

00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)
FACULTAD DE CIENCIAS**

**RESCATE DE CÉLULAS CATECOLAMINÉRGICAS POR ESTRÉS
OXIDATIVO INDUCIDO POR LA LEVODOPA IN VITRO CON
AGENTES ANTIOXIDANTES Y/O NEUROPROTECTORES**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
P R E S E N T A
BIÓLOGO. ALBERTO HERNÁNDEZ PEÑALOZA

TUTOR ACADÉMICO: DRA. EN C. LIMEI ZHANG



MÉXICO, D.F.

COORDINACIÓN

ABRIL 2005

m343235



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: ALBERTO HERNÁNDEZ PEÑALOZA

FECHA: 11/10/05

FIRMA: [Firma manuscrita]

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 14 de febrero del 2005, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del(a) alumno(a) **Hernández Peñaloza Alberto** con número de cuenta **84275620** y con número de expediente **3991145**, con la tesis titulada: **"Rescate de Células catecolaminérgicas por estrés Oxidativo inducido por levodopa in vitro con agentes anti-oxidantes y/o neuroprotectores"**, bajo la dirección del(a) **Dra. Limei Zhang Ji**.

Presidente:	Dr. Moisés Selman Lama
Vocal:	Dra. Sylvia Leticia Verdugo Díaz
Secretario:	Dra. Limei Zhang Ji
Suplente:	Dr. María Rosa Ávila Costa
Suplente:	Dra. Ingeborg Dorotea Becker Fauser

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a, 28 de marzo del 2005

[Firma manuscrita]
Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

AGRDECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y a la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM, por el otorgamiento de las becas para realizar los estudios de Maestría en Ciencias Biológicas, en la Facultad de Ciencias durante el periodo: septiembre/1998 a agosto/2000, con el registro 130060.

A los miembros de mi Comité Tutoral por su apoyo: Dr. Moisés Selman Lama, Dra: Ingeborg Dorothea Becker Fauser y Dra: Limei Zhang Ji. También expreso mi más sincero agradecimiento al Dr. Andrés Eliú Castell Rodríguez por su apoyo y su amistad.

Al Colegio de Ciencias y Humanidades, Plantel Naucalpan y en especial a la Directora: Angélica Galnares Campos por su apoyo.

A los miembros del laboratorio: Dra Limei Zhang Ji, Dr. Alejandro Corona Morales, Dr. Carlos Alberto Galindo Rosete, QFB. Paula Leticia Noguez Garrido por su apoyo y discusiones académicas durante el desarrollo de la presente tesis.

A Li, Andrés, Alejandro, Carlos, Paula, Felipe, Leyla por su amistad.

A mis amigos del Colegio: Leticia, Rocío, María Elena, Dulce, José, Eva (mi tía)

A mis padres y hermanas por su dirección y apoyo. **Gracias**

ALBERTO.

Índice

Resumen	4
Abreviaturas	5
1. Introducción	6
1.1 Generalidades	6
1.1.1. Las catecolaminas y la enfermedad de Parkinson	6
1.1.1.1. La biosíntesis de las catecolaminas	6
1.1.1.2 La deficiencia de la dopamina y la enfermedad de Parkinson	10
1.1.2. La levodopa y el estrés oxidativo	13
1.1.2.1 La Levodopa en la EP	14
1.1.2.2 La toxicidad de levodopa y el estrés oxidativo	17
1.1.2.3 Antioxidantes	21
1.2 Antecedentes directos	24
1.2.1 Células cromafines de la médula suprarrenal y transplante neural	24
1.2.2 Muerte de las células cromafines inducida por la levodopa y uso de los antioxidantes.	27
1.2.3 Taurina y diltiazém: antioxidantes y/o neuroprotectores?	31
1.2.4 La taurina	32
1.2.4 El diltiazem	35
2. Planteamiento del problema	38
3. Hipótesis	39
4. Objetivos	40
5. Diseño experimental	41
6. Material y métodos	42
7. Resultados	50
8. Discusión y conclusiones	55
9. Referencias	58

Resumen

La Enfermedad de Parkinson (EP) es un desorden neurodegenerativo que se caracteriza por la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la Sustancia Negra *pars compacta*, lo que resulta en una reducción de la dopamina en el estriado (núcleo caudado y putamen de los ganglios basales). En la actualidad, el tratamiento más común para esta enfermedad está basado en la estrategia de reposición de la dopamina usando el precursor L-DOPA. La L-DOPA ha mejorado dramáticamente la morbilidad y la mortalidad en la EP. Sin embargo, el tratamiento prolongado con dicho fármaco trae consigo efectos colaterales como movimientos involuntarios (disquinesia) y problemas neuropsiquiátricos, entre otros.

Se conoce actualmente que la L-DOPA es tóxica en diversos sistemas celulares en cultivo y en ciertas circunstancias *in vivo*; además, la toxicidad de la L-DOPA se ha podido prevenir con el uso de antioxidantes.

El presente estudio tiene el objetivo de conocer si las sustancias químicas Diltiazem y Taurina podrían funcionar como agentes anti-oxidantes que contrarresten la toxicidad inducida por la L-DOPA

Para determinar este objetivo, se realizaron estudios *in vitro* de células cromafines de medula suprarrenal expuestas a concentraciones clínicas de L-DOPA. Se obtuvo tejido medular suprarrenal de ratas Wistar de uno a tres días de edad el cual se cultivó por 15 días. Los cultivos se dividieron en siete grupos experimentales: Control, control de diltiazem, control con taurina, L-DOPA y L-DOPA con diltiazem, L-DOPA con taurina, L-DOPA con taurina y diltiazem. En este modelo de toxicidad por estrés oxidativo, se estudiaron los aspectos de: sobrevivencia celular (prueba de MTT), toxicidad de L-DOPA, caracterización de la muerte celular apoptótica y la prevención de toxicidad por antioxidantes.

Los resultados del modelo indican:

- La L-DOPA a dosis equivalentes a las clínicas induce la muerte de las células cromafines.
- La muerte celular fue de tipo apoptótica, en donde las células cromafines muestran gran vulnerabilidad.
- Los antioxidantes (Taurina y Diltiazem) fueron capaces de revertir el daño.

Abreviaturas

Ad:	Adrenalina
BHE	Barrera Hematoencefálica
DA:	Dopamina
DAAA	Desacarboxilasa de aminoácidos aromáticos
DAQ	Dopamina Quinona
DIV:	días <i>in vitro</i>
DBH:	dopamina β - hidroxilasa
DDC:	DOPA descarboxilasa
EP:	Epinefrina
GSH	Glutación
GSHPx	Glutación Peroxidasa
MPTP:	N - metil- 4 - fenil-1, 2, 3, 6 – tetrahidropiridina.
MAO	Monoamina oxidasa
NA:	Noradrenalina
NE:	Norepinefrina
NGF:	Factor de crecimiento neural (<i>Nerve Growth Factor</i>)
PNMT:	Feniletanolamina – N – metiltransferasa
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
SN:	<i>Sustantia Nigra</i>
SNpc:	<i>Sustantia Nigra pars compact</i>
SNC:	Sistema nervioso central
SOD	Superóxido dismutasa
TH:	Tirosina hidroxilasa

1. Introducción

1.1. Generalidades

1.1.1. Las catecolaminas

Las catecolaminas: dopamina (DA), noradrenalina (NA) y adrenalina (Ad), son hormonas y/o neurotransmisores clásicos en el sistema nervioso tanto central como periférico (Molinoff y Arelrod, 1971; Goldstein, Eisenhofer y McCarty, 1998). La NA es un neurotransmisor en el Sistema Nervioso Central (SNC) y también en el sistema simpático post-ganglionar. La DA, el precursor de la NA, tiene acciones biológicas en la periferia, particularmente en el riñón, y sirve como neurotransmisor en diversas vías en el SNC. La adrenalina, formada por la *N*-metilación de la NA, es una hormona liberada desde las células cromafines de la médula suprarrenal y estimulan los receptores catecolaminérgicos de varios órganos. También se han encontrado pequeñas cantidades de la adrenalina en el SNC, particularmente en el tallo cerebral.

1.1.1.1. La biosíntesis de las catecolaminas

Los procesos enzimáticos involucrados en la formación de las catecolaminas han sido caracterizados. La Fig. 1. muestra la vía de la biosíntesis para las catecolaminas. Los componentes enzimáticos de la vía han sido purificados, lo que ha permitido el análisis de su cinética, su especificidad de sustratos, sus requerimientos de co-factores y el desarrollo de inhibidores. Con los ratones *knockout*, se pudo demostrar claramente la importancia de estas enzimas porque la ausencia de algunas de ellas, por lo menos, afecta la viabilidad (Tabla 1.1).

La tirosina hidroxilasa es la enzima limitante para la biosíntesis de las catecolaminas

La enzima tirosina hidroxilasa (TH) se encuentra en todas la células que sintetizan las catecolaminas. Esta enzima es una oxidasa con función mixta que usa moléculas de oxígeno

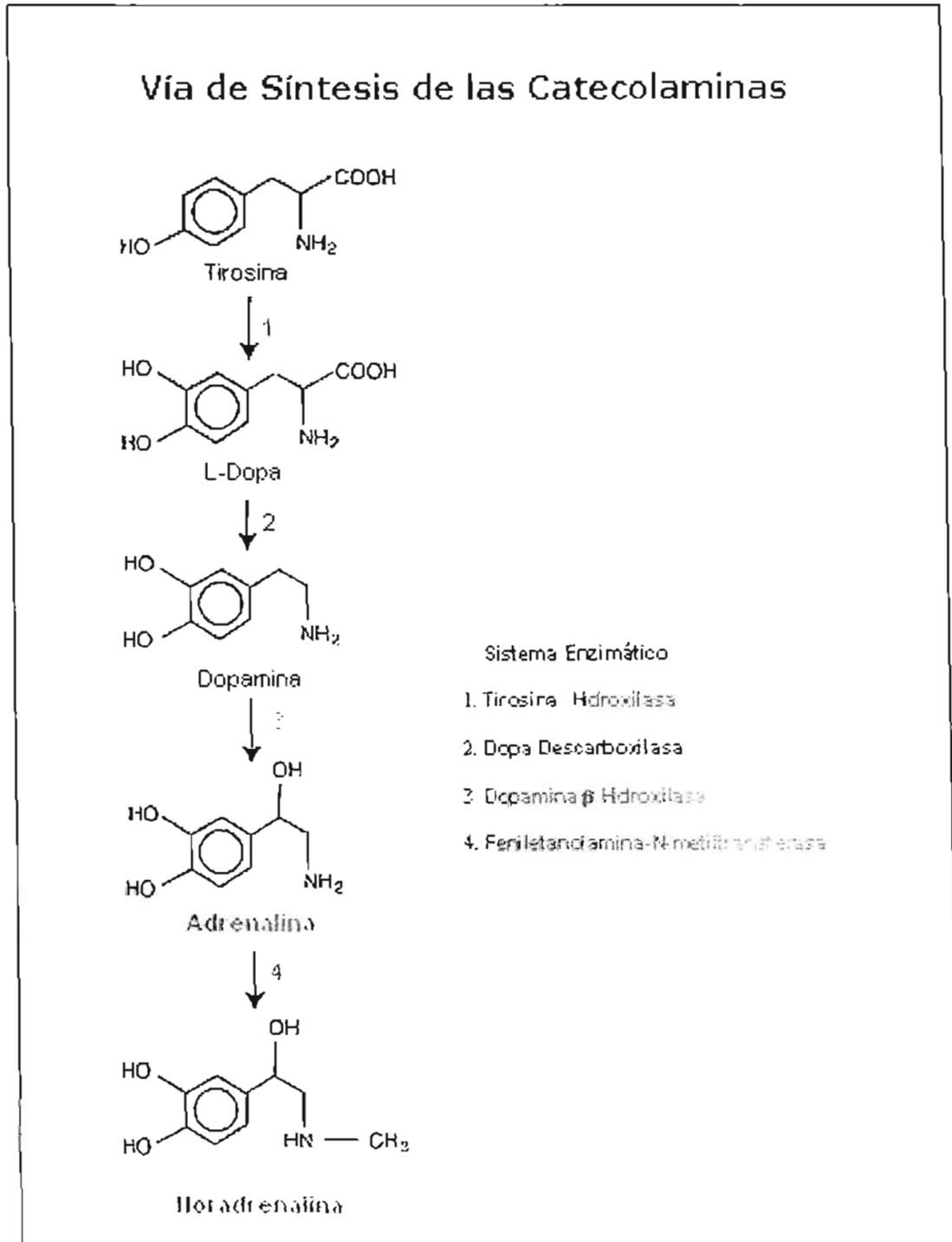


Fig. 1. Vía de la biosíntesis de las catecolaminas

Tabla 1.1: Efecto de la carencia de los componentes de las vías de las catecolaminas: estudio en ratones *knockout*.

Tabla tomada de Kuhar, Couceyro y Lambert 1998.

Tipo de enzima que carece	Resultado
Tirosina hidroxilasa (TH)	No viable
Dopamina hidroxilasa	No viable
Transportador de dopamina	Hiperlocomoción. Pierden efecto la N-metil-4-fenil-1,2,3,6 – tetrahidropiridina (MPTP) o psicoestimulantes.
Transportador vesicular	No viable
Receptor α_{2B} adrenérgico	Aparentemente normal
Receptor β_1 adrenérgico	Muerte prenatal en la mayoría de los casos, los sobrevivientes tienen alteraciones cardiovasculares.
Receptor β_3 adrenérgico	Concentraciones de la leptina y la insulina alteradas en tratamientos con agonistas.
Receptor de dopamina D1	Carencia de respuestas a agonistas, hiperlocomoción y péptidos estriatales alterados.
Receptor de dopamina D2	Disfunción motora
Receptor de dopamina D3	Hiperlocomoción

y tirosina como sustratos y biopterina como su co-factor (Shiman, Akino y Kaufman, 1971). La TH es un homotetrámero. Cada una de las subunidades tiene un peso molecular de aproximadamente 60,000 kDa. La TH cataliza la adición de un grupo hidroxilo a la posición meta de la tirosina formando 3, 4-dihidroxi-L-fenilalanina (L-DOPA). La TH también puede hidroxilar la fenilalanina para formar tirosina y posteriormente se convierte en levodopa. La TH es una enzima soluble y se encuentra principalmente en el citoplasma.

La DOPA descarboxilasa lleva a cabo la reacción para quitar el grupo carboxilo de la DOPA para formar la dopamina

La DOPA descarboxilasa (DDC) es una enzima dependiente de la piridoxina que tiene una baja K_m y un alto V_{max} comparado con la levodopa. La levodopa endógena se convierte eficientemente a la DA (Christenson, Dairman y Udenfriend, 1970). La DDC puede descarboxilar a la 5-hidroxitriptófano, un precursor de la serotonina. También puede descarboxilar otros aminoácidos aromáticos. Por lo tanto, se le llama también como descarboxilasa de aminoácidos aromáticos. La DDC se distribuye ampliamente en todo el organismo – se encuentra tanto en las neuronas catecolaminérgicas y serotoninérgicas - como en tejidos no neurales, como el riñón y vasos sanguíneos. En las neuronas dopaminérgicas, esta enzima es el paso final de la vía.

