de la administración de MPP⁺; sin embargo, se ha sugerido que la regulación o el daño directo sobre proteínas que enlazan zinc y otros metales, son una posible explicación para la pérdida de metales.

Considerando que el zinc, como una de sus muchas funciones celulares, puede proteger contra el estrés oxidativo (Powell, 2000), las consecuencias de la disminución de este metal son de mucha relevancia y podrían estar estrechamente relacionadas con los mecanismos de acción del MPP⁺.

Existen dos sistemas de barrera involucrados en el transporte del zinc hacia el cerebro: barrera hematoencefálica y barrera hematocerebroespinal.

Se ha reportado que la barrera hematoencefálica es importante para el transporte de nutrientes incluyendo los metales traza (Takeda, 2000), y además, los plexos coroideos pueden participar proporcionando algunos metales traza como el zinc y manganeso al cerebro (Takeda y cols, 1994 a) ya que se ha observado que el ⁶⁵Zinc esta concentrado en los plexos coroideos de ratones y ratas después de la inyección intravenosa de ⁶⁵ZnCl₂ (Takeda y cols, 1994 b).

De esta forma, el zinc puede ser transportado hacia el cerebro por medio de estos dos sistemas. Sin embargo, los mecanismos de secreción de zinc desde las células endoteliales capilares del cerebro y las células epiteliales coroidales hacia el fluido extracelular del cerebro y el fluido cerebroespinal, respectivamente, son desconocidos.

La disminución del zinc en los ventriculos laterales alcanzo el 44%, mientras que en el epitelio ventricular solo se redujo el 11%. Esta región es de mucha importancia, por lo que es necesario realizar mas estudios para determinar los mecanismos mediante los cuales el MPP⁺ origina esta disminución de la densidad óptica del zinc.

Aunque el zinc esta presente en vesiculas sinápticas en muchas regiones telencefálicas como la neocorteza, hipocampo, bulbo olfatorio, septum, caudado putamen

y complejo amigdalino (Pérez-Clausell y Danscher, 1985), la región hipocampal es por mucho la más estudiada debido a la gran abundancia de zinc histoquímicamente reactivo.

En este estudio se demostró que la inyección de MPP⁺ en el ventrículo lateral derecho incrementa los niveles de zinc histoquímicamente reactivo principalmente en las capas oriens y radiata de los campos CA1, CA2 y CA3 del hipocampo.

Los cambios en el contenido de zinc, como consecuencia de la administración de MPP⁺, podrían revelarnos que el contenido de este metal es afectado directamente por los mecanismos neurotóxicos; o alternatively, un fenómeno resultado del daño celular en las regiones que son blanco de las acciones tóxicas de esta droga. Si tomamos en cuenta la última hipótesis, entonces la disminución en el contenido de zinc y otros metales podría ser tomado como un índice de daño neuronal dopaminérgico.

Sin embargo, se ha observado que después de la administración de 6-hidroxidopamina, el zinc se incrementa en la sustancia *nigra* (Takeda y cols, 1998), y disminuye en el cuerpo estriado (Rojas y cols, 1996); por otro lado, el tratamiento con la MPTP origina una acumulación de hierro en la sustancia *nigra* (Mochizuki y cols, 1994).

Con todo esto, es posible que las alteraciones en el contenido de zinc no se deban a la muerte celular, sino más bien a una redistribución de este metal a través de las regiones telencefálicas como el hipocampo.

Los efectos benéficos del incremento en la concentración de zinc pueden ser principalmente la inducción de alguna otra molécula, como la MT, que finalmente actúe como antioxidante.

Numerosos estudios han demostrado que la administración de zinc induce la síntesis de MT en órganos como el hígado (McCormick y cols, 1981) y el riñón (Swerdel y Cousins, 1982). Además, la administración intracerebroventricular de ZnSO₄ eleva la concentración de zinc y la síntesis de ARNm de la MT-I y MT-II (Ebadi y cols, 1996).

Por otra parte, la administración de la neurotoxina dopaminérgica 6-hidroxidopamina, incrementa dramáticamente el ARNm de la MT en la región hipocampal (Rojas y cols, 1996), sin embargo, se ha demostrado que el tratamiento con MPP⁺ no altera la concentración de MT en el hipocampo (Rojas y cols, 2000).

No se han encontrado hasta la fecha alguna relación entre los mecanismos de neurotoxicidad del MPP⁺ y el núcleo arcuato, por lo que la disminución del zinc que presenta este núcleo hipotalámico necesita de posteriores estudios.

Existe evidencia directa que el transportador de dopamina humano posee un sitio de alta afinidad para enlazar Zn²⁺ y que este metal es un modulador de la actividad del transportador de dopamina (Norregaard y cols, 1998). Es importante agregar que en algunos estudios se ha observado que la deficiencia de zinc esta asociada con cambios en el contenido de neurotransmisores (Stengaard y cols, 1981). Con esto podemos sugerir que la reducción de zinc en el cuerpo estriado esta asociada con la disminución de dopamina estriatal que se observa después de la administración de MPP⁺.

La enfermedad de Parkinson es una enfermedad neurodegenerativa que tiene incidencia en nuestra población, por esta razón es muy importante conocer a fondo la participación de todos los antioxidantes conocidos en los mecanismos neurotóxicos de drogas como la MPP⁺ y posteriormente en el desarrollo de la enfermedad de Parkinson idiopática.

IX. CONCLUSIÓN

La administración del MPP⁺ reduce la concentración de zinc en el cuerpo estriado, por lo que esta estructura es mucho más susceptible al estrés oxidativo.

El MPP⁺ causa disminución de zinc en el epitelio ventricular, este efecto quizá altere la recaptura y transporte del zinc hacia el cerebro.

