



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS
FACULTAD DE MEDICINA**

**EFFECTOS DEL ESTRÉS OXIDATIVO CAUSADO POR EXPOSICIÓN CRÓNICA A
OZONO SOBRE LA VÍA METABOLICA DE LA DOPAMINA EN RATAS**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS

PRESENTA

M. en C. ALFONSO DARÍO SANTIAGO LÓPEZ

TUTORA: DRA. SELVA RIVAS ARANCIBIA



Facultad de Medicina



Año: 2011



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.

PDCB/grad/ 034Jur/2010


DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ
DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACIÓN
ESCOLAR, UNAM
Presente.

Nos permitimos informarle que con base al Artículo 31 del RGEP el Comité Académico de **DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**, en su reunión 260ª del 02 de junio de 2010, designó el siguiente jurado para examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** de **ALFONSO DARIO SANTIAGO LOPEZ**, con número de cuenta **9456532-6**, con la tesis titulada **"EFECTO DEL ESTRÉS OXIDATIVO CAUSADO POR LA EXPOSICIÓN CRÓNICA A OZONO SOBRE LA VÍA METABOLICA DE LA DOPAMINA EN RATAS"**, dirigida por la Dra. Selva Rivas Arancibia.

Presidente: Dra. María Luisa Fanjul Peña de Moles
Secretario: Dr. Selva Rivas Arancibia
Vocal: Dr. Julio Eduardo Roque Morán Andrade
Vocal: Dra. Gina Lorena Quirarte Q.
Vocal: Dr. Luis Camilo Rios Castañeda

Atentamente

"Por mi raza hablará el espíritu"
Cd. Universitaria, a 03 de junio de 2010.


DRA. YOLANDA LÓPEZ VIDAL
RESPONSABLE
FACULTAD DE MEDICINA


DR. FEDERICO MARTÍNEZ MONTES
COORDINADOR DEL PROGRAMA

C.c.p Lic. Balfred Santaella Hinojosa, Coordinador de la Unidad de Administración Escolar del Posgrado, UNAM
Tutor (a) Dra. Selva Rivas Arancibia.
Coordinación de PDCB

MMF/YLV/evb

AGRADECIMENTOS

Quiero agradecer a la Dra. Martha Aguilar Martínez, del laboratorio de Electroquímica Molecular, de la facultad de Química, su generoso apoyo para la realización de este proyecto. Así mismo destacar que los experimentos de Voltamperometría Cíclica fueron realizados en dicho laboratorio, en los cuales participaron el Dr. José Antonio Bautista y la M. en C. Carmen Ileana Reyes Hernández.
A todos ellos mi más profundo agradecimiento.

Así mismo quiero agradecer el apoyo de CONACYT: 186567, así mismo DGAPA: IN2215408 y CONACYT: 49796-Q.

AGRADECIMIENTOS

A todos mis seres queridos: familiares, amigos, tutores, compañeros y estudiantes que acompañaron y que de una manera u otra apoyaron siempre la realización de este proyecto.
Mil Gracias.

ÍNDICE

Páginas

I RESUMEN	1
II INTRODUCCION	
2. 1 Enfermedad de Parkinson	4
2. 2 Fisiopatología	6
2.3 Vías metabólicas de la dopamina	6
2. 4 Tirosina hidroxilasa	8
2. 5 Neuromelanina	12
2.6 Generación de especies reactivas.....	20
2. 7 ¿Por qué se acumula el hierro en PD?.....	21
2.8 Sistemas antioxidantes	21
2.9 Barrera hematoencefálica (BHE).....	26
2.9.1 BHE y líquido extracelular.....	26
2.9.2 Desarrollo de la BHE.....	27
2.9.3 Componentes estructurales de la BHE.....	27
2.9.4 Integridad estructural de la BHE.....	31
2.9.5 Transportadores de BHE.....	32
2.9.6 Catecolaminas y BHE.....	33
2.9.7 Dopamina (DA) Un caso singular BHE.....	34
2.9.8 Alteraciones de la BHE.....	35
2.9.9 Estrés oxidativo y la alteración de la BHE.....	36
III ANTECEDENTES	
3.1 Estrés oxidativo y enfermedad de Parkinson	38

3.2 Modelos experimentales de la enfermedad de Parkinson	39
3.3 Modelo de la enfermedad de Parkinson producido por estrés oxidativo causado por exposición a ozono	40
3.4 Alteraciones bioquímicas, histológicas y conductuales causadas por ozono	40
3.5 Metabolismo de DA.....	41
3.5.1 Biosíntesis de DA.....	41
3.5.2 Almacenamiento, liberación y recaptura de DA.....	44
3.5.3 Degradación enzimática de DA.....	45
3.6 Oxidación de catecolaminas.....	46
3.7 Toxicidad del metabolismo de DA.....	46
3.8 Quinonas de DA.....	47
3.9 Voltamperometría cíclica	47
IV JUSTIFICACIÓN	52
4.1 Modelo de daño por ozono	55
4.2 justificación de la técnica.....	56
V HIPÓTESIS	58
VI OBJETIVO	59
VII METODOLOGÍA	60
VIII RESULTADOS	66
IX DISCUSION	87
X CONCLUSIONES	98
XI PERSPECTIVAS	99
XII REFERENCIAS	100