Para las neuronas que sintetiza adrenalina o noradrenalina, la dopamina β -hidroxilasa es el siguiente paso de la vía de la biosíntesis

Como la TH, la dopamina β – hidroxilasa (DBH) es una oxidasa de función mixta que usa oxígeno molecular para formar el grupo hidroxilo adicionando al carbón β de la cadena lateral de DA (Craine, Daniels y Kaufman, 1971). El ascorbato, reducido a dihidroascorbato durante la reacción, provee una fuente de electrones. La DBH contiene Cu^{2+} que está involucrado en la transferencia de electrones en la reacción. Los quelantes de Cu^{2+} , como el dietilditiocarbamato, son inhibidores potentes de la enzima. La enzima se concentra dentro de las vesículas que almacenan las catecolaminas, la mayoría de la molécula proteica está ligada a la superficie interna de la membrana vesicular mientras una pequeña parte está libre dentro de las vesículas. La DBH se libera junto con las catecolaminas desde las terminales nerviosas y desde la médula de la glándula suprarrenal. La DBH se encuentra en el plasma.

Las células que sintetizan la adrenalina, el paso final de la vía, es catalizada por la enzima feniletanolamina – N – metiltransferasa (PNMT)

Esta enzima se encuentra en un pequeño grupo de neuronas del tallo cerebral que usa la adrenalina como su principal neurotransmisor y en la médula suprarrenal en donde la adrenalina es la neurohormona primaria. La Feniletanolamina-N-metiltransferasa PNMT transfiere un grupo metilado de la S-adenosilmetionina al nitrógeno de la noradrenalina formando una amina secundaria (Connett y Kirshner, 1970). La actividad de la PNMT está regula por corticosteroides.

1.1.2 La deficiencia de la dopamina y la enfermedad de Parkinson

1.1.1.2 La dopamina

La 3, 4-dihidroxifenetilamina (dopamina, DA) fue por primera vez sintetizada en 1910. Pero en contraste con los demás miembros de las catecolaminas (adrenalina y noradrenalina), poca atención se prestó a esta monoamina durante muchos años. Se pensó que la dopamina era simplemente un producto intermedio de la síntesis de noradrenalina. Sin embargo, se observó en los años posteriores que la DA es un neurotransmisor prominente en el cerebro con muchas funciones potenciales y de amplia distribución. La DA, se encuentra enriquecida en la *sustantia nigra* (SN) del mesencéfalo y en el estriado, mientras la noradrenalina es ausente en estas regiones cerebrales. La distribución diferencial de la DA sugirió que por lo menos tenía alguna función específica en los procesos de neuroregulación.

Con respecto al sistema nervioso periférico, la DA fue considerada como un precursor de las otras catecolaminas durante mucho tiempo. Sin embargo, las neuronas dopaminérgicas

fueron encontradas por Bell (1989) en el sistema nervioso periférico. Por lo tanto, la DA también se considera como neurotransmisor del sistema nervioso periférico.

Desde el punto de vista clínico, el sistema de neurotransmisión dopaminérgico ha llamado la atención en la investigación biomédica, ya que esta monoamina está involucrada en varios trastornos cerebrales tales como la enfermedad de Parkinson (EP), la enfermedad de Alzheimer y la esquizofrenia.

1.1.1.2. La enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) fue inicialmente descrita por James Parkinson, médico inglés, en 1817, como "parálisis agitante". La EP es un trastorno neurodegenerativo progresivo que se manifiesta principalmente como alteraciones motoras. El nombre original, "parálisis agitante", se refiere a un tipo de temblor de frecuencia baja que es normalmente más prominente en brazos y manos, pero también se puede observar en piernas, boca y mandíbula. Además del temblor, hay otros tres síntomas típicos de esta enfermedad: rigidez, inestabilidad postural y bradicinesia (lentitud o pérdida de movimiento). Aunque el temblor es el síntoma más frecuente, la bradicinesia es normalmente la manifestación más discapacitante de la enfermedad.

En autopsias del tejido cerebral de los pacientes con la EP se ha observado una pérdida de neuronas en una región específica del sistema nervioso: la *substantia nigra pars compacta* (SNpc) (Fig. 2). La SNpc se localiza en el mesencéfalo ventral y es llamada así debido a la acumulación de un pigmento llamado neuromelanina. La SNpc se oscurece conforme aumenta la edad del individuo. En pacientes con la EP, se observa una despigmentación de esta zona. Los

estudios anatómicos con técnicas de inmunocitoquímica muestran una disminución marcada del número de neuronas que contienen la dopamina. Otra

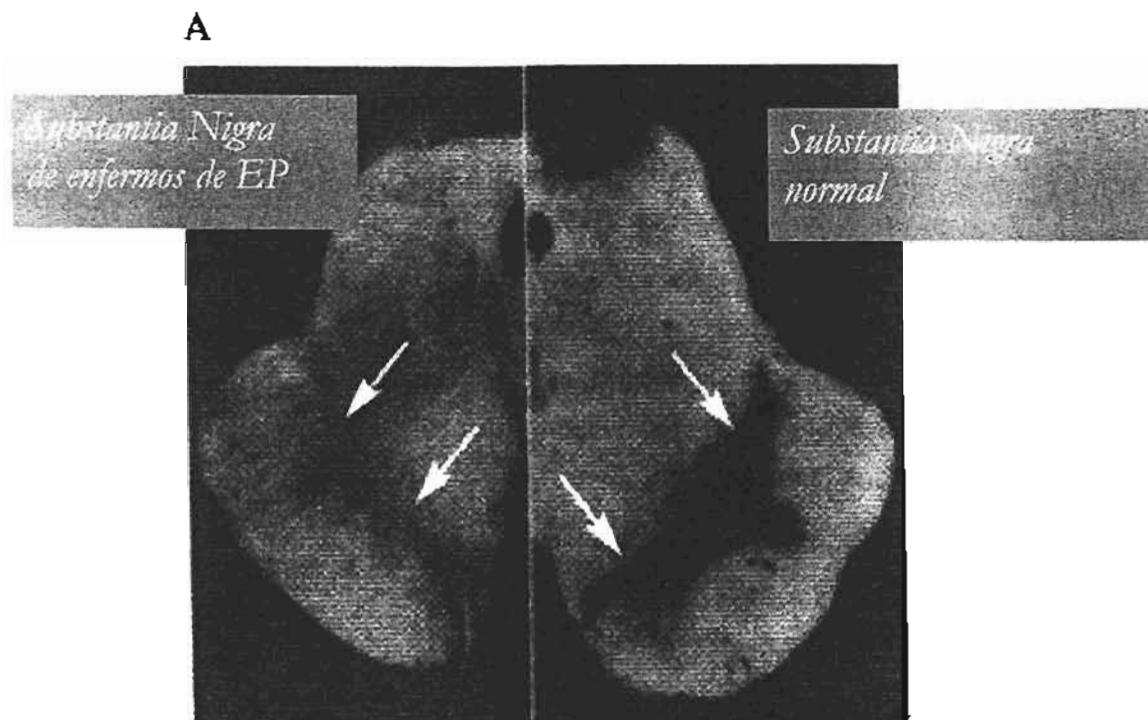


Fig. 2. Fotografía de cortes anatomopatológicos de la Substantia Negra (SN). Izquierda: SN de un enfermo de Parkinson. Derecha: SN normal. Flechas indican la SN. (Foto modificada de M Bear, 2002, *Neuroscience exploring the brain* (Purves *et. al.* 1997).

característica importante es la presencia de un tipo de inclusión citoplasmática conocida como cuerpos de Lewy, nombre del patólogo que los descubrió y describió por primera vez, dentro de la neuronas dopaminérgicas sobrevivientes (Fig. 3). Estas inclusiones tienen forma circular y se sitúan dentro de las neuronas. Tienen un centro y una periferia más claros y por lo menos están parcialmente compuestos de neurofilamentos. Son inmunorreactivos a α -sinucleína y ubiquitina. La última se ha considerado como la vía bioquímica que dispara la degradación. En pacientes con EP, los cuerpos de Lewy se observan también en otras regiones cerebrales, tales como: locus ceruleus, los núcleos de rafé, hipocampo, amígdala, y la neocorteza.

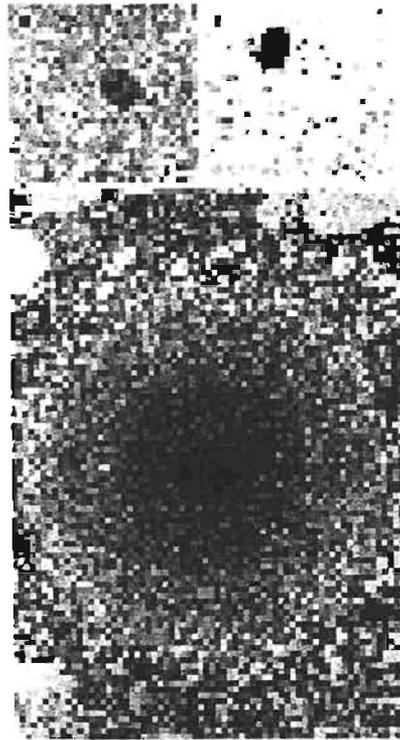


Fig. 3. Microfotografía de cuerpos de Lewy, característica anatomopatológica de la EP. Estos cuerpos son pequeñas inclusiones citoplasmáticas de forma esférica que tienen un centro granular denso rodeado de un halo de filamentos radiantes. Estos cuerpos son inmunorreactivos a α -sinucleína y ubiquitina. Panel superior izquierdo: tinción con hematoxilina. Panel superior derecho: inmunocitoquímica contra α -sinucleína. Panel inferior: foto de microscopía electrónica de transmisión de un cuerpo de Levi. (Fig. modificada de Beal MF, Nat Rev Neurosci, 2001).

Aunque la EP involucra degeneración en varias regiones del SNC, el grado de la degeneración en la SNpc es directamente proporcional al trastorno motor. Por lo tanto, se considera que la EP es primariamente debida a la degeneración de la SNpc.

1.1.2. La levodopa y el estrés oxidativo

1.1.2.1 La Levodopa en la EP

La introducción de la Levodopa (L-3,4-dihidroxifenilalanina o levodopa) hace más de 40 años revolucionó el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, y desde entonces continúa siendo la terapia sintomatológica más efectiva. Los pasos que llevaron a su descubrimiento llaman la atención y merecen una breve revisión.

Después de su aislamiento a partir de las legumbres en 1913, a la Levodopa se le declaró como una sustancia biológicamente inactiva. Sin embargo, poco después, dos estudios en conejos probaron que la Levodopa tenía un efecto notorio sobre el metabolismo de la glucosa (produciendo una marcada hiperglucemia) y sobre la presión arterial. El interés en la Levodopa aumentó más aún con el descubrimiento, en 1938, de la enzima Levodopa descarboxilasa y la demostración de que en animales y humanos la Levodopa es convertida enzimáticamente en DA. Este descubrimiento desencadenó en la década de los 40 un gran número de investigaciones tanto en animales como en seres humanos, principalmente sobre el papel vasopresor de la Levodopa y la DA. Una década después, continuó el interés por la Levodopa, pero ahora el enfoque fue diferente: su papel como reemplazo potencial en experimentos donde se indujo una depleción periférica y cerebral de catecolaminas (por medio de insulina o reserpina), y el probable reestablecimiento de la función normal.

Fue durante este mismo periodo que surgieron otros descubrimientos fundamentales: la Levodopa revertía el estado de “tranquilidad” inducido por la reserpina y el producto de su descarboxilación; la DA, se encontraba en altas concentraciones en el cerebro de mamíferos, con una localización principalmente en los ganglios basales. Fueron estas observaciones las que

dictaron el comienzo de las investigaciones sobre la DA y la EP. En 1960, vino el descubrimiento de que en cerebros de pacientes con Parkinson había una dramática deficiencia de DA y un año después se demostró el gran efecto terapéutico de la Levodopa para tales pacientes.

En 1967, la terapia crónica oral con altas dosis de Levodopa se introdujo a la práctica clínica. A pesar de la incertidumbre inicial en referencia a los mecanismos de acción de la Levodopa en la EP, ahora se ha convertido en un ejemplo clásico de terapia de reemplazamiento de neurotransmisor en el sistema nervioso (Homykiewicz, 2002).

La Levodopa administrada oralmente es absorbida en el intestino, pasando por la circulación hepática para posteriormente mediante la circulación sanguínea llegue al cerebro. En esta vía existe una actividad importante de la enzima que transforma la Levodopa en DA, la descarboxilasa de los aminoácidos aromáticos (DAAA), la cual actúa principalmente en la pared intestinal, el hígado, los riñones y el endotelio capilar cerebral; formando la DA, la cual no entra al cerebro.

La razón por la cual se administra al paciente de Parkinson Levodopa y no la propia dopamina es que esta última molécula no puede atravesar la barrera hematoencefálica (BHE), mientras que la primera sí. Se demostró por estudios bioquímicos y conductuales que la Levodopa entra al cerebro y es descarboxilada a DA. Sin embargo, en un inicio, el reemplazo de DA con Levodopa se vio fuertemente limitado, debido a sus efectos colaterales por las altas dosis necesarias para disminuir los síntomas de la enfermedad. Entre estos efectos se presenta náusea y vómito, principalmente. El descubrimiento del inhibidor de la descarboxilasa, benserazida, resultó extremadamente útil en el tratamiento del Parkinson, ya que la consecuencia inmediata fue que permitió bajar gradualmente las dosis de Levodopa y lograr el mejoramiento de los

síntomas sin su pérdida de eficacia y, aún más importante, sin sus efectos colaterales (Cotzias GC, 1969). De este modo, benserazida y carbidopa (el más empleado actualmente) se pueden administrar en dosis que afectan solamente a la DAAA extracerebral (Yahr MD, 1972). Así, una vez que la Levodopa ha atravesado la BHE por transporte activo, es descarboxilada por la DAAA que se encuentra en las neuronas dopaminérgicas del estriado (en todos los casos *postmortem*, siempre se ha visto que al menos queda un residuo de la actividad de DAAA en el estriado). También se ha propuesto que la Levodopa pudiese ser descarboxilada en otros tipos neuronales, como en las terminales serotoninérgicas que llegan desde el núcleo del rafe. El hecho es que los enfermos de Parkinson no tratados presentan niveles elevados de los receptores D₂ en el estriado, reflejando un estado de supersensibilidad, cuyo significado fisiológico es que se obtiene una respuesta con bajas concentraciones de DA, y el tratamiento con Levodopa produce una disminución de la densidad de los receptores D₂ a niveles semejantes al tejido normal.