El hipocampo es una región altamente rica en zinc y la concentración basal se incrementa después de la administración del MPP⁺; este proceso se da probablemente para inducir la síntesis de otra molécula importante que finalmente actúe como antioxidante.

La densidad óptica del zinc disminuye en el núcleo arcuato; sin embargo, aún no se ha encontrado relación entre esta región y los mecanismos de neurotoxicidad del MPP⁺.

El MPP⁺ no altera la densidad óptica de la tinción del zinc en el cerebelo, giro dentado y las capas piramidal y molecular del hipocampo.

La administración de MPP⁺ esta asociada con la disminución de dopamina estriatal.

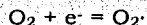
El MPP⁺ induce alteraciones del contenido de zinc en varias regiones del cerebro, quizá estos cambios podrían estar relacionados con los mecanismos de acción de esta neurotoxina.

X. APENDICE

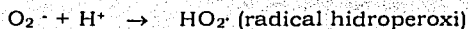
i. Especies reactivas del oxígeno

Cerca del 15% del flujo sanguíneo que sale del corazón se dirige hacia el cerebro. Esto corresponde a una sorprendente constante de utilización de 3.5 ml de oxígeno/100 gramos de tejido cerebral /minuto. Cerca del 2% del oxígeno consumido se convierte en especies reactivas del oxígeno (ERO), las cuales incluyen muchos tipos de radicales libres (Boveris y Chance, 1973).

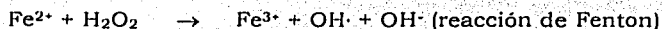
Cuando el oxígeno molecular (O_2) adquiere un electrón, se forma el radical superóxido ($O_2^{\cdot -}$):



La superóxido dismutasa (SOD) y el H^+ pueden reaccionar con el $O_2^{\cdot -}$ para formar peróxido de hidrógeno, H_2O_2 :



Las formas férricas y ferrosas del hierro pueden reaccionar con el radical superóxido y con el peróxido de hidrógeno para producir oxígeno molecular y el radical hidroxilo (OH), respectivamente:

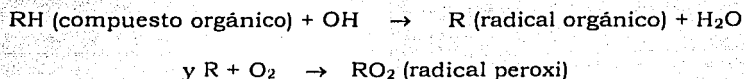


El radical hidroxilo también puede ser formado a partir del radical superóxido mediante la reacción de Haber-Weiss:



Tanto en la reacción de Fenton como en la de Haber-Weiss se requiere de un metal de transición como cobre y hierro. Entre las ERO, el OH es el más dañino y tiene una corta vida.

El radical hidroxilo es muy reactivo con una gran variedad de compuestos orgánicos, lo que origina la producción de más compuestos radicales:



ii. Especies reactivas del nitrógeno

El óxido nítrico (ON) es sintetizado por la enzima óxido nítrico sintasa a partir de la L-arginina, y en el cerebro actúa como un neurotransmisor y en cantidades excesivas actúa como una neurotoxina. El ON puede combinarse con el radical superóxido para formar peroxinitrito, un poderoso oxidante:



Cuando el peroxinitrito se protona, espontáneamente se descompone en radicales nitroso e hidroxilo:



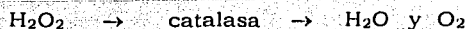
Todos estos datos revelan que diferentes tipos de radicales son constantemente formados en el cerebro. Sus respectivos niveles pueden ser incrementados por la pérdida de dopamina, elevación en los niveles de hierro libre, desajuste en las funciones mitocondriales, disminución en los niveles de glutatión (Prasad y cols, 1999).

iii. Mecanismos de protección contra los radicales libres

Las enzimas antioxidantes, las cuales pueden proteger a la célula contra los efectos nocivos de los radicales libres, incluyen a la catalasa, superóxido dismutasa y

glutación peroxidasa. Los niveles reducidos de estas enzimas pueden dar origen a un incremento en los niveles de radicales libres.

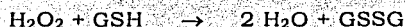
La catalasa actúa sobre el peróxido de hidrógeno para formar agua y oxígeno molecular:



La superóxido dismutasa (SOD) cataliza la dismutación del radical superóxido a peróxido de hidrógeno y representa la primera línea de defensa contra la toxicidad del oxígeno:



La glutación peroxidasa consume peróxido de hidrógeno para transformar el glutación reducido (GSH) en glutación oxidado (GSSG) (Olanow, 1993):



Se ha propuesto que estas enzimas participan de manera importante en los desórdenes neurogenerativos. Se ha observado que los niveles de catalasa y glutación peroxidasa están disminuidos en la sustancia nigra de cerebros con EP (Ambani y cols, 1975), sin embargo, los niveles de superóxido dismutasa se encuentran elevados (Saggu y cols, 1989).

Los antioxidantes naturales presentes en la dieta incluyen a la vitamina A, C y E, carotenoides, flavonoides y polifenoles. Algunos antioxidantes biosintéticos incluyen la coenzima Q₁₀, ácido lipoico, glutación reducido, NADH reducido y uratos. Por lo tanto, el consumo de una dieta baja en antioxidantes puede también elevar los niveles de radicales libres.