I. RESUMEN

El estado de estrés oxidativo es un fenómeno biológico, que se presenta cuando se incrementa excesivamente la producción de radicales libres en especies reactivas y disminuyen los sistemas antioxidantes endógenos, esta pérdida del balance de óxido reducción en el organismo puede producir un daño celular severo e incluso lleva a la muerte celular. El estado de estrés oxidativo desempeña un papel importante en muchos padecimientos y enfermedades neurodegenerativas. Una de estas enfermedades es el mal de Parkinson (PD), en la cual los metabolitos oxidados de la dopamina (DA) desempeñan un papel fundamental en la evolución de la enfermedad.

El aumento de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS respectivamente), provoca un aumento en la oxidación de la DA, autooxidación de catecolaminas en el sistema nervioso central (SNC), la formación del radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), la producción de quinonas de DA (DAQ), la liberación y oxidación de metales de transición como hierro y cobre (Fe, Cu), aumento de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo ($\cdot OH$), así como daño a proteínas vía ataques nucleofílicos sobre sus cadenas expuestas. Las DAQ pueden reaccionar con la cisteína y producir residuos de cisteinil, estos residuos son capaces de inhibir la función de muchas proteínas y producir disminución de ATP por bloqueo de la cadena respiratoria.

Por otra parte se ha demostrado que la exposición repetida a bajas dosis de ozono (O_3), induce un estado de estrés oxidativo el cual provoca daño oxidativo en el cerebro de ratas expuestas a este gas, en nuestro laboratorio hemos demostrado que el estado de estrés oxidativo altera procesos plásticos celulares, produce aumento en los niveles de lípidos peroxidados, pérdida de espinas dendríticas terciarias en neuronas, edema en la mitocondria, en el aparato de Golgi y en el retículo endoplásmico, incremento en los gránulos de lipofuscina, así como neuronas electrodensas en el bulbo olfatorio, hipocampo, estriado y corteza frontal.

Con el fin de establecer la participación del estrés oxidativo crónico sobre el daño a neuronas dopaminérgicas, así como el papel que tiene la formación de las DAQ durante el daño celular, en el presente estudio se evaluó la producción de metabolitos oxidados de la dopamina, producidos por estrés oxidativo sobre la muerte de neuronas de DA en la sustancia nigra (SN) y la peroxidación de lípidos en SN, en el cuerpo estriado (CE) y en plasma.

Los resultados indican que a medida aumenta el estrés oxidativo por un aumento en el número de días en que los animales se exponen a O_3 , se incrementa la cantidad de DA oxidada y por lo tanto también la formación de quinonas de dopamina (DAQ), por el contrario la dopamina reducida (DAH) disminuye. Esto establece un cambio en el índice entre la DA oxidada (DAO) y DA reducida (DAO/DAH), el cual está relacionado con la progresión del daño. Los niveles de lípidos peroxidados (LPO), en el CE, la SN y el plasma de ratas expuestas a O_3 también aumentan, conforme aumenta el tiempo de exposición a O_3 (15, 30 y 60 días). En cortes cerebrales de la sustancia nigra, la inmunoreactividad

contra la presencia de DA indica una disminución en el número de células dopaminérgicas por campo, a medida que aumenta el estrés oxidativo causado por exposición a O₃. El aumento progresivo en los niveles de dopamina oxidada, lleva a la formación de quinonas de dopamina, las cuales, son uno de los factores críticos involucrados en el daño progresivo a las neuronas dopaminérgicas. Por otra parte, los resultados demuestran que el estrés oxidativo por sí mismo, es capaz de inducir un proceso de neurodegeneración progresiva en la sustancia nigra de animales sanos, similar a lo que ocurre en la enfermedad de Parkinson.

ABSTRAC

The oxidative stress state is a biological phenomenon that occurs when the production of free radicals in reactive species increases excessively and the endogenous antioxidant systems decrease, this loss on the oxide-reduction balance in the body can cause severe cellular damage and even leads to cell death. The oxidative stress state plays an important role in many conditions and neurodegenerative diseases. One of such diseases is Parkinson's disease (PD), in which the oxidized metabolites of dopamine (DA) play an essential role in the evolution of the disease.

The Increased reactive oxygen species and nitrogen (ROS and RNS, respectively), causes an increase in DA oxidation, autoxidation of catecholamines in the central nervous system (CNS), the formation of superoxide radical (O_2^-) production of DA quinone (DAQ), release and oxidation of transition metals such as iron and copper (Fe, Cu), increased hydrogen peroxide (H_2O_2) and hydroxyl radical ($\cdot OH$), as well as damage to proteins via nucleophilic attack on their chains exposed. The DAQ can react with cysteine to produce cysteinyl residues, these residues are able to inhibit the function of many proteins and result in lowering of ATP by blocking the respiratory chain.