La gran mayoría de los pacientes de Parkinson que comienzan la terapia con Levodopa experimentan un beneficio muy notable en la disminución de los síntomas. Cuando se administra oralmente, menos del 1% de la Levodopa cruza la BHE. Sin embargo, como mencionado anteriormente, la Levodopa se administra con carbidopa. La carbidopa es incapaz de atravesar la BHE, por lo que no afecta el metabolismo de la Levodopa en el sistema nervioso central. Debido a que la inhibición de la descarboxilación se limita a la periferia, la administración de Levodopa/carbidopa produce que aproximadamente el 5%-10% de la Levodopa administrada llegue al cerebro.

Sin embargo, la eficacia de la Levodopa en el tratamiento de la EP tiene sus desventajas. Aproximadamente el 15% de los pacientes tiene parkinsonismo atípico y no responden al tratamiento. Más importante aún, en pacientes que sí responden al fármaco, se observa que la

eficacia del medicamento disminuye con el tiempo y en consecuencia las complicaciones motoras de la enfermedad van apareciendo antes de la siguiente ingesta de la Levodopa. De esta manera, después de 2 a 5 años de tratamiento, hasta el 50% de los pacientes comienzan a experimentar fluctuaciones en su respuesta a la droga. Estas fluctuaciones es lo que se conoce como el efecto *on-off*. Además, el tiempo de mejoría de cada dosis se acorta (efecto *wearing off*) y los pacientes pueden experimentar oscilaciones que van desde una ascinesia intensa a discinesias, movimientos involuntarios asociados a los picos de la dosis de la Levodopa.

En resumen, durante los primeros años del tratamiento con Levodopa, la mejoría es significativa y con baja incidencia de discinesias. Pero conforme la enfermedad progresa y aumenta el grado de neurodegeneración en la SNpc, la respuesta del paciente al fármaco disminuye y la presentación de movimientos involuntarios aumenta.

1.1.2.2 La toxicidad de levodopa y el estrés oxidativo

Debido a que la EP es una enfermedad neurodegenerativa progresiva, se esperaría un empeoramiento del estado clínico si la etiología y patogénesis de la enfermedad no son alterados por la terapia. Desde hace algunos años, se acepta en general la hipótesis que señala que el estrés oxidativo contribuye a la degeneración de las neuronas dopaminérgicas en la EP. Este concepto ha llevado a la idea de que la Levodopa pudiese contribuir al empeoramiento de la EP al aumentar la degeneración de las células que quedan aún vivas. ¿Cómo podría contribuir la Levodopa? Una de las hipótesis es a través de la generación de radicales libres.

Como es bien sabido, las órbitas de electrones de la mayoría de las sustancias químicas contienen electrones apareados con *spin* opuesto. Los radicales libres son moléculas o fragmentos de moléculas que contienen electrones no apareados en sus orbitales mas externos. Debido a la

tendencia natural del apareamiento entre electrones, la presencia de estos radicales libres resulta en un estado en el cual el electrón no apareado busca el apareamiento. Por lo tanto, la gran mayoría de los radicales libres son altamente reactivos y por lo tanto, de vida media muy corta. En resumen, mientras que si una molécula es un ión depende del número de sus electrones en relación con su número de protones, todas las moléculas con electrones desapareados serán radicales libres, independiente del número de protones. Varias reacciones químicas se inician por la fisión de un enlace de 2 electrones. Entonces el número de electrones del enlace puede distribuirse simétricamente, produciendo radicales libres -ecuación I-, o distribuirse asimétricamente formando iones -ecuación II- (Fehér J, 1987).



En 1978, Graham y colaboradores demostraron que la Levodopa y la DA se degradan por autooxidación y forman una serie de compuestos químicos llamados quinonas y semiquinonas, muchas de las cuales son radicales libres (Graham, 1978). Más aún, la autooxidación genera peróxido de hidrógeno: $RH_2 + O_2 \longrightarrow R + H_2O_2$ y dos radicales altamente reactivos: el radical superóxido $O_2 + e \longrightarrow O_2^-$ y el radical hidroxilo a través de la reacción conocida como de Haber-Weiss: $H_2O_2 + O_2^- \longrightarrow OH\cdot + OH^- + O_2$.

Además, la oxidación enzimática de la DA a través de la MAO también lleva a la formación de H_2O_2 , que, como vimos anteriormente, si bien no es un radical libre, es el sustrato para la formación del radical hidroxilo.

Conociendo que la Levodopa y DA podrían promover un estado de estrés oxidativo (al menos bajo determinadas circunstancias), se llevaron a cabo varios experimentos para determinar si la Levodopa pudiese ocasionar un daño. Uno de los primeros experimentos se hizo en cultivo disociado de neuronas de mesencéfalo expuestas a Levodopa por dos días. Se observó una clara disminución en el número de neuronas catecolaminérgicas y una reducción en la longitud de las neuritas de aquellas que sobrevivieron. De manera interesante, se encontró que los niveles de GSH (glutatión), un antioxidante natural de las células, estaba elevado y la adición al medio de ácido ascórbico previno el aumento de GSH (Mytilineou C, 1993). Se ha demostrado en cultivo la toxicidad de la Levodopa sobre neuronas dopaminérgicas y otros tipos celulares (Olney JW, 1990; Steece-Collier K, 1990). Otro grupo de investigadores demostró que las células catecolaminérgicas son más susceptibles al daño por Levodopa que células no catecolaminérgicas *in vitro* (Pardo B, 1995).

En experimentos llevados a cabo con el objetivo de monitorear *in vivo* la producción de radicales hidroxilo en la SN debido al tratamiento de Levodopa, se observó que la Levodopa produjo un aumento dosis dependiente de radicales hidroxilo y que este aumento no se contrarrestó por la inhibición de la MAO, sugiriendo que después de una alta dosis de Levodopa, la DA formada por el catabolismo de la Levodopa puede exceder la capacidad de los mecanismos que reducen la formación de radicales libres o antioxidantes (Smith TS, 1994).

También se ha demostrado que tanto la Levodopa como la DA dañan al ADN tanto en la presencia de cobre como de H_2O_2 (Spencer JP, 1994). La exposición de Levodopa o de DA a cultivos celulares, sean de neuronas simpáticas (Ziv I, 1994), células PC12 (Walkinshaw G, 1995) o células cromafines (Corona-Morales A. A, 2000) producen muerte necrótica pero también apoptótica, observando después de un periodo corto de exposición a las drogas

alteraciones morfológicas típicas de apoptosis: desintegración axonal y contracción de neuritas, condensación del material nuclear, fragmentación del núcleo internucleosomal, evaginación de la membrana celular y contracción severa del citoplasma, siendo estas alteraciones más pronunciadas en células catecolaminérgicas.

De todos estos estudios surgió la idea de que la administración a largo plazo de Levodopa a pacientes con EP puede empeorar el daño neuronal y de esta manera acelerar el progreso de la enfermedad. Sin embargo, esta hipótesis ha quedado sólo en eso debido a falta de pruebas sólidas sobre la toxicidad de la Levodopa *in vivo*. Ha sido mostrado tanto en ratas (Perry TL, 1984) como en ratones (Hefti F, 1981) que la administración crónica de Levodopa no causa un daño detectable a las neuronas adrenérgicas de la SNpc. Tampoco se encontró daño alguno en la SNpc en un paciente normal que consumió Levodopa por un periodo extenso (Quinn N, 1986). Sin embargo, investigaciones posteriores con administración prolongada de Levodopa a animales con lesión de la vía nigroestriatal por la 6-hidroxidopamina proveen evidencia que muestra que la toxicidad del fármaco puede ocurrir *in vivo* (Ogawa N, 1994; Blunt SB, 1993).

Se ha sugerido que la paradoja entre las observaciones *in vitro* (toxicidad bien demostrada) y aquellas *in vivo* (no hay pruebas contundentes sobre tal toxicidad) se puede deber a que el mecanismo de muerte celular inducido por la Levodopa *in vivo* es apoptótico, y por lo tanto, muy difícil de detectar, ya que las células apoptóticas son rápidamente fagocitadas sin dejar huella y sin un daño al tejido vecino o inflamación (Walkinshaw G, 1995). Si este es el caso, el interés científico se expande y las consecuencias clínicas se dejan ver: dado que la muerte apoptótica es un fenómeno activo, ordenado y siguiendo un programa de la célula, tiene la posibilidad de ser manipulado o modulado.

1.1.2.3. Antioxidantes

Se puede definir a un antioxidante como cualquier sustancia que retarde o prevenga la oxidación de un sustrato cuando está presente en pequeñas cantidades en relación a la cantidad de sustrato. Se puede considerar que los antioxidantes pueden actuar en varios niveles de la secuencia oxidativa y que pueden tener múltiples mecanismos de acción (Halliwell B, 1989). Respecto a la peroxidación lipídica, cinco diferentes mecanismos de acción antioxidante pueden ocurrir:

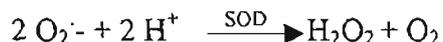
- 1) Disminuyendo las concentraciones de oxígeno
- 2) Previendo la iniciación de la reacción en cadena en los pasos iniciales.
- 3) Uniendo otras moléculas como iones metálicos para prevenir la generación de radicales.
- 4) Descomponiendo peróxidos de modo que no puedan ser reconvertidos a los radicales iniciales.
- 5) Rompiendo las reacciones en cadena, deteniendo la continua sustracción de iones de hidrógeno.

Se puede ver a la protección por antioxidantes como una secuencia de tres niveles de actividad de defensa, tomando en cuenta los cinco mecanismos mencionados. El primer nivel de defensa básicamente involucra la actividad de ciertas enzimas cuya actividad depende de minerales como manganeso, cobre, zinc y selenio y controla la formación y proliferación de radicales primarios derivados del oxígeno molecular. El segundo nivel tiene que ver con la prevención de la proliferación de radicales secundarios, productos de reacciones en cadena como en la peroxidación de lípidos e involucra a las vitaminas C y E y probablemente a los carotenoides. El último es la prevención enzimática de la formación de radicales secundarios y facilita la remoción de dichas moléculas en un ambiente en el cual reacciones catalizadas por

metales pueden causar mayor daño oxidativo. El mecanismo protector, visto desde un punto de vista general, depende del aporte de minerales y nutrientes específicos a partir de la dieta y por lo tanto es susceptible de quedar en un estado desventajoso debido a una falla en el aporte de uno o más nutrientes, a los que se les ha llamado nutrientes antioxidantes (Diplock A., 1994).

Las primeras moléculas reducidas derivadas de la adquisición de un electrón por el oxígeno son el radical O_2^- y H_2O_2 . La proliferación de otros radicales a partir de estos dos podría llevar a un daño el cual eventualmente puede producir un cambio patológico. Así, el primer nivel de defensa tratando de evitar tal daño involucra a las enzimas superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa.

Dos isoformas de superóxido dismutasa (SOD) pueden encontrarse en los tejidos de mamíferos, una dependiente de Cu/Zn en el citoplasma de la mayoría de las células y otra dependiente de Mn presente en las mitocondrias. Ambas catalizan específicamente la siguiente reacción:



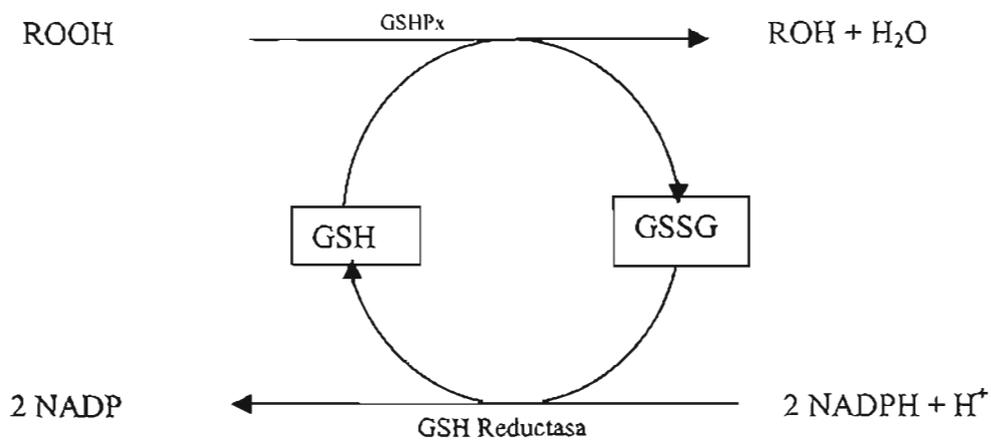
Así, la distribución universal de la SOD en los tejidos animales implica un papel fundamental en el control de la generación de radicales derivados de oxígeno (Diplock A., 1994).

El citoplasma de las células de los mamíferos es protegida del daño oxidativo causado por el H_2O_2 por la catalasa y la glutatión peroxidasa (GSHPx). La catalasa está presente en la mayoría de las células aeróbicas y se ubica en los peroxisomas (Heistad D. D, 1979). La reacción general que cataliza es la siguiente:



La catalasa contiene 4 subunidades proteicas que contienen cada una un grupo hemo dentro del sitio activo. Con la actividad de esta enzima, se evita que el H_2O_2 pueda ser reducido al radical hidroxilo.

El descubrimiento de la enzima GSHPx explicó por primera vez en términos bioquímicos el papel nutricional del selenio en los animales. En general, la enzima funciona dentro de un ciclo con la glutatión reductasa la cual emplea equivalentes reductores derivados de la glucosa a través de la vía de las pentosas:



La enzima no contiene ningún grupo hemo ni metal alguno, y la localización del selenio se encuentra en un residuo de selenocisteína (Mezzetti A, 1992).

1.2 Antecedentes directos

1.2.1 Células cromafines de la médula suprarrenal y trasplante neural

Antes de introducir los aspectos anatomofuncionales de las células cromafines de la médula suprarrenal, quisiera hablar brevemente sobre la terapia celular para las enfermedades neurodegenerativas, en particular, para la EP.

Como indica el nombre, la terapia celular se basa en trasplantar células que eventualmente puedan suplir la función de las degeneradas, en caso de la EP, las neuronas dopaminérgicas de la SNpc. Esta terapia se ha desarrollado desde hace más de 30 años con un marco conceptual relativamente simple: si la EP es primariamente atribuida a la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, y como consecuencia, una pérdida de la inervación dopaminérgica al neostriado, el reemplazamiento por trasplante de células secretora de dopamina podría recuperar la deficiencia motora asociada. A continuación se enlistan las principales estrategias de la terapia celular para la EP:

- Que las células transplantadas liberen neurotransmisores deseados al nivel sináptico.
- Que las células transplantadas liberen neurotransmisores deseados al espacio extracelular.
- Que las células transplantadas liberen factores de crecimientos apropiados.
- Que las células transplantadas liberen proteínas de superficie o de matriz extracelular apropiadas para la sobrevivencia y crecimiento de las neuronas indispensables.
- Que las células transplantadas suplan substratos para la síntesis del químico faltante.
- Que las células transplantadas sirvan como substrato para los procesos de crecimiento.

- Que las células transplantadas ayuden a la remielinización.

Para la EP, ha habido dos procedimientos que han sido explorados con cierta profundidad, incluyendo pruebas en pacientes. Estos son: 1) trasplante de células cromafines de la médula suprarrenal, obtenidos de donadores adultos (incluyendo autotrasplante), y 2) trasplante de neuronas dopaminérgicas obtenidos de SN de donadores fetales.