De esta manera, el mantenimiento de un balance en favor de los antioxidantes es esencial para el funcionamiento óptimo del cerebro. Cuando este balance se inclina en favor de los oxidantes, se puede iniciar la degeneración y eventualmente causar la muerte celular.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Alcaraz, M., Rojas, P., Boll, C. and Rios, C. (2001) Neuroprotective effect of acute and chronic administration of copper (II) sulfate against MPP⁺ Neurotoxicity in mice. *Neurochem. Res.* 26: 59-64.
- Ambani, L., Van Woert, M. and Murphy, S. (1975) Brain peroxidase and catalase in parkinson disease. *Arch. Neurol.* 32: 114-118.
- Aschner, M., Cherian, M., Klaarsen, C., Palmiter, R., Erickson, J., and Bush, A. (1997) Metallothioneins in brain. The role in physiology and pathology. *Toxicol Appl Pharmacol.* 142: 229-242.
- Assaf, S.Y. and Chung, S.H. (1984) Release of endogenous Zn²⁺ from brain tissue during activity. *Nature.* 308: 734-736.
- Ballard, P., Tetrud, J. and Langston, J. (1985) Permanent human parkinsonism due to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): seven cases. *Neurology.* 35: 949-956.
- Beckman, J., Beckman, T., Chen, J., Marshall, P. and Freeman, B. (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 1620-1624.
- Bettger, W. and O'Dell, B. (1981) A critical physiological role of zinc in the structure and function of biomembranes. *Life Sci.* 13: 1425-1438.
- Boveris, A. and Chance, B. (1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide: general properties and the effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* 134: 707-716.
- Bowling, A. and Beal, M. (1995) Bioenergetic and oxidative stress in neurodegenerative disease. *Life Sci.* 56: 1151-1171.
- Bray, T. and Bettger, W. (1990) The physiological role of zinc as an antioxidant. *Free Radical Biol. & Med.* 8: 281-291.
- Bruxani-Rice, S., Ueda, F. and Bradbury, W.M. (1994) Transport of zinc-65 at the blood-brain barrier during short cerebrovascular perfusion in the rat: its enhancement by histidine. *J. Neurochem.* 62: 665-672.
- Budavari, S., O'Neil, M., Smith, A. and Heckelman, P. (eds) (1989) *The Merck Index*. N.J. USA. Merck & Co. Inc. 1597-1598 pp.
- Burns, R., Chiueh, C., Markey, S., Ebert, M., Jacobowitz, D. and Kopin, I. (1983) A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by MPTP. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 4546-4550.
- Bush, A., Pettingell, W., Multhaup, G., Paradis, M., Vonsattel, J., Gusella, J., Beyreuther, K., Masters, C. and Tanzi, R. (1994) Rapid induction of Alzheimer A β amyloid formation by zinc. *Science.* 265: 1464-1467.
- Chacon, J., Chedekel, M., Land, E. and Truscott, T. (1987) Chemically induced Parkinson's disease: intermediates in the oxidation of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine to the 1-methyl-4-phenylpyridinium ion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 144: 957-964.
- Chan, P. and Fishman, R. (1980) Transient formation of superoxide radicals in polyunsaturated fatty acid-induced brain swelling. *J. Neurochem.* 35: 1004-1007.
- Chang, G. and Ramirez, V. (1986) The mechanism of action of MPTP and MPP⁺ on endogenous dopamine release from the rat corpus striatum superfused in vitro. *Brain Res.* 368: 134-140.

- Choi, D.W., Yokoyama, M. and Koh, J. (1988) Zinc neurotoxicity in cortical cell culture. *Neuroscience*. 24: 67-79.
- Choi, D. and Koh, J. (1998) Zinc and brain injury. *Annu. Rev. Neurosci.* 21: 347-375.
- Christensen, M. and Frederickson, C. (1998) Zinc-containing afferent projections to the rat corticomedial amygdaloid complex: a retrograde tracing study. *J. Comp. Neurol.* 400: 375-390.
- Chung, J., Chang, S., Kim, Y. and Shin, H. (2000) Zinc increases the excitability of dopaminergic neurons in rat substantia nigra. *Neurosci. Lett.* 286: 183-186.
- Colvin, A.R. (1998) Characterization of a plasma membrane zinc transporter in rat brain. *Neurosci. Lett.* 247: 147-150.
- Colvin, A.R., Davis, N., Nipper, W.R. and Carter, A.P. (2000a) Zinc transport in the brain: routes of zinc influx and efflux in neurons. *J. Nutr.* 130: 1484S-1487S.
- Colvin, A.R., Davis, N., Nipper, W.R. and Carter, A.P. (2000b) Evidence for a zinc/proton antiporter in rat brain. *Neuroch. Inter.* 36: 539-547.
- Costa, P., Checkoway, H., Levy, D., Smith-Weller, T., Franklin, G., Swanson, P. and Costa, G. (1997) Association of a polymorphism in intron 13 of the monoamine oxidase B gene with parkinson disease. *Am. J. Med. Genetics*. 74: 154-156.
- Coyle, J. and Puttfarcken, P. (1993) Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. *Science*. 262: 689-695.
- Cua Jungco, M. and Lees, G. (1997a) Zinc and Alzheimer's disease; is there a direct link?. *Brain Res. Rev.* 23: 219-236.
- Cua Jungco, M. and Lees, G. (1997b) Zinc metabolism in the brain: relevance to human neurodegenerative disorders. *Neurobiol. Dis.* 4: 137-169.
- Czupryn, A. and Skangiel-Kramska, J. (1997) Distribution of synaptic zinc in the developing mouse somatosensory barrel cortex. *J. Comp. Neurol.* 386: 652-660.
- Danscher, G., Hall, E., Fredens, K., Fjordingstad, E. and Fjordingstad, J. (1975) Heavy metals in the amygdala of the rat: zinc, lead and copper. *Brain Res.* 94: 167-172.
- Danscher, G., Jensen, K., Frederickson, C., Kemp, K., Andreasen, A., Juhl, S., Stoltenberg, M. and Ravid, R. (1997) Increased amount of zinc in the hippocampus and amygdala of Alzheimer's disease brains: a proton-induced x-ray emission spectroscopy analysis of cryostat sections from autopsy material. *J. Neurosci. Methods*. 76: 53-59.
- Danscher, G. (1981) Histochemical demonstration of heavy metals. *Histochemistry*. 71: 1-16.
- Danscher, G. (1982) Exogenous selenium in the brain. A histochemical technique for light and electron microscopical localization of catalytic selenium bonds. *Histochemistry*. 76: 281-293.
- Davis, G., Williams, A., Markey, S., Ebert, M., Calne, E., Reicher, C. and Kopin, I. (1979) Chronic parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry Res.* 1: 249.
- Dexter, D., Wells, F., Agid, Y., Lees, A., Jenner, P. and Marsden, C. (1987) Increased nigral iron content in postmortem parkinsonian brain. *Lancet*. 2: 1219-1220.
- Dexter, D., Carter, C., Javoy-Agid, F., Agid, Y., Lees, A., Jenner, P. and Marsden, C. (1989) Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 52: 381-389.