Por razones diversas, hemos concentrado nuestra investigación en el primer procedimiento.

Las células cromafines de la médula suprarrenal

El tipo celular principal de la médula suprarrenal es la célula cromafín que normalmente secreta las hormonas adrenalina (o epinefrina) y/o noradrenalina (o norepinefrina) hacia la circulación sistémica.

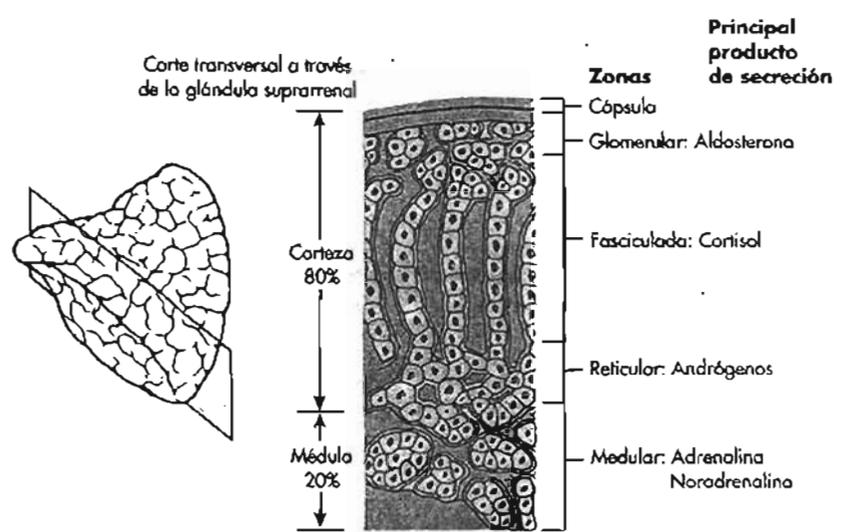


Fig. 4 Anatomía de la glándula suprarrenal. Berne R. (2001).

Las células cromafines suprarrenales representan neuronas postganglionicas del sistema nervioso autónomo y son miembros del linaje simpatoadrenal que derivan de la cresta neural durante el desarrollo. Aunque son de naturaleza endocrina *in situ*, estas células desarrollan un fenotipo neural en cultivo en presencia de factores de neurotróficos, especialmente el factor de crecimiento neural (NGF) (Fig. 5). Estas características incluyen una elongación del soma, cambios de la apariencia de las vesículas secretoras de centro denso, y extensión de procesos neuríticos. (Doupe et al, 1985 a, b; Notter et al 1986; Tischler et al, 1980; Unsicker et al, 1985).

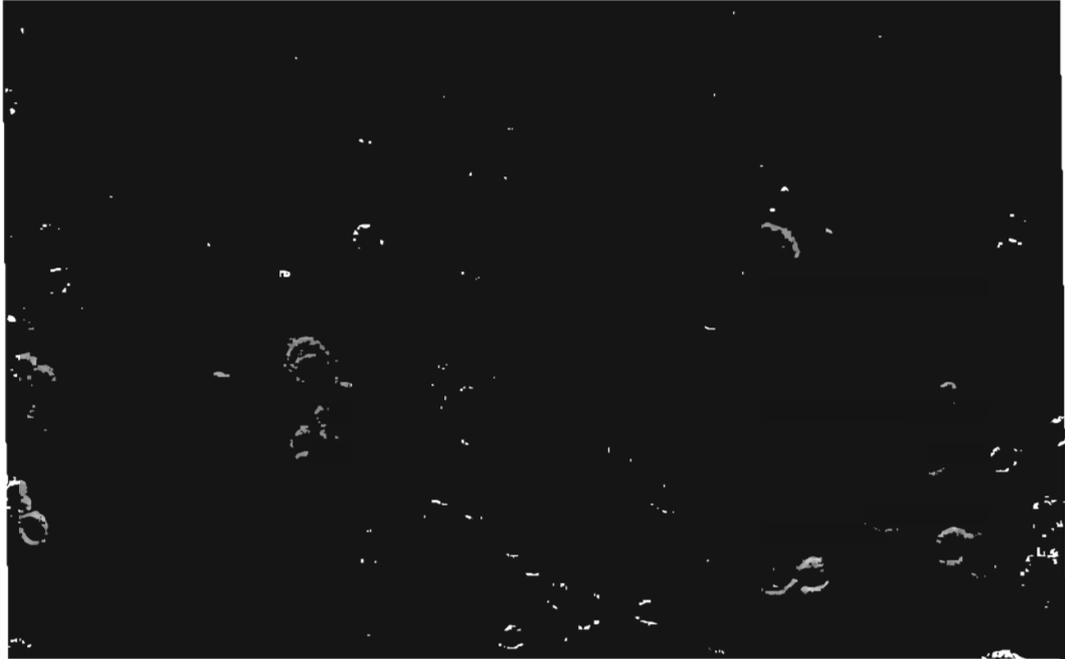


Fig. 5 Cultivo disociado de células cromafines en presencia de factor de crecimiento neural (NGF) 7 DVL (Archivo del laboratorio a cargo de la Dra. L. Zhang).

Una vez que se elimina la influencia de los glucocorticoides suprarrenales, las células cromafines *in vitro* alteran su morfología hacia un fenotipo neural. Consecuentemente, las células cromafines han sido consideradas como candidatas para la terapia celular para la EP (Madrado I., Drucker-Colin R, 1987).

1.2.2 Muerte de las células cromafines inducida por la levodopa y uso de los antioxidantes.

El trasplante de las células cromafines adultas había sido utilizado como un instrumento terapéutico para la EP teniendo como meta recuperar la deficiencia de la dopamina en el neostriado, resultado de la muerte precoz de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc y secundariamente la degeneración de la vía nigroestriada (ver la revisión de Lang, 2000; Dunnett et al, 2001).

En un trabajo previo de nuestro laboratorio de co-cultivo, se ha demostrado que estas células pueden establecer contactos sinápticos con las neuronas del neostriado y secretar predominantemente DA (Zhang et al, 2000).

Sin embargo, ha habido diferencias notables con respecto a los resultados del trasplante de células cromafines para los enfermos de EP (Madrazo et al, 1987; Hirsh et al, 1990; Lang, 2000). La mayoría de las evidencias patológicas muestran poca sobrevivencia de las células cromafines transplantadas.

Ha habido creciente aceptación de la hipótesis sobre la contribución del estrés oxidativo en la neurodegeneración de las células dopaminérgicas como se ha mencionado en los capítulos anteriores. Se sabe que la levodopa, el medicamento que más se usa para el tratamiento de la EP, por sí solo o por sus metabolitos, puede inducir estrés oxidativo. En un trabajo previo de nuestro laboratorio (Corona-Morales et al 2000), se ha demostrado que la levodopa causa muerte de las células cromafines en cultivo tanto por necrosis como por apoptosis (Fig. 6).

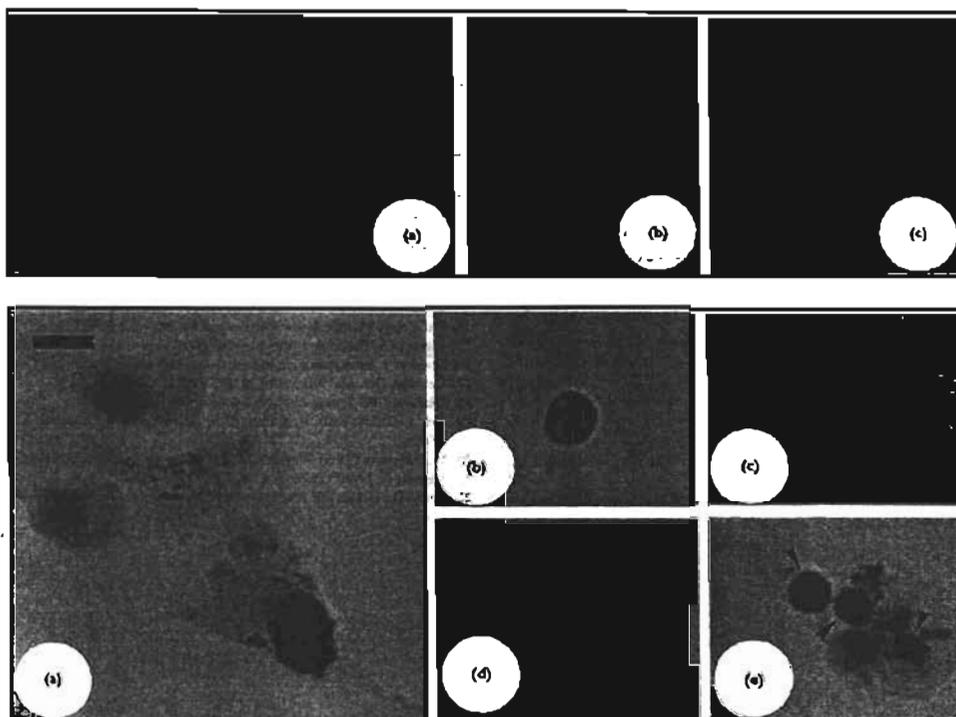


Fig. 6. Microfotografías mostrando muerte de células cromafines causada por la administración de dosis terapéutica de levodopa. Panel de arriba: muerte tipo necrótica. Panel de abajo: muerte de tipo apoptótica. (Tomadas de Corona-Morales et al, 2000).

En un trabajo más reciente de nuestro laboratorio (Corona-Morales et al, 2003), se ha demostrado que la administración combinada de la levodopa y algunos antioxidantes: ácido ascórbico y Fullerenos C60 puede contrarrestar la toxicidad generada por el uso de la levodopa (Fig. 7).

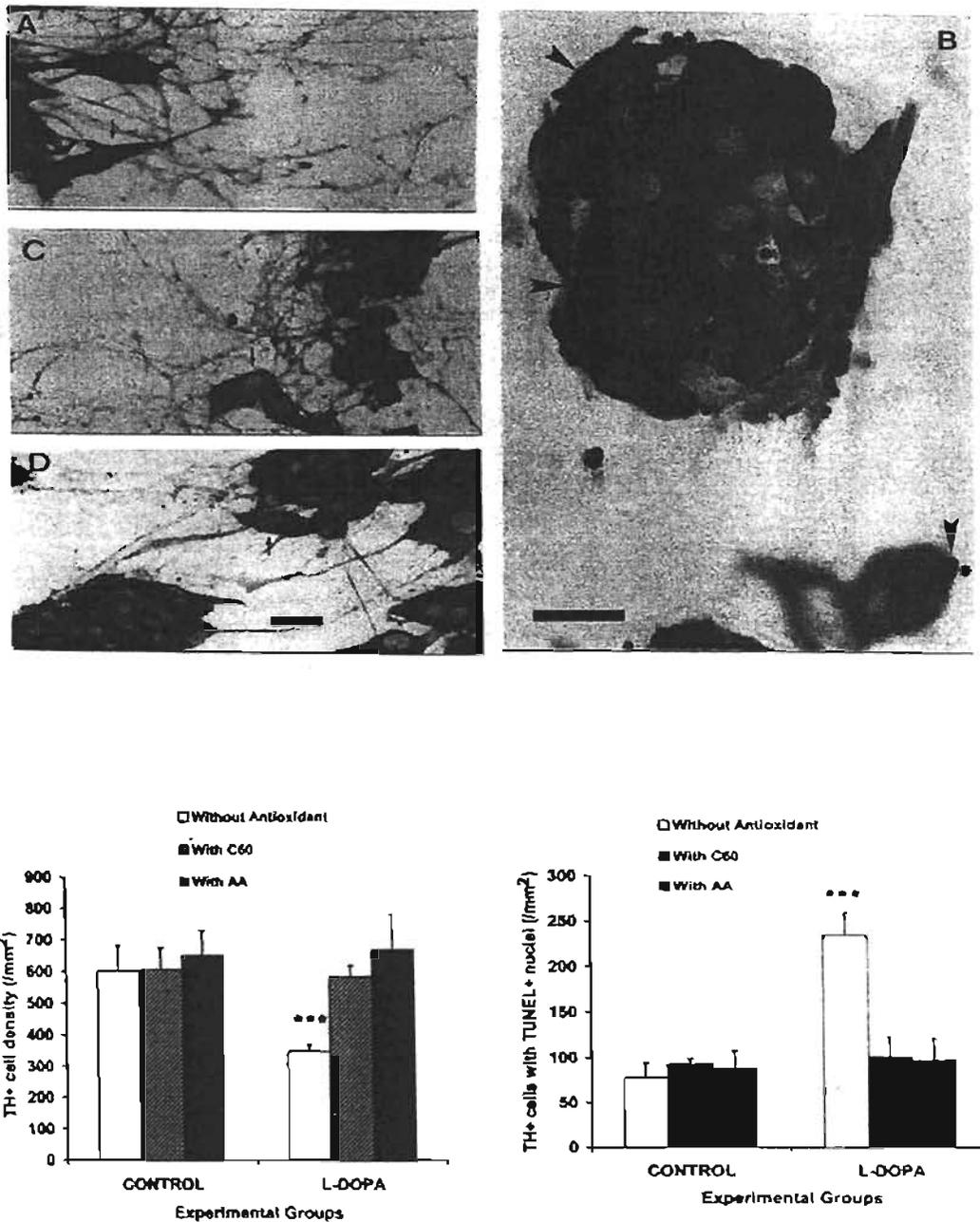


Fig. 7 Efectos de la co-administración de dosis terapéutica de levodopa y dos tipos de anti-oxidantes: ácido ascórbico y fulereno C60, sobre la sobrevivencia de células cromafines transdiferenciadas y la muerte celular por apoptosis. Microfotografías de inmunocitoquímica contra TH e histoquímica enzimática TUNEL para marcar núcleos apoptóticos: A: control; B: levodopa 50 μ M; C: levodopa 50 μ M + Fullereno C60 100 μ M; D: levodopa 50 μ M + Ácido ascórbico 100 μ M. Histogramas: derecho: sobrevivencia de células cromafines (TH-IR) en las diferentes condiciones experimental, Izquierdo: células cromafines (TH-IR) con núcleos apoptóticos bajo diferentes condiciones experimentales. (Figuras tomadas de Corona-Morales et al, 2003).

1.2.3 Taurina y diltiazem: ¿antioxidantes y/o neuroprotectores?

En la actualidad existen evidencias experimentales que revelan que diversas sustancias pueden considerarse como neuroprotectoras y ser utilizadas para aminorar la muerte neuronal producida como consecuencia de lesiones cerebrales, paro circulatorio, envejecimiento o incluso enfermedades neurodegenerativas como la EP. Lamentablemente son muchos los procesos metabólicos que se encuentran desregulados en la muerte neuronal, y no se sabe cuál de ellos puede ser el origen del problema en este desbalance. De hecho la diferencia entre estas sustancias neuroprotectoras radica en los distintos efectos que ejercen sobre el sistema nervioso, como pueden ser: bloqueo del aumento intracelular de sodio o calcio, inhibición de la liberación del calcio intracelular, inhibición de proteasas dependientes de calcio, inhibición de la liberación de neurotransmisores excitadores y activación de sus receptores, inhibición de proteínas cinasas, formación e inhibición de la lipoperoxidación, y generación de radicales libres. Todas estas acciones aminoran los procesos considerados como posibles inductores de daño neuronal o al menos involucrados en él.