- Dexter, D., Carayon, A., Javoy-Agid, F., Agid, Y., Wells, F., Daniel, S., Lees, A., Jenner, P. and Marsden, C. (1991) Alterations of the levels of iron, ferritin and other neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia. *Brain*. 114: 1953-1975.
- Duvoisin, R. (1976) Parkinsonism: animal analogues of the human disorder. In: *The basal ganglia*. Raven Press. New York. pp 293-303.
- Dyck, R.H. and Cynader, M.S. (1993) An interdigitated columnar mosaic of cytochrome oxidase, zinc and neurotransmitter-related molecules in cat and monkey visual cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 9066-9069.
- Dyck, R.H., Beaulieu, C. and Cynader, M. (1993) Histochemical localization of synaptic zinc in the developing cat visual cortex. *J. Comp. Neurol.* 329: 53-67.
- Ebadi, M. and Hama, Y. (1986) Zinc-binding proteins in the brain. *Adv. Exp. Med. Biol.* 203: 557-570.
- Ebadi, M., Iversen, P., Hao, R., Cerutis, D., Rojas, P., Happe, H., Murrin, L. and Pfeiffer, R. (1995) Expression and regulation of brain metallothionein. *Neurochem. Int.* 27: 1-22.
- Ebadi, M., Leuschen, M., El Refaey, H., Hamada, F. and Rojas, P. (1996) The antioxidant properties of zinc and metallothionein. *Neurochem. Int.* 29: 159-166.
- Ebadi, M., Hiramatsu, M., Shiraga, H. and Rojas, P. (1996a) Zinc metallothionein isoforms in free radical-mediated striatal damage in parkinson disease. In *Free radicals in brain physiology and disorders*. pp 141-156. Academic Press.
- Facchinetti, F., Dawson, V. and Dawson, T. (1998) Free radicals as mediators of neuronal injury. *Cel. Mol. Neurobiol.* 18: 667-682.
- Frederickson, C. (1989) Neurobiology of zinc and zinc-containing neurons. *Int. Rev. Neurobiol.* 31: 145-238.
- Frederickson, C., Howell, G. and Frederickson, M. (1981) Zinc dithizonate staining in the cat hippocampus: relationship to the mossy-fiber neuropil and postnatal development. *Exp. Neurol.* 73: 812-823.
- Frederickson, C., Kasarkis, E., Ringo, D. and Frederickson, R. (1987) A quinoline fluorescence method for visualizing and assaying the histochemically reactive zinc (bouton zinc) in the brain. *J. Neurosci. Meth.* 20: 91-103.
- Frederickson, C., Manton, W., Frederickson, M., Howell, G. and Mallory, M. (1982) Stable-isotope dilution measurement of zinc and lead in rat hippocampus and spinal cord. *Brain Res.* 246: 338-341.
- Frederickson, C., Klitenick, M., Manton, W. and Kirkpatrick, J. (1983) Cytoarchitectonic distribution of zinc in the hippocampus of man and the rat. *Brain Res.* 273: 335-339.
- Frederickson, C., Rampy, B., Reamy, S. and Howell, G. (1992) Distribution of histochemically reactive zinc in the forebrain of the rat. *J. Chem. Neuroanat.* 5: 521-530.
- Gerlach, H., Riederer, P., Przuntek, H. and Youdim, M. (1991) MPTP mechanism of neurotoxicity and their implications for Parkinson's disease. *Eur. J. Pharmacol.* 208: 273-286.
- Giovanni, A., Sieber, B., Heikkila, R. and Sonsalla, P. (1991) Correlation between the neostriatal content of the 1-methyl-4-phenylpyridinium species and dopaminergic neurotoxicity following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine administration to several strains of mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 257: 691-697.