La causa que genera la EP aún es desconocida. Existe mucha controversia acerca de que tanto la enfermedad es inducida por la genética del enfermo, inducida por un simple factor ambiental, o es la combinación de ambos factores de riesgo. Sin embargo, tanto el estrés oxidativo o nitrativo y la disfunción mitocondrial (defectos en la fosforilación oxidativa) están implicados en la etiología de la enfermedad y en otros modelos (Andersen; 2004; Dauer y Przedborski; 2003; Jenner; 2003; Lotharius y Brundin, 2002) pues el incremento de estas alteraciones puede resultar en la disfunción dopaminérgica que produce la neurodegeneración selectiva de estas neuronas. Incluso la dopamina misma puede ser oxidada a dopamina quinona (DAQ) que genera la liberación de superóxido y peróxido de hidrógeno (La Voiey Hastings

1999). Por lo tanto muchos de los esfuerzos científicos que intentan disminuir esta muerte neuronal selectiva están dirigidos hacia la búsqueda de sustancias que entre otras funciones puedan contrarrestar el estrés oxidativo.

1.2.4 La taurina

El sulfuro es un elemento esencial debido a su incorporación en aminoácidos, proteínas y otras biomoléculas. La tendencia general que siguen los compuestos que contienen sulfuro es que poseen cierta actividad antioxidante que depende del número de átomos de sulfuro. La cantidad de sulfuro determina la actividad moduladora de estos compuestos sobre las enzimas antioxidantes relacionadas con la glutatión. Sin embargo, el nivel de concentración de aminoácidos que contienen sulfuro puede cambiar su efecto antioxidante a un efecto prooxidante dependiendo del tipo de estrés oxidativo y las circunstancias fisiológicas (Atmaca, 2004). El término *tiol* se refiere a compuestos que contienen sulfuro. Los tioles pueden reducir al Cu^{2+} o Fe^{3+} a Cu^+ y Fe^{2+} respectivamente, mientras que son oxidados a disulfuros. El problema surge cuando los iones metálicos son reoxidados por acción de la superóxido dismutasa (SOD) que convierte al superóxido en H_2O_2 generando especies reactivas de oxígeno (ROS).

La taurina es un aminoácido azufrado que no forma parte de la estructura de las proteínas, participa en pocas acciones metabólicas como la síntesis de taurocolato del hígado, conjugación con el ácido bilial, destoxicación, estabilización membranal y modulación de los niveles de calcio celular (Ebrahim y Sakthísekaran, 1997; Lourenco y Camilo, 2002; Parcell, 2002). La taurina se forma por la descarboxilación de ácido cistéico o del cisteinsulfínico a través de una descarboxilasa similar a la del glutamato. La capacidad de síntesis varía dependiendo de la especie

y aún dentro de la misma especie varía dependiendo del tejido. Sin embargo se encuentra en concentraciones altas en el sistema nervioso (Mandel y Pasantes-Morales, 1978).

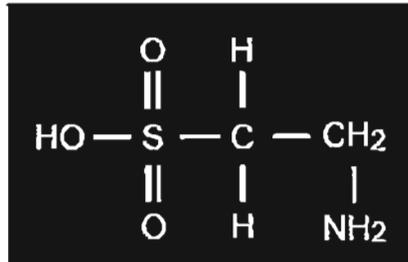


Fig. 8 Estructura de la taurina

La taurina tiene una acción depresora de la actividad neuronal y se ha propuesto que podría actuar como un neurotransmisor inhibitor. Sin embargo la evidencia experimental es muy escasa y generalmente se considera que la taurina manifiesta sus efectos inhibidores a través de una interacción con los receptores de GABA y glicina (Pasantes-Morales, 1993).

La presencia ubicua de la taurina y sus altas concentraciones en el sistema nervioso sugieren que una de las principales funciones podría ser la de un osmoregulador (Pasantes-Morales y Martín del Río, 1990). La evidencia en apoyo a esta posible función de la taurina deriva de dos enfoques experimentales: 1) La observación de que un incremento en el volumen de las células nerviosas, tanto neuronas como glía, se acompaña siempre de una salida de taurina al espacio extracelular. 2) las alteraciones en el volumen de las células y los organelos en animales deficientes en taurina.

Los fotorreceptores contienen concentraciones muy elevadas de taurina de 20 a 60 mM en todas las especies de vertebrados. Cuando experimentalmente se disminuye la concentración de

taurina de los fotorreceptores, se genera el edema del segmento externo y el retraimiento del interno (Hayes y col., 1975; Quesada y col., 1988). Las alteraciones morfológicas y funcionales de los receptores pueden revertirse si se revierte el proceso experimental que produjo la disminución en las concentraciones de taurina.

La función de la taurina como osmoefector se ha podido demostrar más claramente en células nerviosas en cultivo. Tanto los astrocitos como las neuronas cuando se exponen a una solución hiposmótica, en un principio se comportan como osmómetros; aumentando su volumen como resultado del cambio en el gradiente de osmolitos al bajar la osmolaridad extracelular pero casi inmediatamente después se activa un proceso regulatorio mediante el cual la célula expulsa solutos osmóticamente activos, con lo que se establece un nuevo equilibrio osmótico y el agua sale de la célula; ésta recobra su volumen inicial, a pesar de que persisten las condiciones hiposmóticas externas. En este proceso participan los iones potasio y cloruro y compuestos orgánicos como los aminoácidos libres y polialcoholes. La participación de la taurina en el proceso de regulación del volumen en los astrocitos se ha demostrado utilizando taurina tritiada como marcador. Al exponer las células a un medio con osmolaridad reducida se observa un aumento inmediato de la salida de taurina. Después el proceso se inactiva lentamente liberando cerca del 70% de su poza endógena de taurina. La cantidad de taurina que se libera está en función de la disminución en la osmolaridad (Pasantes-Morales y Schousboe, 1988).

La taurina retira parcialmente a las ROS y previene los cambios en la permeabilidad membranal que siguen después de un daño oxidativo, pero no actúa como un metal quelante (Neal y col., 1999). El tratamiento con taurina y la vitamina E mantiene los niveles de glutatión e incrementa la actividad de glutatión peroxidasa, los niveles de superóxido dismutasa y catalasa y retira directamente los radicales superóxido y reduce el daño celular causado por los radicales

libres (Ebrahim y Sakthisekaran, 1997). Se ha reportado que una dieta rica en taurina reduce la actividad enzimática de la transaminasa de aspartato en el plasma de ratas, indicando que el daño hepático inducido por aceite oxidado de pescado puede ser disminuido por taurina reduciendo el nivel de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico en el hígado y aumentando el nivel de glutatión (Hwang y col., 2000). Además, la disminución de taurina en la dieta contribuye al daño oxidativo en la neuropatía diabética experimental que puede ser revertida añadiendo de nuevo taurina en la dieta, y este efecto es mediado al menos en parte por el sistema de ascorbato de las defensas antioxidantes.

La taurina disminuye la arritmia ventricular que puede ocurrir durante la reoxigenación que sigue a un paro cardíaco y posibilita el regreso de la actividad eléctrica y mecánica normal. En un medio bajo en calcio la taurina disminuye el malondialdehído celular (producto relativamente estable de la peroxidación lipídica), incrementa la fuerza contráctil y mejora la recuperación miocárdica del daño celular isquémico (Oz y col., 1999).

Además la taurina actúa como regulador del flujo de calcio, como termorregulador, como anticonvulsivante y citoprotector (Parcell, 2002; Lourenco y Camilo, 2002; Aerts y Van Assche, 2002, Atmaca, 2004)

1.2.4 El diltiazem

La diversidad de las respuestas celulares acopladas a la entrada de Ca^{2+} a través de los canales iónicos sensibles a voltaje se ve reflejada en la diversidad existente de canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje (Hockerman y col., 1997). Electrofisiológica y genéticamente se han

identificado diferentes tipos de canales de Ca^{2+} conocidos como L, N, P/Q, R y T (Catterall, 1995). Los bloqueadores de canales de Ca^{2+} tipo L están agrupados en tres principales clases: las fenilalquilaminas, las bezotiazepinas o benzazepinas y las dihidropiridinas. Estas drogas se unen a tres distintos sitios receptores sobre el canal de Ca^{2+} los cuales están ligados alostéricamente (Glossmann y col., 1984).

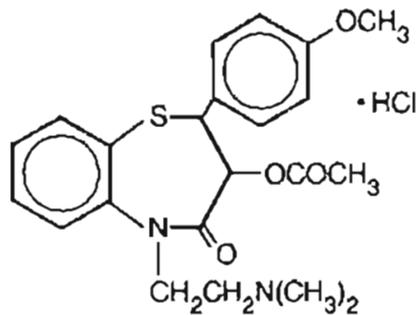


Fig. 9 Estructura del diltiazem.

El diltiazem es el prototipo de las bezotiazepinas y es el único fármaco de esta clase que actualmente se utiliza en la clínica. El diltiazem exhibe una selectividad modesta para el bloqueo del músculo cardíaco comparado con el bloqueo que ejerce sobre los canales tipo L del músculo liso vascular (efecto vasodilatador); sin embargo, se utiliza también en el tratamiento de arritmias cardíacas (Triggle, 1991). Como se ha reportado para las fenilalquilaminas y para las dihidropiridinas, el diltiazem es relativamente selectivo para los canales de calcio tipo L y puede bloquear otro tipo de canales de calcio a concentraciones mayores (Diochot y col., 1995). El diltiazem tiene propiedades bloqueadoras intermedias entre las fenilalquilaminas y las dihidropiridinas (Hockerman y col, 1997).

Además de los efectos anti-hipertensores o vasodilatadores, se ha demostrado que los bloqueadores de canales de calcio tipo L retardan la progresión de la aterosclerosis. Debido a que la formación de las lesiones ateroscleróticas no involucra células que expresen canales de calcio tipo L (macrófagos, células endoteliales y plaquetas), se ha sugerido que el efecto antiateroesclerótico se debe a una acción antiperoxidativa sobre las membranas lipídicas (Henry, 1991). En 1988 Shridi y Robak demostraron que la fenilalquilamina verapamil inhibe la peroxidación. En 1990 Keyer-Uysal y Kabasakal reportaron el mismo efecto para la dihidropiridina nifedipina y para la benzotiazepina diltiazem. Kaymaz y col. 2004, también reportan una disminución en la formación de radicales libres con diltiazem.

A pesar de lo mencionado anteriormente no se debe olvidar que el uso de los fármacos conocidos como bloqueadores de canales de calcio en la neuroprotección puede estar regulando la concentración intracelular de calcio, evitando un aumento transitorio o sostenido del calcio interno que pueda producir una excitotoxicidad descontrolada, de todos los neurotransmisores, que a su vez pueda producir la sobreexcitación neuronal y desencadenar una serie de eventos con resultados letales, algo que se ha sugerido (entre otras causas) sucede en la isquemia cerebral, en el envejecimiento y enfermedades neurodegenerativas como la EP. También se ha reportado que en neuronas cerebelares en cultivo, el diltiazem puede ser neuroprotector al prevenir la generación de especies reactivas de oxígeno y atenuando el aumento en el calcio intracelular (Tseng y Lin-Shiau, 2003). Aunque también se ha demostrado que al menos en células de músculo liso, las especies reactivas de oxígeno incrementan el calcio intracelular por el influjo de calcio a través de los canales tipo L (Tabet y col., 2004).

Aparentemente existe un efecto protector de los fármacos bloqueadores de canales de calcio tipo L como el diltiazem sobre el sistema nervioso, aunque su efecto secundario hipotensor

es considerado por algunos autores como el verdadero mecanismo al que deben su acción neuroprotectora, o a la acción conjunta de ambos efectos. Otros autores no descartan la posibilidad de que el efecto neuroprotector de estos fármacos se deba a una acción alostérica sobre los canales de Na^+ sensibles a voltaje (Galindo y Sitges 2004).

2. Planteamiento de problema

En la ausencia de la influencia de glucocorticoides suprarrenales, las células cromafines se transdiferencian a fenotipo neural y aumentan su producción de dopamina en la presencia de neuronas estriales *in vitro* (Zhang, L et al, 1998, 2000). El trasplante de las células cromafines hacia el neostriado o los sitios adyacentes había sido una estrategia terapéutica. Los resultados clínicos han sido controversiales y hemos explorado la contribución del uso de la levodopa post-trasplante sobre la muerte de células cromafines *in vitro*.

Puesto que en los trabajos anteriores del laboratorio se ha demostrado que la co-administración de levodopa y ácido ascórbico o Fullereno C60 mejora la sobrevivencia celular y disminuye la aparición de núcleos apoptóticos, es importante e interesante ampliar esta búsqueda de anti-oxidantes capaces de neutralizar los efectos neurotóxicos de la levodopa y ejercer efectos neuroprotectores para las mismas células.

3. Hipótesis

1. La administración del **diltiazem** no causa daño celular en cultivo de las células cromafines de la médula suprarrenal. La co-administración de **diltiazem** y **levodopa** en cultivo de células cromafines disminuye la muerte tanto necrótica como apoptótica producida por la neurotoxicidad inducida por la levodopa.
2. La administración de la **taurina** no causa daño celular en cultivo de las células cromafines de la médula suprarrenal. La co-administración la **taurina** y **levodopa** en cultivo de células cromafines disminuye la muerte tanto necrótica como apoptótica producida por la neurotoxicidad inducida por la levodopa.