- Golbe, L., Farrell, T. and Davis, P. (1988) Case-control survey of early life dietary factors in parkinson's disease. *Arch. Neurol.* 45: 1350-1353.
- Graham, D. (1978) Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinines. *Mol. Pharmacol.* 14: 633-643.
- Halliwell, B. (1992) Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem.* 59: 1609-1623.
- Hoa, R., Cerutis, D., Blaxall, H., Rodriguez, J., Pfeiffer, R. and Ebadi, M. (1994) Distribution of zinc metallothionein I mRNA in rat brain using in situ hybridization. *Neurochem. Res.* 19: 761-767.
- Heikkila, R., Youngster, S., Manzino, L., Cabbat, F. and Duvoisin, R. (1985) Effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine and related compounds on the uptake of [3H]3,4-dihydroxyphenylethylamine and [3H]5-hydroxytryptamine in neostriatal synaptosomal preparations. *J. Neurochem.* 44: 310-313.
- Hidalgo, J., Company, L., Borrás, M., Garvey, J. and Armario, A. (1988) Metallothionein response to stress in rats: role in free radical scavenging. *Am. J. Physiol.* 255: E518-524.
- Hiramatsu, M., Kohno, M., Mori, A., Shiraga, H., Pfeiffer, R. and Ebadi, M. (1994) An ESR study of 6-hydroxydopamine: generated hydroxy radicals and superoxide anions in brain. *Neurosciences.* 20: 129-138.
- Holm, I., Andreasen, A., Danscher, G. and Nielsen, H. (1991) Densitometric analysis of the local bleaching of the Neo-Timm staining pattern following intrahippocampal injection of diethyldithiocarbamate. *Histochemical J.* 23: 63-68.
- Hornykiewicz, O. (1966) Dopamine (3-hydroxytyramine) and brain function. *Pharmacol. Rev.* 18: 925-964.
- Howell, G., Welch, G.M. and Frederickson, C. (1984) Stimulation-induced uptake and release of zinc in hippocampal slices. *Nature.* 308: 736-738.
- Howell, G. and Frederickson, C. (1989) A retrograde transport method for mapping zinc-containing fiber systems in the brain. *Brain Res.* 515: 277-286.
- Huang, X., Cuajungco, M., Atwood, C., Moir, R., Tanzi, R. and Bush, A. (2000) Alzheimer's disease, B-amyloid protein and zinc. *J. Nutr.* 130: 1488S-1492S.
- Itoh, M. and Ebadi, M. (1982) The selective inhibition of hippocampal glutamic acid decarboxylase in zinc-induced epileptic seizures. *Neurochem. Res.* 7: 1287-1298.
- Itoh, M., Ebadi, M. and Swanson, S. (1983) The presence of zinc-binding proteins in brain. *J. Neurochem.* 41: 823-829.
- Javitch, J. and Snyder, S. (1984) Uptake of MPP⁺ by dopamine neurons explains selectivity of parkinsonism-inducing neurotoxin. *Eur. J. Pharmacol.* 106: 455-456.
- Jenner, P., Dexter, D., Sian, J., Schapira, A. and Marsden, C. (1992) Oxidative stress as a cause of nigral cell death in Parkinson's disease and incidental Lewy body disease. The Royal Kings and Queens Parkinson's Disease Research Group. *Ann. Neurol. Suppl* 32: S82-S87.
- Kaakkola, S. and Teravainen, H. (1990) Animal models of parkinsonism. *Pharmacol. Toxicol.* 67: 95-100.

- Kaas, G., Wright, J., Nicotera, P. and Orrenius, S. (1988) The mechanism of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity: role of intracellular calcium. *Arch. Biochem. Biophys.* 260: 789-797.
- Kägi, J. and Schaffer, A. (1988) Biochemistry of metallothionein. *Biochemistry.* 27: 8509-8515.
- Kelly, A.E., Domestick, V.B. and Nauta, W.J. (1982) The amigdalostriatal projection in the rat -An anatomical study by anterograde and retrograde tracing methods. *Neuroscience.* 7: 615-630.
- Kesslak, J., Frederickson, C. and Gage, F. (1987) Quantification of hippocampal noradrenaline and zinc changes after selective cell destruction. *Exp. Brain Res.* 67: 77-84.
- Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., Yokochi, M., Mizuno, Y. and Shimizu, N. (1998) Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature.* 392: 605-608.
- Kopin, I. (1986) MPTP effects on dopamine neurons. *Ann. New York Sci.* 451-461.
- Langston, J., Ballard, P., Tetrud, J. and Irwin, I. (1983) Chronic parkinsonism in human due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science.* 219: 979.
- Langston, J., Forno, L., Rebert, C. and Irwin, I. (1984) Selective nigral toxicity after systemic administration of MPTP in the squirrel monkey. *Brain Res.* 292: 390.
- Le Couteur, D., Leighton, P., McCann, S. and Pond, S. (1997) Association of a polymorphism in the dopamine-transporter gene with parkinson's disease. *Movement disord.* 12: 760-763.
- Lees, G.J., Lehmann, A., Sandberg, M. and Hamberger, A. (1990) The neurotoxicity of zinc in the rat hippocampus. *Neuros. Lett.* 120: 155-158.
- Lees, G.J. (1993) Contributory mechanism in the causation of neurodegenerative disorders. *Neuroscience.* 54: 287-322.
- Leist, M. and Nicotera, P. (1997) Calcium and neural death. *Rev. Physiol. Pharmacol. Biochem.* 132: 79-125.
- Lewin, R. (1984) Brain enzyme is the target of drug toxin. *Science.* 225: 1460-1462.
- Lin, A. (2001) Coexistence of zinc and iron augmented oxidative injuries in the nigrostriatal dopaminergic system of SD rats. *Free Rad. Biol. Med.* 30: 225-231.
- Long, Y., Hardwick, A. and Frederickson, C. (1995) Zinc-containing innervation of the subicular region in the rat. *Neurochem. Int.* 27: 95-103.
- Lopez, C. and Martinez, F. (1988) Neurons in the medial cortex give rise to Timm-positive boutons in the cerebral cortex of lizards. *Brain Res.* 463: 205-217.
- Lotharius, J., Dugan, L. and O'Malley, K. (1999) Distinct mechanisms underlie neurotoxin-mediated cell death in cultured dopaminergic neurons. *J. Neurosci.* 19: 1284-1293.
- Lotharius, J. and O'Malley, K. (2000) The parkinsonism-inducing drug 1-methyl-4-phenylpyridinium triggers intracellular dopamine oxidation. *J. Biol. Chem.* 275: 38581-38588.
- Magneson, R.G., Puvathingal, M.J. and Ray, J.W. (1987) The concentrations of free Mg^{2+} and free Zn^{2+} in equine blood plasma. *J. Biol. Chem.* 262: 11140-11148.
- Makey, S., Johannessen, J., Chiueh, C., Burns, R. and Herkenham, M. (1984) Intraneural regeneration of a pyridinium metabolite cause drug-induced parkinsonism. *Nature.* 311: 464-467.

- Mancini, M., Ricci, A. and Amenta, F. (1992) Age-related changes in sulfide-silver staining in the rat neostriatum: a quantitative histochemical study. *Neurobiol. Aging* 13: 501-504.
- Mann, V., Cooper, J., Krige, D., Daniel, S., Shapira, A. and Marsden, C. (1992) Brain, skeletal muscle and platelet homogenate mitochondrial function in Parkinson's disease. *Brain*. 115: 333-342.
- Maret, W. (1994) Oxidative metal release from metallothionein via zinc-thiol/disulfide interchange. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 237-241.
- Masters, B., Quaife, C., Erickson, J., Kelly, E., Froelick, G., Zambrowicz, B., Brinster, R. and Palmiter, R. (1994) Metallothionein III is expressed in neurons that sequester zinc in synaptic vesicles. *J. Neuroscience*. 14: 5844-5857.
- McCormick, C., Menard, M., Cousins, R. (1981) Induction of hepatic metallothionein by feeding zinc to rats of depleted zinc status. *Am. J. Physiol.* 240: E414-E421.
- Mena, I., Horiuchi, K., Burke, K., Cotzia, G. (1969) Chronic manganese poisoning. Individual susceptibility and absorption of iron. *Neurology*. 19: 1000-1006.
- Miyako, K., Kai, Y., Irie, T., Takeshige, K. and Kang, D. (1997) The content of intracellular mitochondrial DNA is decreased by 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺). *J. Biol. Chem.* 272: 9605-9608.
- Miyako, K., Kai, Y., Irie, T., Takeshige, K., Muta, T., Umeda, S., Fujiwara, T. and Kang, D. (1999) 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺) selectively inhibits the replication of mitochondrial DNA. *Eur. J. Biochem.* 259: 412-418.
- Mochizuki, H., mai, H., Endo, K., Yokomizo, K., Murata, Y., Hattori, N. and Mizuno, Y. (1994) Iron accumulation in the substantia nigra of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced hemiparkinsonian monkeys. *Neurosci. Lett.* 168: 251-253.
- Mytilineou, C., Radcliffe, P. and Olanow, C. (1997) L-(-)-desmethylelegiline, a metabolite of selegiline (L-(-)-deprenyl), protects mesencephalic dopamine neurons from excitotoxicity in vitro. *J. Neurochem.* 68: 434-436.
- Nair, V. and Bau, D. (1971) Studies on the functional significance of carbonic anhydrase in central nervous system. *Brain Res.* 31: 185-193.
- Nakamura, S. and Vincent, R. (1986) Histochemistry of MPTP oxidation in rat brain: sites of synthesis of the parkinsonism-inducing toxin MPP⁺. *Neurosci. Lett.* 65: 321-325.
- Nielsen, F.H. (1984) Ultratrace elements in nutrition. *Annu. Rev. Nut.* 4: 21-41.
- Niglio, T., Caporali, M., Scotti de Carolis, A., Ricci, A. and Amenta, F. (1990) Absence of right-left asymmetries in the rat hippocampus as demonstrated by Timm staining. *Acta Anat.* 139: 283-286.
- Norregaard, L., Frederiksen, D., Nielsen, E. and Gether, U. (1998) Delineation of an endogenous zinc-binding site in the human dopamine transporter. *EMBO*. 17: 4266-4273.
- Ogawa, N., Asanuma, M., Kondo, Y., Kawada, Y., Yamamoto, M. and Mori, A. (1994) Differential effects of chronic L-dopa treatment on lipid peroxidation in the mouse brain with or without pretreatment with 6-hydroxydopamine. *Neurosci. Lett.* 171: 55-58.
- Olanow, C. (1993) A radical hypothesis for neurodegeneration. *TINS*. 11: 439-444.
- Olanow, C. (1996) *Neurodegeneration and neuroprotection in Parkinson's disease*. New York. Academic Press. 224 pp.

- Ono, S. and George Cherian, M. (1999) Regional distribution of metallothionein, zinc and copper in the brain of different strains of rats. *Biol. Trace Element Res.* 69: 151-159.
- Oteiza, P., Olin, K., Fraga, C. and Keen, C. (1995) Zinc deficiency causes oxidative damage to proteins, lipids and DNA rat testes. *J. Nutr.* 125: 823-829.
- Ozaki, N., Nakahara, D., Mogi, M., Harada, M., Kiuchi, K., Kaneda, M., Miura, Y., Kasahara, Y. and Nagatsu, T. (1988) Inactivation of tyrosine hydroxylase in rat striatum by 1-methyl-4-phenyl-pyridinium ion (MPP⁺). *Neurosci. Lett.* 85: 228.
- Palmiter, R., Findley, S., Whitmore, T. and Durnam, D. (1992) MT-III, a brain-specific member of the metallothionein gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 6333-6337.
- Parkinson Study Group (1993) Effects of tocopherol and deprenyl on the progression of disability in early Parkinson's disease. *N. Eng. J. Med.* 328: 176-183.
- Pérez-Clausell, J. and Danscher, G. (1986) Release of zinc sulphide accumulations into synaptic clefts after in vivo injection of sodium sulphide. *Brain Res.* 362: 358-361.
- Pérez-Clausell, J. and Danscher, G. (1985) Intravesicular localization of zinc in rat telencephalic boutons. A histochemical study. *Brain Res.* 337: 91-98.
- Perry, T., Godin, D. and Hansen, S. (1982) Parkinson's disease: a disorder due to nigral glutathione deficiency? *Neurosci. Lett.* 33: 305-310.
- Peters, S., Koh, J. and Choi, D. (1987) Zinc selectively blocks the action of *N*-methyl-D-aspartate on cortical neurons. *Science.* 236: 3222-3225.
- Powell, S. (2000) The antioxidant properties of zinc. *J. Nutr.* 130: 1447S-1454S.
- Prasad, K., Cole, W. and Kumar, B. (1999) Multiple antioxidants in the prevention and treatment of parkinson's disease. *J. Am. Col. Nutr.* 18: 413-423.
- Prohaska, J. (1987) Functions of trace elements in brain metabolism. *Physiol. Rev.* 67: 858-900.
- Przedborski, S., Kostic, V., Jackson, V., Naini, A., Simonetti, S., Fanh, S., Carlson, E., Epstein, C. and Cadet, J. (1992) Transgenic mice with increased Cu/Zn-superoxide dismutase activity are resistant to *N*-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity. *J. Neurosci.* 12: 1658-1667.
- Przedborsky, S., Jackson, V., Yokoyama, R., Shibata, T., Dawson, V. and Dawson, T. (1996) Role of neuronal nitric oxide in MPTP-induced dopaminergic neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 4565-4571.
- Przedborsky, S., Jackson, V., Djaldetti, R., Liberatore, G., Vila, M., Vukosavic, S. and Almer, G. (2000) The parkinsonian toxin MPTP: action and mechanism. *Restor. Neurol. Neurosci.* 16: 135-142.
- Quaife, C., Findley, S., Erickson, J., Forelick, G., Kelly, E., Zambrowicz, B. and Palmiter, R. (1994) Induction of a new metallothionein isoform (MT-IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia. *Biochemistry.* 33: 7250-7259.
- Radunovic, A., Porto, W., Zeman, S. and Leigh, P. (1997) Increased mitochondrial superoxide dismutase activity in Parkinson's disease but not amyotrophic lateral sclerosis motor cortex. *Neurosci. Lett.* 19: 105-108.
- Ramsay, R., Kowal, A., Johnson, M., Salach, J. and Singer, T. (1987) The inhibition site of MPP⁺, the neurotoxic bioactivation product of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine is near the Q-binding site of NADH dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* 259: 645-649.