4. Objetivo

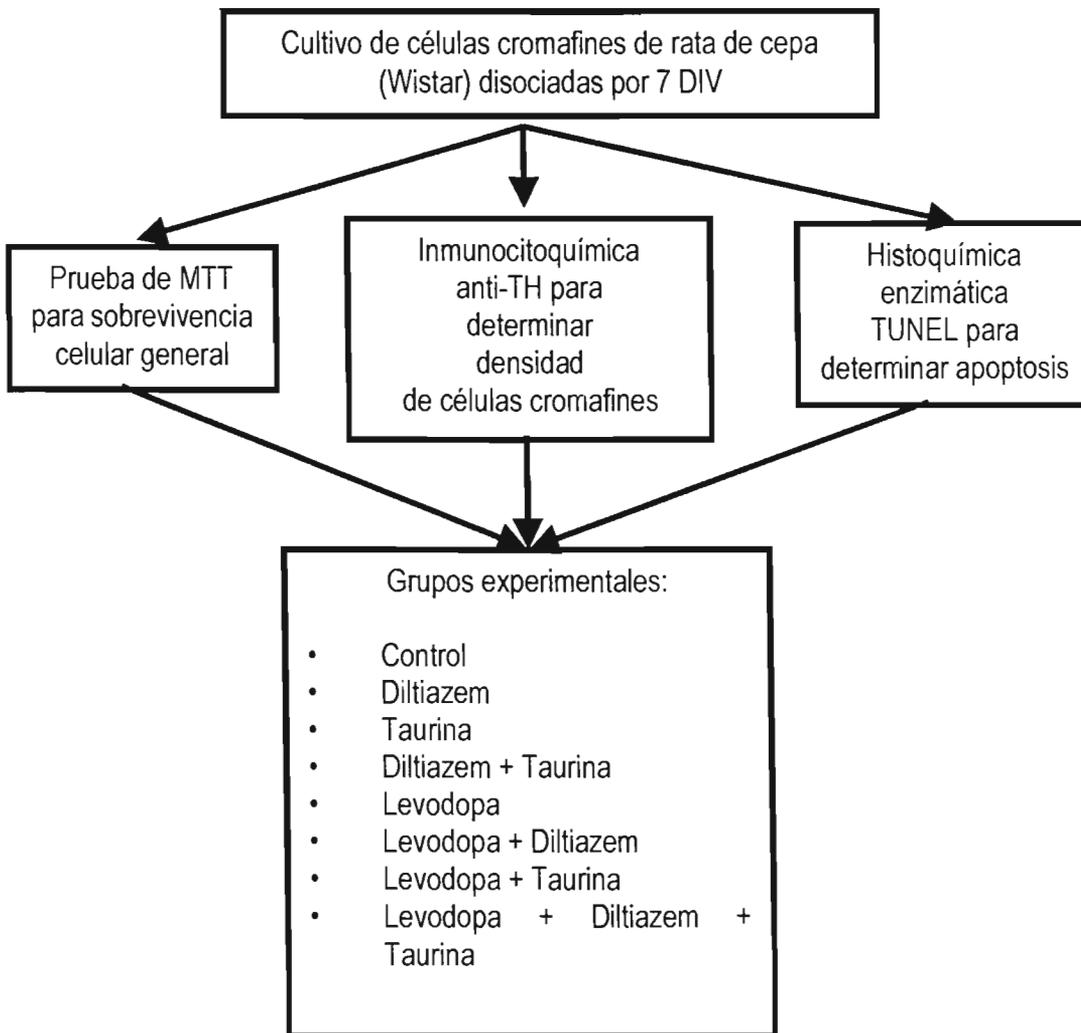
General

Examinar si las sustancias químicas Diltiazem y Taurina podrían funcionar como agentes anti-oxidantes que contrarresten la toxicidad inducida por la levodopa.

Específicos

1. Examinar los efectos del Diltiazem sobre la sobrevivencia de células cromafines:
 - 1.1 Analizar el efecto del Diltiazem solo sobre la sobrevivencia de las células cromafines en cultivo y la aparición de apoptosis en estas células.
 - 1.2 Analizar el efecto de la co-administración de Diltiazem junto con levodopa sobre la sobrevivencia de las células cromafines en cultivo y la aparición de apoptosis en estas células.
2. Examinar los efectos de la Taurina sobre la sobrevivencia de células cromafines:
 - 2.1 Analizar el efecto de la Taurina solo sobre la sobrevivencia de las células cromafines en cultivo y la aparición de apoptosis en estas células.
 - 2.2 Analizar el efecto de la co-administración de la Taurina junto con levodopa sobre la sobrevivencia de las células cromafines en cultivo y la aparición de apoptosis en estas células.

5. Diseño experimental



6. Material y métodos

EXPERIMENTO *IN VITRO* (CULTIVO CELULAR)

En este estudio se utilizaron células cromafines de ratas de 3 a 5 días de edad de la cepa Wistar, las cuales fueron proporcionadas por el bioterio de la Facultad de Medicina UNAM. Cincuenta animales fueron decapitados para la obtención de glándulas suprarrenales, las cuales fueron descapsuladas y transferidas al medio de disección y lavado (Hanks' Balanced Salts HBSS sin Ca^{++} y Mg^{++} ; SIGMA), complementado con suero fetal bovino (10% v/v SIGMA), estreptomycina-penicilina (100 U/ml, SIGMA), a un pH de 7.4. Las glándulas suprarrenales se disociaron mecánicamente y se resuspendieron cuidadosamente con una pipeta Pasteur siliconizada. La suspensión celular obtenida fue incubada en 100 ml de medio HBSS con 20 mg de Colagenasa tipo IA (SIGMA), durante 30 minutos a una temperatura de (37 °C) con agitación. Terminada la incubación, la suspensión celular fue centrifugada a 800 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante fue eliminado y el botón se resuspendió en medio de cultivo DMEM, complementado con suero fetal bovino (10% V/V SIGMA), insulina (4.5 µg/ml), estreptomycina-penicilina (100 U/ml SIGMA). Por este procedimiento se obtuvo una viabilidad del 90%, observada con el hemocitómetro por la técnica de exclusión de azul tripano al 0.4%. Finalmente las células se sembraron con una densidad de 1×10^6 células/ml en placas de cultivo de 12 y 96 pozos. Los cultivos se mantuvieron en una cámara húmeda a 37 °C y una atmósfera con 5% de CO_2 . El medio de cultivo DMEM complementado con Nerve Growth Factor NGF (0.1 mg/ml SIGMA) fue cambiado cada 72 horas. El objetivo de agregar NGF al medio de cultivo, es promover la supervivencia celular y estimular el crecimiento de proyecciones neuríticas de las células cromafines. Los medios de cultivo fueron mantenidos bajo estas condiciones

aproximadamente durante 15 días, tiempo en el cuál se puede observar estos cambios morfológicos. Para posteriormente dar inicio al protocolo experimental.

El protocolo que se desarrollo, fue el siguiente:

1. Ensayo de viabilidad celular por MTT, en cultivos de células cromafines tratados con Levodopa y anti-oxidantes (Diltiazem y Taurina).

Grupos experimentales (5 pozos de cada uno):

1. Control
 2. Levodopa (200 μ M)
 3. Diltiazem (100 μ M)
 4. Taurina (10mM)
 5. Diltiazem (100 μ M) + Taurina (10mM)
 6. Levodopa (200 μ M Diltiazem (100 μ M)
 7. Levodopa (200 μ M + Taurina (10mM)
 8. Levodopa (200 μ M + Diltiazem (100 μ M) + Taurina (10mM)
-
2. Detección de apoptosis (TUNEL) y Tirosina Hidroxilasa TH+, en cultivos de células cromafines tratados con Levodopa y anti-oxidantes (Diltiazem y Taurina).

ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR POR MTT.

Se determinó la viabilidad por la reducción de la sal de tetrazolio MTT a azul formazán (Slater et. al, 1963). Para ello, las células se sembraron en placas de 96 pozos con 100 μ l de DMEN por pozo. Después 4 horas de exposición a Levodopa (200 μ M), Diltiazem (100 μ M) y Taurina (100 mM), se agregaron 10 μ l de solución stock de MTT (SIGMA) 1:10 (5mg/ml en PBS) por pozo y se incubaron a 37 °C por 4 horas en incubadora de CO₂. Se retiró el medio con fármacos con pipeta Pasteur y se añadieron 200 μ l HCl 0.1 N en isopropanol (200 μ l HCl de 10 N + 19.800 ml de isopropanol, SIGMA). Por último, se midió la densidad óptica de cada pozo en un lector de ELISA a una longitud de onda de 570 nm (MTT convertido en azul de formazán).

DETECCIÓN DE APOPTOSIS EN CÉLULAS CULTIVADAS.

DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System.

El proceso de muerte celular apoptótica se observó con la técnica de TUNEL (por sus siglas en inglés: terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediante dUTP nickend-labeling (Promega Corporation). Después de la exposición a Levodopa, Diltiazem y Taurina, los cultivos de células cromafines fueron fijados con paraformaldehído al 4% en amortiguador de fosfatos 0.1M, por 25 minutos. Después de tres lavados con PBS, los cultivos celulares se permeabilizaron en PBS 0.9%, con Tritón X-100 al 0.2% y Albúmina Serica Bovina 0.3%, por 5 minutos a temperatura ambiente. Terminada la permeabilización, los cultivos se preincubaron con buffer de equilibrio TdT de 5 a 10 minutos a temperatura ambiente y a continuación se incubaron con la mezcla de reacción rTdT la cual estaba constituida por: enzima rTdT 1 μ l, mezcla

nucleótido biotinilado 1µl y buffer de equilibrio 98 µl, durante 60 minutos a 37 °C. La reacción se detuvo sumergiendo los cultivos en 2X SSC (1:10), por 15 minutos a temperatura ambiente. Detenida la reacción y lavados los cultivos, se procedió a bloquear la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno H₂O₂ al 0.3% de 3 a 5 minutos, para posteriormente ser incubados en estreptoavidina-peroxidasa HRP (1:500) en PBS por 30 minutos a temperatura ambiente. Los cultivos fueron revelados con 3, 3'-diaminobenzidina tetrahidrócloro, durante aproximadamente 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente los cultivos fueron lavados con agua destilada y montados con un medio de montaje acuoso o permanente.

Detección Inmunohistoquímica de células Tirosina Hidroxilasa TH⁺.

Los cultivos de células cromafines expuestos a Levodopa, Diltiazem y Taurina fueron fijados con paraformaldehído al 4% en amortiguador de fosfatos 0.1M, por 25 minutos. Después de tres lavados con PBS, los cultivos celulares se permeabilizaron en PBS 0.9%, con Tritón X-100 al 0.2% y Albúmina Serica Bovina 0.3%, por 5 minutos a temperatura ambiente. Terminada la permeabilización, los cultivos se incubaron por 12 horas con anticuerpo primario de conejo anti-Th a una dilución 1:2000 (Chemicon), durante 12 horas a 4 °C. Al término de la incubación, los cultivos se lavaron con PBS tres veces, y posteriormente se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado (Vector), durante 12 horas a 4 °C. Posteriormente se repitieron tres lavados con PBS, para poder realizar la incubación del complejo estreptoavidina-peroxidasa (Vectastain ABC-Vector), durante 1 hora a temperatura ambiente. La reacción fue revelada con 3, 3'-diaminobenzidina tetrahidrócloro (Zymed), durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Finalmente, los cultivos lavados con agua destilada fueron montados sobre portaobjetos con un medio de montaje acuoso.

Doble Inmunomarcaje de Apoptosis y células Tirosina Hidroxilasa TH+.

Los cultivos de células cromafines tratados con Levodopa, Diltiazem y Taurina, fueron procesados para la expresión simultánea de núcleos apoptóticos y de la enzima citoplasmática Tirosina Hidroxilasa TH+. Para este procedimiento primero se desarrolló la técnica de TUNEL como previamente se describió, excepto que los cultivos no fueron montados en portaobjetos. El producto de esta reacción se observa en el núcleo, el cual tiene una coloración café ocre. Inmediatamente de haber terminado la técnica de TUNEL, se procedió a marcar las células TH+, cuya marca se observa en el citoplasma. En ambas técnicas se revela con DAB, tomando en cuenta que la reacción de TUNEL es nuclear y la reacción de TH+ es citoplasmática; por lo tanto no puede existir una superposición de marcas.

Análisis Estadístico.

De cada grupo experimental, se eligieron 10 campos (por pozo), de manera azarosa y con el microscopio óptico Olympus BH-2 (20X) y se realizó el conteo celular de células marcadas con TUNEL y TH+. El análisis estadístico que se utilizó fue la prueba de Student-Newman-Keuls (GraphPad InStat-GraphPad Software, V 2.05) y el procedimiento gráfico se realizó con el programa de cómputo Excel (Microsoft Office V. 2000).

PROCEDIMIENTO TÉCNICO DE ANÁLISIS DE APOPTOSIS EN CÉLULAS CULTIVADAS.

DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System.

1. **Fijación:** Láminas fijadas en formol buffer al 10% o paraformaldehído al 4% en amortiguador de fosfatos, por 25 minutos.
2. **Lavar:** Lavar en PBS (tres veces), 5 minutos en cada lavado.
3. **Permeabilizar:** Láminas inmersas en Tritón X-100 al 0.2% en PBS por 5 minutos.
4. **Lavar:** Lavar en PBS (tres veces), 5 minutos en cada lavado.
5. **Equilibrar:** Agregar 100µl de Buffer de Equilibrio de 5 a 10 minutos a temperatura ambiente.
6. **Marcaje:** Agregar 100µl de TdT-mezcla de reacción a las láminas y cubrirlas con Plastic Coverslips por 60 minutos a 37° C, en cámara húmeda.

Tabla 1. Preparación de Mezcla de Reacción rTdT.

Buffer Componente	Volumen Componente		Número de Reacciones		Volumen
Buffer de Equilibrio	98µl	x	11	=	1.078
Mezcla Nucleotido Biotinilado	1µl	x	11	=	0.11
Enzima rTdT	1µl	x	11	=	0.11

7. **Paro reacción:** Remover la Plastic Coverslips y terminar la reacción por inmersión de las láminas en 2X SSC (1:10) por 15 minutos a temperatura ambiente.

8. **Lavar:** Lavar en PBS (tres veces), 5 minutos en cada lavado.
9. **Bloquear:** Láminas inmersas en H₂O₂ al 0.3% de 3 a 5 minutos.
10. **Lavar:** Lavar en PBS (tres veces), 5 minutos en cada lavado.
11. **Incubar:** Streptavidin HRP (1:500) en PBS. Agregar 100µl a cada lámina e incubar por 30 minutos a temperatura ambiente.
12. **Lavar:** Lavar en PBS (tres veces), 5 minutos en cada lavado.
13. **Revelar:** Con la solución de DAB (50µl de Buffer de 20X Sustrato DAB a 950µl de agua destilada, 50µl de cromógeno 20X DAB y 50µl de H₂O₂ 20X). Agregar 100µl de solución DAB a cada lámina, durante aproximadamente 19 minutos.
14. **Lavar:** Lavar con agua destilada varias veces.
15. **Montaje:** Montar las láminas en un medio de montaje acuoso o permanente.

Inmunohistoquímica para Tirosina Hidroxilasa Th.

Técnica para la Detección de Th.

1. **Fijación:** Láminas inmersas en paraformaldehído al 4% en amortiguador de fosfatos 0.1 M, por 25 minutos.
2. **Lavar:** Lavar en PB (tres veces), 5 minutos en cada lavado.
3. **Permeabilizar:** Láminas inmersas en PBS 0.9%, con Tritón X-100 al 0.2% y Albúmina Serica Bovina 0.3%, por 5 minutos a temperatura ambiente.
4. **Lavar:** Lavar en PBS (tres veces), 5 minutos en cada lavado.

5. **Incubación:** Incubar en anticuerpo primario (Anti-Tiosina Hidroxilasa Th/1:2000 Chemicon), durante 12 horas a 4 °C.
6. **Lavar:** Lavar en PBS (tres veces), 5 minutos en cada lavado.
7. **Incubación:** Incubar en anticuerpo secundario biotinilado (Vector), durante 12 horas a 4 °C.
8. **Lavar:** Lavar en PBS (tres veces), 5 minutos en cada lavado.
9. **Incubación:** Incubar en el complejo estreptoavidina-peroxidasa (Vectastain ABC-Vector), durante 1 hora a temperatura ambiente.
10. **Lavar:** Lavar en PBS (tres veces), 5 minutos en cada lavado.
11. **Revelar:** Revelar con 3, 3'-diaminobenzidina tetrahidrocloro DAB (Zymed), durante 5 minutos a temperatura ambiente..
12. **Lavar:** Lavar con agua destilada varias veces.
13. **Montaje:** Montar las láminas en un medio de montaje acuoso o permanente .

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

7. Resultados

7.1 Estimación de la viabilidad celular por el ensayo con MTT

Al inicio de la fase experimental de esta prueba, el cultivo de glándula suprarrenal disociada, que contiene además células cromafines, también fibroblastos, células de la corteza suprarrenal, del tejido vascular y nervioso, fue expuesto por 4 horas a la levodopa con una concentración de $200\mu\text{M}$, concentración y tiempo de exposición determinados por un trabajo previo de laboratorio (Corona-Morales 2003). Además de la levodopa, los siguientes fármacos fueron usado: diltiazem ($100\mu\text{M}$), y taurina (10mM), distribuidos en los siguientes grupos experimentales:

- a. Control (C)
- b. Control de diltiazem (Dil)
- c. Control de taurina (Tau)
- d. Control de diltiazem + taurina (Dil+Tau)
- e. Levodopa (levo)
- f. Levodopa + diltiazem (levo + dil)
- g. Levodopa + taurina (levo + tau)
- h. Levodopa + diatiazem + taurina (levo+dil+tau).

En la Fig. 10 se observa que la densidad óptica que refleja la viabilidad celular, del grupo levodopa, disminuye significativamente. Los grupos controles de diltiazem y taurina y de la co-administración de diltiazem y taurina no tuvieron diferencias con el control pero si tuvieron diferencias significativas con el grupo de levodopa.

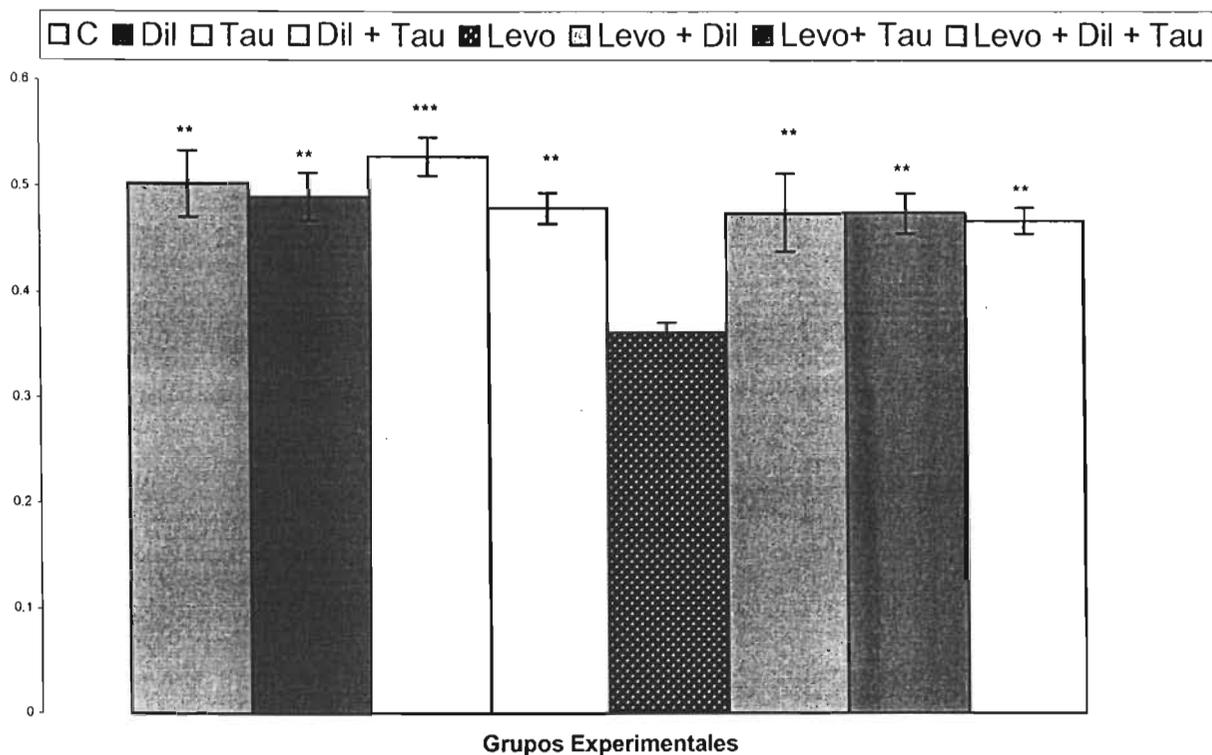


Fig. 10 Estimación de la viabilidad celular por la prueba de MTT. Los siguientes fármacos fueron usados: diltiazem (100 μ M), taurina (10mM) y levodopa (200 μ M) distribuidos en los siguientes grupos experimentales: a. Control (C), b. Control de diltiazem (Dil), c. Control de taurina (Tau), d. Control de diltiazem + taurina (Dil+Tau), e. Levodopa (levo), f. Levodopa + diltiazem (levo + dil), g. Levodopa + taurina (levo + tau), h. Levodopa + diltiazem + taurina (levo+dil+tau). Pueba estadística de Student-Newman-Keuls, ** $p < 0.01$.

7.2 Efectos de la administración de levodopa y la co-administración de levodopa con diltiazem y taurina sobre la morfología y la densidad de células TH-inmunoreactivas (IR).

La Fig. 11 muestra campos representativos de los diferentes grupos experimentales sometidos en el mismo esquema de aplicación de fármacos que el experimento anterior. Se observa la retracción de procesos neuríticos en la presencia de levodopa y algunos núcleos fueron detectados como apoptóticos con la prueba de TUNEL. La Fig. 12 muestra el histograma de la densidad de células TH-IR con su análisis estadístico que indica una disminución muy significativa de las células cromafines en el grupo levodopa mientras que la co-administración con diltiazem y/o taurina mejora en el aspecto de sobrevivencia de las células cromafines.

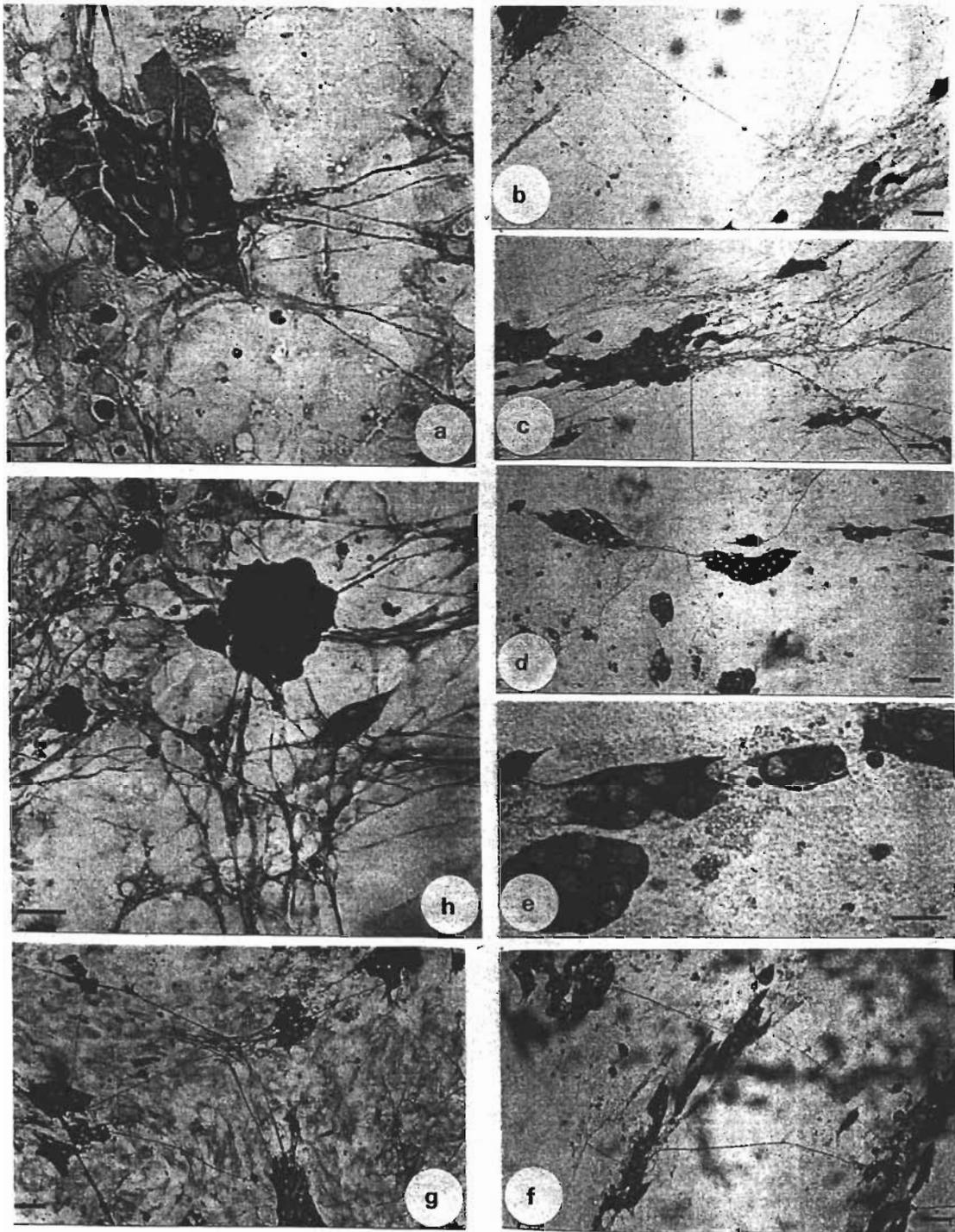


Fig. 11 Microfotografía compuesta que muestra campos representativos de los diferentes grupos experimentales: a. Control, b. Control de diltiazem, c. Control de taurina, d. Control de diltiazem + taurina, e. Levodopa, f. Levodopa + diltiazem, g. Levodopa + taurina, h. Levodopa + diltiazem + taurina. Se observa la retracción de procesos neuríticos en la presencia de levodopa y algunos núcleos fueron detectados como apoptóticos con la prueba de TUNEL (flechas). Barras = 20mm en a, e, y h y barras = 50mm en b, c, d, f, g.

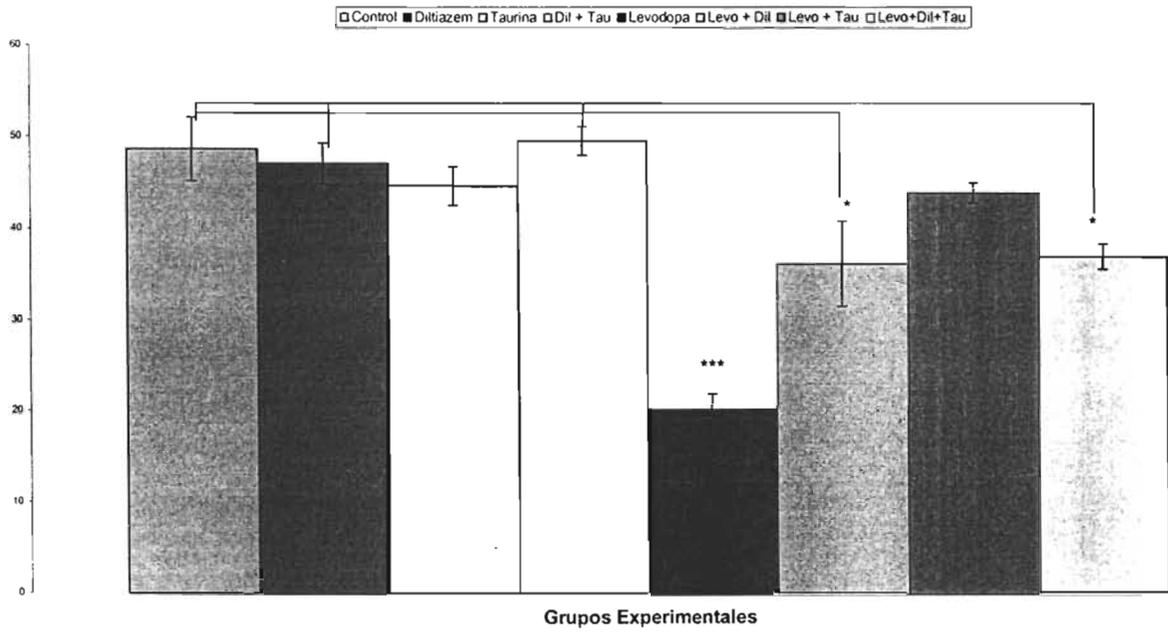


Fig. 12 Conteo de células TH-IR en los diferentes grupos experimentales: Control (C), Control de diltiazem (Dil), Control de taurina (Tau), Control de diltiazem+taurina (Dil+Tau), Levodopa (levo), Levodopa + diltiazem (Levo + Dil), Levodopa + taurina (Levo + Tau), Levodopa + diltiazem + taurina (Levo+Dil+Tau). Pueba estadística de Student - Newman - Keuls, *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$.

8. Discusión

De trabajos previos de nuestro laboratorio, hemos reportado que la levodopa a dosis similar a la del uso clínico (100-300 μ M) causa daño celular *in vitro* (Corona-Morales et al, 2000). Los cultivos, además de células cromafines, contienen otros tipos celulares propios de la glándula suprarrenal, como son fibroblastos, neuronas simpáticas, vasos sanguíneos y células de la corteza suprarrenal. En trabajos previos se han observado que la muerte celular de estos tipos celulares incrementaron con la administración del fármaco (Corona - Morales et al, 2000, 2003). En el presente trabajo, lo demostramos con la técnica de MTT. Esta técnica mide la viabilidad celular, ya que células sanas serán capaces de convertir la sal de tetrazolio en azul de formazán a través de la actividad de deshidrogenasas en la cadena oxidativa de las mitocondrias. Contrariamente, células muertas, células dañadas o con una sobrevivencia comprometida, serán incapaces de tal conversión o con una cinética disminuida. Así, nuestros resultados muestran claramente que el grupo expuesto únicamente a levodopa presentó una densidad óptica mucho menor que en resto de los grupos (fig. 10). Del mismo experimento, podemos observar que tanto la taurina como el diltiazem, nuestros fármacos bajo estudio, no resultaron producir daño alguno. Sin embargo, lo más importante del resultado con esta técnica, es el hecho de que la taurina y el diltiazem, juntos o por separado, claramente previnieron el daño que es inducido por la levodopa, obteniendo una densidad óptica muy similar a los controles.