- Riederer, P., Sofic, E., Rausch, W., Schmidt, B., Reynolds, G., Jellinger, K. and Youdim, M. (1989) Transition metals, ferritin, glutathione, and ascorbic acid in parkinsonian brains. *J. Neurochem.* 52: 515-520.
- Ríos, C., Alvarez-Vega, R. and Rojas, P. (1995) Depletion of Copper and manganese in brain after MPTP treatment of mice. *Pharmacol. Toxicol.* 76: 348-352.
- Rojas, P. and Rios, C. (1993) Increased striatal lipid peroxidation after intracerebroventricular MPP⁺ administration to mice. *Pharmacol. Toxicol.* 72: 364-368.
- Rojas, P., Ceruti, D., Happe, H., Murrin, L., Hao, R., Pfeiffer, R. and Ebadi, M. (1996) 6-hydroxydopamine-mediated induction of rat brain metallothionein I mRNA. *Neurotoxicology.* 17: 323-334.
- Rojas, P., Hidalgo, J., Ebadi, M. and Rios, C. (2000) Changes of metallothionein I+II proteins in the brain after 1-methyl-4-phenylpyridinium administration in mice. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. & Biol. Psychiat.* 24: 143-154.
- Saggu, H., Cooksey, J., Dexter, D., Wells, F., Lees, A., Jenner, P. and Marsden, C. (1989) A selective increase in particulate superoxide dismutase activity in parkinsonian substantia nigra. *J. Neurochem.* 53: 692-697.
- Sanchez, J., Barret, J., Goldstein, M., Weiner, W. and Hefti, F. (1986) 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) but not 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,5-tetrahydropyridine (MPTP) selectively destroys dopaminergic neurons in cultures of dissociated rat mesencephalic neurons. *Neurosci. Lett.* 72: 215-220.
- Sandri, G., Panfili, E. and Ernster, L. (1990) Hydrogen peroxide production by monoamine oxidase in isolated rat-brain mitochondria: its effect on glutathione levels and Ca²⁺ efflux. *Biochim. Biophys. Acta.* 1035: 300-305.
- Sandstead, H., Strobel, D., Logan, G., Marks, E. and Jacob, R. (1978) Zinc deficiency in pregnant rhesus monkeys: effects on behavior of infants. *Am. J. Clin. Nutr.* 31: 844-849.
- Sapolsky, R. and Pulsinelli, W. (1985) Glucocorticoids potentiate ischemic injury to neurons: therapeutic implications. *Science.* 229: 1397-1400.
- Sato, S. and Bremner, I. (1993) Oxygen free radicals and metallothionein. *Free Radical Biol. Med.* 14: 325-337.
- Sato, S., Frazier, J. and Goldberg, A. (1984) The distribution and binding of zinc in the hippocampus. *J. Neurosci.* 4: 1662-1670.
- Sax, D. and Tarsy, D. (1971) Side-effects of L-dopa. *N. Eng. J. Med.* 285: 1033-1037.
- Sayre, L. (1989) Biochemical mechanism of action of the dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Toxicol. Lett.* 48: 121-149.
- Schapira A. and Cooper J. (1992) Mitochondrial function in neurodegeneration and ageing. *Mutat. Res.* 275: 133-143.
- Schneider, J. and Denaro, F. (1988) Astrocytic responses to the dopaminergic neurotoxin MPTP in cat and mouse brain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 47: 452-458.
- Schwerdtfeger, W., Danscher, G. and Geiger, H. (1985) Entorhinal and prepiriform cortices of the european hedgehog. A histochemical and densitometric study based on a comparison between Timm's sulphide silver method and the selenium method. *Brain Res.* 348: 69-76.

- Seidler, A., Hellenbrand, W., Robra, B., Vieregge, P., Nischan, P. and Schneider, E. (1996) Possible environmental, occupational, and other etiologic factors for parkinson's disease: a case-control study in Germany. *Neurology*. 46: 1275-1284.
- Siegel, G., Agranoff, B., Albers, R., Fisher, S. and Uhler, M. (eds.) (1999) *Basic Neurochemistry*. New York. Lippincott-Raven. 725-729 pp.
- Singer, T. and Ramsay, R. (1990) Mechanism of the neurotoxicity of MPTP. *FEBS*. 274: 1-8.
- Sirinathsingji, D., Heavens, R. and McBride, C. (1988) Dopamine-releasing action of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP+) in the neostriatum of the rat as demonstrated in vivo by the push-pull perfusion technique: dependence on sodium but not calcium ions. *Brain Res.* 443: 101-116.
- Slomianka, L., Danscher, G. and Frederickson, C. (1990) Labeling of the neurons of origin of zinc-containing pathways by intraperitoneal injections of sodium selenite. *Neuroscience*. 38: 843-854.
- Slomianka, L. (1992) Neurons of origin of zinc-containing pathways and the distribution of zinc-containing boutons in the hippocampal region of the rat. *Neuroscience*. 48: 325-352.
- Snyder, S. and D' Amato, R. (1986) MPTP: a neurotoxin relevant to the pathophysiology of Parkinson's disease. *Neurology*. 36: 250-258.
- Sofic, E., Lange, K., Jellinger, K. and Riederer, P. (1992) Reduced and oxidized glutathione in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease. *Neuros. Lett.* 142: 128-230.
- Sorensen, J., Mattson, B., Andreasen, A. and Johansson, B. (1998) Rapid disappearance of zinc positive terminals in focal brain ischemia. *Brain Res.* 812: 265-269.
- Stengaard-Pedersen, K., Fredens, K. and Larsson, L. (1981) Inhibition of opiate receptor binding by zinc ions: possible physiological importance in the hippocampus. *Peptides*. 2(suppl. 1): 27-35.
- Swerdel, M. and Cousins, R. (1982) Induction of kidney metallothionein and metallothionein messenger RNA by zinc and cadmium. *J. Nutr.* 112: 801-809.
- Takakubo, F., Yamamoto, M., Ogawa, N., Yamashita, Y., Mizuno, Y. and Kondo, I. (1996) Genetic association between cytochrome P450IA1 gene and susceptibility to Parkinson's disease. *J. Neural Trans. Gen. Sec.* 103: 843-849.
- Takeda, A., Sawashita, J. and Okada, S. (1994 a) Localization in the rat brain of the trace metals, zinc and manganese, after intracerebroventricular injection. *Brain Res.* 658: 252-254.
- Takeda, A., Akiyama, T., Sawashita, J. and Okada, S. (1994 b) Brain uptake of trace metals, zinc and manganese in rats. *Brain Res.* 640: 341-344.
- Takeda, A., Sawashita, J., Takefuta, S. and Okada, S. (1998) Distribution of zinc in the substantia nigra of rats treated with 6-hydroxydopamine. *Biol. Trace Element Res.* 61: 71-78.
- Takeda, A. (2000) Movement of zinc and its functional significance in the brain. *Brain Res. Rev.* 34: 137-148.
- Thiffault, C., Aumont, T., Quirion, R. and Poirier, J. (1995) Effect of MPTP and L-deprenyl on antioxidant enzymes and lipid peroxidation levels in mouse brain. *J. Neurochem.* 65: 2725-2733.
- Tipton, K. and Singer, T. (1993) Advances in our understanding of the mechanism of the neurotoxicity of MPTP and related compounds. *J. Neurochem.* 61: 1191-1206.

Turner, B. and Zimmer, J. (1984) The architecture and some of the interconnections of the rat's amygdala and lateral periallocortex. *J. Comp. Neurol.* 227: 540-557.

Turski, L., Bressler, K., Retting, K., Löschmann, P. and Wachtel, H. (1991) Protection of substantia nigra from MPP⁺ neurotoxicity by N-methyl-D-aspartate antagonists. *Nature.* 349: 414-418.

Uchida, Y., Takio, K., Titani, K., Ihara, Y. and Tomonaga, M. (1991) The growth inhibitory factor that is deficient in the alzheimer's disease brain is a 68 amino acid metallothionein-like protein. *Neuron.* 7: 337-347.

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

Vallee, B.L. (1995) The function of metallothionein. *Neurochem. Int.* 27: 23-33.

Vincent, S. and Semba, K. (1989) A heavy metal marker of the developing striatal mosaic. *Brain Res. Dev.* 45: 155-159.

Wallwork, J. (1987) Zinc and the central nervous system. *Prog. Food Nutr. Sci.* 11: 203-247.

Wenzel, J.H., Cole, B.T., Born, E.D., Schwartzkroin, A.P. and Palmiter, D.R. (1997) Ultrastructural localization of zinc transporter-3 (ZnT-3) to synaptic vesicle membranes within mossy fiber boutons in the hippocampus of mouse and monkey. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 12676-12681.

Yamamoto, M., Kondo, I., Ogawa, N., Asanuma, M., Yamashita, Y. and Mizuno, Y. (1997) Genetic association between susceptibility to Parkinson's disease and alpha 1-antichymotrypsin polymorphism. *Brain Res.* 759: 153-155.

Yousef, M., El-Hendy, H., El-Demerdash, F. and Elagamy E. (2002) Dietary zinc deficiency induced-changes in the activity of enzymes and the levels of free radicals, lipids and protein electrophoretic behavior in growing rats. *Toxicology.* 175: 223-234.

Zang, L. and Misra, H. (1993) Generation of reactive oxygen species during the monoamine oxidase-catalyzed oxidation of the neurotoxicant, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *J. Biol. Chem.* 268: 16504-16512.

Zigmond, M. and Stricker, E. (1984) Parkinson's disease: studies with an animal model. *Life Sci.* 35: 5-18.