Podemos deducir que la toxicidad producida por la levodopa es por la generación de radicales libres, la cual rebasa la capacidad antioxidante de las células en cultivo y por lo tanto se genera un estado de estrés oxidativo que termina lesionando y matando a las células. Esto lo podemos afirmar debido a que la aplicación de dos moléculas por separado, con capacidad

antioxidante, el ampliamente usado ácido ascórbico y el fulereno, revertieron el daño (Corona-Morales et al, 2002). Si bien es válido pensar que la taurina y el diltiazem pueden estar funcionando como moléculas antioxidantes en nuestro sistema *in vitro*, con nuestros resultados no podemos descartar la posibilidad de que estas moléculas pudieran estar previniendo el daño por otro mecanismo, o incluso, por más de un mecanismo.

Coincidiendo con diversos trabajos previos, si bien la levodopa disminuyó la viabilidad de los diversos tipos celulares, observamos que las células cromafines resultaron ser más vulnerables. Esto lo pudimos observar llevando a cabo una inmunocitoquímica para la enzima TH, la cual se encuentra únicamente (en nuestros cultivos) en las células cromafines. En la gráfica 2 podemos observar nuevamente que tanto el diltiazem como la taurina, a las concentraciones estudiadas, no indujeron ningún daño celular. De manera similar, la levodopa produjo una disminución significativa del número de células cromafines. Si se hace la comparación entre la disminución inducida por levodopa en la gráfica 1 con la respectiva de la fig. 12, podemos suponer que las células cromafines son más vulnerables que el resto de la población celular (sin perder de vista que cada método se basa en procesos diferentes). Esta suposición se basa en que las células cromafines son las únicas en nuestros cultivos que son capaces de introducir la levodopa y que sea transformada enzimáticamente a DA. Como mencionado en la introducción, no solamente la autooxidación de las catecolaminas produce quinonas, semiquinonas y radicales libres, sino que durante la descarboxilación de la levodopa se produce H_2O_2 , molécula que fácilmente en la presencia de un metal puede ser convertido al altamente agresivo radical hidroxilo.

Aunque no se cuantificó, también merece la pena resaltar que la anatomía de las células y de la red de prolongaciones neuríticas en cultivo se manifestaron de manera muy diferente cuando las células se expusieron exclusivamente a levodopa en comparación con los otros grupos. En el grupo de levodopa, se puede observar claramente (fig. 11e) como las células TH⁺ se agrupan en cúmulos de pocas células, su forma es casi redonda y una ausencia de neuritas. Los cúmulos de pocas células se explica por la masiva muerte celular y en el caso de las neuritas, es bien sabido que, en neuronas expuestas a ROS por ejemplo, hay una retracción de la red neurítica en un intento de exponer menos superficie de membrana al ataque de radicales libres y a un ahorro de energía. Así pues, la conservación de la red de prolongaciones puede resultar ser un indicio más fino de daño o alteración. Respaldando los resultados obtenidos en los experimentos de MTT e inmunocitoquímica contra TH, la red de prolongaciones neuríticas es prominente en condiciones control (fig. 11a) como en los grupos con diltiazem (fig. 11b) y taurina (fig. 11c), nuevamente indicándonos que no ejercen ningún efecto negativo en las células cromafines. Al exponer a las células cromafines con la levodopa más taurina y/o diltiazem (fig. 11 f-h), no se perdió la red de prolongaciones, indicio que apoya aún más nuestros resultados.

Si bien los mecanismos específicos por los cuales tanto la taurina y como el diltiazem protegen del daño provocado por la levodopa a los de células cromafines no los hemos determinado, el presente trabajo sienta las bases de un modelo en el que frente a un estado de estrés oxidativo, tanto la taurina como el diltiazem parecen estar funcionando de manera tal que favorecen la sobrevivencia y la interacción celular.

9. Referencias:

Aerts L, Van Assche FA. (2002) Taurine and taurine-deficiency in the perinatal period. *J Perinat Med.* 30:281-6.

Andersen JK. (2004) Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence?. *Nat Med.* S10:S18–S25

Atmaca G. (2004) Antioxidant effects of sulfur-containing amino acids. *Yonsei Med J.* 45:776-88.

Berne R. (2001). *Fisiología*. Edit. Harcourt. Madrid Barcelona. 561p.

Blunt SB, Jenner P, Marsden CD. (1993). Suppressive effect of L-dopa on dopamine cells remaining in the ventral tegmental area of rats previously exposed to the neurotoxin 6-hydroxydopamine. *Mov Disord.* 8: 129-33.

Catterall WA. (1995) Structure and function of voltage-gated ion channels. *Annu Rev Biochem.* 64:493-531.

Corona-Morales AA, Castell A, Escobar A, Drucker-Colin R, Zhang L. (2003). Fullerene C60 and ascorbic acid protect cultured chromaffin cells against levodopa toxicity. *J Neurosci Res.* 71: 121-6.

Corona-Morales AA, Castell A, Zhang L. (2000). L-DOPA-induced neurotoxic and apoptotic changes on cultured chromaffin cells. *Neuroreport.* 11: 503-6.

Cotzias G. C, Papavasiliou P. S, Gellene R. (1969). Modification of parkinsonism. *N. Engl. J. Med.* 280: 337-345.

Dauer W. Przedborski S. (2003) Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39:889–909

Diochot S, Richard S, Baldy-Moulinier M, Nargeot J, Valmier J. (1995) Dihydropyridines, phenylalkylamines and benzothiazepines block N-, P/Q- and R-type calcium currents. *Pflugers Arch.* 431:10-9.

Diplock A. (1994). Antioxidants and free radical scavengers. En: *Free radical control and its control*. Ed. Elsevier Science, pp: 113-130.

Ebrahim AS, Sakthisekaran D. (1997) Effect of vitamin E and taurine treatment on lipid peroxidation and antioxidant defense in perchloroethylene-induced cytotoxicity in mice. *J Nutr Biochem* 8:270-274

Feher J, Csomós G, Vereckei A. (1987). The chemistry of free radical reactions. En: *Free radical reactions in medicine*. Ed. Springer Verlag, pp: 2-10.

Graham DG, Tiffany SM, Bell WR Jr, Gutknecht WF. (1978). Autoxidation versus covalent binding of quinones as the mechanism of toxicity of dopamine, 6-

hydroxydopamine, and related compounds toward C1300 neuroblastoma cells in vitro. *Mol Pharmacol*;14: 644-53.

Galindo CA, Sitges M. (2004) Dihydropyridines mechanism of action in striatal isolated nerve endings: comparison with omega-agatoxin IVA. *Neurochem Res.* 29:659-69.

Glossmann H, Ferry DR, Goll A, Rombusch M. (1984) Molecular pharmacology of the calcium channel: evidence for subtypes, multiple drug-receptor sites, channel subunits, and the development of a radioiodinated 1,4-dihydropyridine calcium channel label, [¹²⁵I]iodipine. *J Cardiovasc Pharmacol.* 6:S608-21

Goldstein DS, Eisenhofer G, McCarty R. (eds). 1998. Catecholamine: Bridging basic science with clinical medicine. New York, Academic press.

Halliwell B, Gutteridge J. M. C. (1989). Free radicals in biology and medicine. Ed. Clarendon Press, p: 543.

Hayes KC, Carey RE, Schmidt SY. (1975) Retinal degeneration associated with taurine deficiency in the cat *Science* 188:949-951

Hefti F, Melamed E, Bhawan J, Wurtman R. J. (1981). Long-term administration of L-DOPA does not damage dopaminergic neurons in the mouse. *Neurology.* 31: 1194-1195.

Heistad D. D, Marcus M. L. (1979). *Blood Vessels* 16: 225.

Henry PD. (1991) Antiperoxidative actions of calcium antagonists and atherogenesis. *J Cardiovasc Pharmacol.* 18 Suppl 1:S6-10.

Hockerman GH, Peterson BZ, Johnson BD, Catterall WA. (1997) Molecular determinants of drug binding and action on L-type calcium channels. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 37:361-96.

Hornykiewicz O. (1992). L-DOPA: from a biologically inactive amino acid to a successful therapeutic agent. *Amino Acids.* 2002; 23: 65-70.

Hwang DF, Hour JL, Cheng HM. (2000) Effect of taurine on toxicity of oxidized fish oil in rats. *Food Chem Toxicol.* 38:585-91.

Jenner P. (2003) Oxidative stress in Parkinson's disease. *An Neurol.* 53 (S3):S26–S36

Kaymaz AA, Telci A, Albeniz I, Belce A, Altug T. (2004) Comparison of the metabolic and antioxidant effects of diltiazem and vitamin E on streptozotocin-diabetic rats. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 51:265-7.

Keyer-Uysal M, Kabasakal L. (1990) The effect of lithium and calcium antagonists on brain lipid peroxide levels in mice. *Eur J Pharmacol.* 183:2439.

Kuhar MJ, Couceyro PR, Lambert

LaVoie MJ, Hastings TG. (1999) Peroxynitrite- and nitrite-induced oxidation of dopamine: implications for nitric oxide in dopaminergic cell loss. *J Neurochem.* 73: 2546–54.

Lotharius J, Brundin P. (2002) Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and alpha-synuclein, *Nat Rev Neurosci.* 3:932–42.

Lourenco R, Camilo ME. (2002) Taurine: a conditionally essential amino acid in humans? An overview in health and disease. *Nutr Hosp.* 17:262-70.

Madrazo I, Drucker-Colin R. (1987). Open microsurgical autograf of adrenal medulla to the right caudate nucleus in two patients with intractable Parkinson's disease. *N. England. J. med,* 316: 831-834

Mandel P, Pasantes-Morales H. (1978) Taurine in the nervous system Raven Press 3:157-193

Mezzetti A, Lapenna D, Calafiore AM, Proietti-Franceschilli G, Porreca E, De Cesare D, Neri M, Di Ilio C, Cuccurullo F. (1992). Glutathione-related enzyme activities and lipoperoxide levels in human internal mammary artery and ascending aorta. Relations with serum lipids. *Arterioscler Thromb.* 12: 92-8.

Molinoff PB, Arelrod J (1971). Biochemistry of catecholamines. *Annu. Rev. Biochem.* 40: 465 – 500.

Mytilineou C, Han SK, Cohen G. (1993). Toxic and protective effects of L-dopa on mesencephalic cell cultures. *J Neurochem.* 61: 1470-8.

Neal R, Cooper K, Kellogg G, Gurer H, Ercal N. (1999) Effects of some sulfur-containing antioxidants on lead-exposed lenses. *Free Radic Biol Med.* 26:239-43.

Obrosova IG, Fathallah L, Stevens MJ. Taurine counteracts oxidative stress and nerve growth factor deficit in early experimental diabetic neuropathy. *Exp Neurol.* 172:211-9.

Ogawa N, Asanuma M, Kondo Y, Kawada Y, Yamamoto M, 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: 55-8.

Olney JW, Zorumski CF, Stewart GR, Price MT, Wang GJ, Labruyere J. (1990). Excitotoxicity of L-dopa and 6-OH-dopa: implications for Parkinson's and Huntington's diseases. *Exp Neurol.* 108: 269-72.

Oz E, Erbas D, Gelir E, Aricioglu A.(1999) Taurine and calcium interaction in protection of myocardium exposed to ischemic reperfusion injury. *Gen Pharmacol.* 33:137-41.

Parcell S. (2002) Sulfur in human nutrition and applications in medicine. *Altern Med Rev.* 7:22-44.

Pardo B, Mena MA, Casarejos MJ, Paino CL, De Yebenes JG. (1995). Toxic effects of L-DOPA on mesencephalic cell cultures: protection with antioxidants. *Brain Res.* 682: 133-43.

Pasantes-Morales H. (1993) Aminoácidos y aminas biogénicas en el sistema nervioso central: metabolismo y regulación. En *Comunicación Neuroendocrina: Bases celulares y moleculares*. Sociedad de Ciencias Fisiológicas, A.C. México.

Pasantes-Morales H, Martín del Río R. (1990) Taurine and mechanisms of cell volume regulation. *Prog Clin Biol Res.* 351:317-28.

Pasantes-Morales H. Schousboe A. (1988) Volume regulation in astrocytes: a role of taurine as osmoeffector. *J Neurosci Res* 20:505-509

Perry TL, Yong VW, Ito M, Foulks JG, Wall RA, Godin DV, Clavier RM. (1984). Nigrostriatal dopaminergic neurons remain undamaged in rats given high doses of L-DOPA and carbidopa chronically. *J Neurochem.* 43: 990-3.

Purves et. al. (1997). *Invitación a la Neurociencia*. Edit. Panamericana. México. 362p.

Quesada O, Picones A, Pasantes-Morales H. (1988) Effect of light deprivation on the ERG responses of taurine-deficient rats. *Exp Eye Res.* 46:13-20.

Shiman R, Akino M, Kaufman S (1971). Solubilization and partial purification of tyrosine hydroxylase from bovine adrenal medulla. *J. Biol. Chem.* 246: 1330-1340.

Quinn N, Parkes D, Janota I, Marsden CD. (1986). Preservation of the substantia nigra and locus coeruleus in a patient receiving levodopa (2 kg) plus decarboxylase inhibitor over a four-year period. *Mov Disord.* 1: 65-8.

Shridi F, Robak J. (1988) The influence of calcium channel blockers on superoxide anions. *Pharmacol Res Commun.* 20:13-21.

Smith TS, Parker WD Jr, Bennett JP Jr. 1994. L-dopa increases nigral production of hydroxyl radicals in vivo: potential L-dopa toxicity? *Neuroreport.* 5: 1009-11.

Spencer JP, Jenner A, Aruoma OI, Evans PJ, Kaur H, Dexter DT, Jenner P, Lees AJ, Marsden DC, Halliwell B. (1994). Intense oxidative DNA damage promoted by L-dopa and its metabolites. Implications for neurodegenerative disease. *FEBS Lett.* 353: 246-50.

Steece-Collier K, Collier TJ, Sladek CD, Sladek JR Jr. (1990). Chronic levodopa impairs morphological development of grafted embryonic dopamine neurons. *Exp Neurol.* 110: 201-8.

Tabet F, Savoia C, Schiffrin EL, Touyz RM. (2004) Differential calcium

regulation by hydrogen peroxide and superoxide in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 44:200-8.

Triggle DJ. (1991) Calcium-channel drugs: structure-function relationships and selectivity of action. *J Cardiovasc Pharmacol.* 18 Suppl 10:S1-6.

Tseng WP, Lin-Shiau SY. (2003) Calcium-activated NO production plays a role in neuronal death induced by beta-bungarotoxin in primary cultures of cerebellar granular neurons. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 367:451-61.

Walkinshaw G, Waters CM. (1995). Induction of apoptosis in catecholaminergic PC12 cells by L-DOPA. Implications for the treatment of Parkinson's disease. *J Clin Invest.* 95: 2458-64.

Yahr M. D, Duvoisin R. C. (1972). Drug therapy of parkinsonism. *N. Engl. J. Med.* 287: 20-24.

Ziv I, Melamed E, Nardi N, Luria D, Achiron A, Offen D, Barzilai A. (1994). Dopamine induces apoptosis-like cell death in cultured chick sympathetic neurons--a possible novel pathogenetic mechanism in Parkinson's disease. *Neurosci Lett.* 170: 136-40.