On the other hand repeated exposure of rats at low doses of ozone (O_3), has shown induces a state of oxidative stress which causes oxidative damage in the brain. In our laboratory we have shown that the stress state: alters oxidative cellular plastics processes, increases the levels of lipid peroxidation, lipofuscin granules and neurons electron lucent in the olfactory bulb, hippocampus, striatum and frontal cortex, loss of tertiary dendritic spines in neuron, edema in the mitochondria, the Golgi apparatus and in to endoplasmic reticulum. To determine both, the role of chronic oxidative stress on the damage to dopaminergic neurons and the role of the formation of DAQ has on the cellular damage, in the present study we evaluated the production of oxidized metabolites of dopamine produced by oxidative stress on the death of DA neurons in the substantia nigra (SN) and the SN lipid peroxidation in the striatum (CE) and in the plasma.

The results indicate that as long as the oxidative stress was increased by an increase in the number of days that animals exposed to O_3 , DA increases the amount of oxidized and therefore also the formation of dopamine quinone (DAQ) but In contrast reduced dopamine (DAH) decreases. This establishes a change in the ratio between the oxidized DA (DAO) and reduced DA (DAO / DHA), which is related to the progression of damage. The levels of lipid peroxidation (LPO) in the EC, the SN and plasma of rats exposed to O_3 also increase, with increasing time of exposure to O_3 (15, 30 and 60 days). In brain slices of the substantia nigra, immunoreactivity against the presence of DA indicates a decrease in the number of dopaminergic cells per field, with increasing oxidative stress caused by exposure to O_3 . The gradual increase in levels of oxidized dopamine, leading to the formation of dopamine quinones, which are one of the critical factors involved in progressive damage to dopamine neurons. Moreover, the results show that oxidative stress itself can induce a process of progressive neurodegeneration in the substantia nigra of healthy animals, similar to what occurs in Parkinson's disease.

II. INTRODUCCIÓN

2.1 Enfermedad de Parkinson (PD)

-El lagarto-

“Me he convertido en un lagarto comenzó diciendo, un gran lagarto paralizado en un mundo oscuro, frío y extraño. Era un hombre alto y delgado de unos sesenta años, pero que, como la mayoría de los pacientes con esta enfermedad, parecía mucho mayor de lo que era. No hacía muchos años, había sido un hombre de negocios, activo y enérgico. Entonces sucedió -no de golpe, no bruscamente; sino lenta, sutil, insidiosamente- Ahora se había vuelto como un hombre de granito, caminaba con pasos lentos, arrastrando los pies y hablando con susurro monótono”

John PJ Pintel

La enfermedad de Parkinson (PD), es un trastorno motor que ocurre entre las tres cuartas partes de la vida y el envejecimiento. Afecta alrededor del 0.5% de la población, así mismo, es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común, afecta a una de cada 1.000 personas en el mundo (Strickland y Bertoni, 2004; Thomas, 2009). Los estudios sugieren que es unas 2.5 veces más prevalente en los varones que en las mujeres (Sawada y Shimohama., 2000; Wooten y cols., 2004), Este padecimiento fue descrito por primera vez por James Parkinson en 1917 con el nombre de *parálisis agitante* o *“parálisis temblorosa”* (Tanner y Goldman , 1996). Aunque la PD ya no se considera un trastorno motor complejo, caracterizado por parkinsonismo, sino más bien una enfermedad sistémica, con variados déficits motores, (que incluyen discapacidad olfativa, trastornos del sueño, anormalidades gastrointestinales y urinarias, así como disfunción vascular, dolor, depresión y trastornos musculares) (Isidre y cols., 2010), los componentes neurológicos siguen siendo un aspecto importante a considerar en el estudio de la PD, de tal manera que a nivel histológico, las características más importantes de la PD son, la pérdida de las neuronas dopaminérgicas pigmentadas de la

parte compacta de la sustancia nigra y la aparición de inclusiones intracelulares llamadas cuerpos de Lewy (Giba, 1992; Braak y cols., 2003; Thomas, 2009).

La pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas es un resultado del envejecimiento natural, a razón de 7% por década de entre los 10 y 80 años (McGeer y cols., 1977), en promedio se han muerto el 50% de las neuronas dopaminérgicas al llegar a los 80 años sin distinción de sexos. Sin embargo en pacientes con PD hay una pérdida de 70-80% de neuronas dopaminérgicas del sistema nigroestriatal (Bernheimer y cols., 1973; Agid, 1991; Heinz -Wolfgang, 2008).

Además se ha estimado que el 80% de la DA cerebral se localiza en el estriado a una concentración de 85-100ng/mg de proteína (Versteeg y cols., 1976). La muerte de neuronas dopaminérgicas del sistema nigroestriatal está acompañada por una disminución en los niveles de DA en el estriado, el cual es responsable de la mayoría de los síntomas de la PD (Bernheimer y cols., 1973; Fahn, 1989; Shankar - Julie, 2008).

Los síntomas iniciales del PD son moderados, inician con ligera rigidez y temblor en los dedos, pero gradualmente van aumentando en gravedad con el paso de los años. Los síntomas más frecuentes del trastorno son: temblor, que se intensifica durante la inactividad pero no aparece durante el movimiento voluntario o el sueño, rigidez muscular, rostro con aspecto de mascara, dificultad para iniciar los movimientos, así como pérdida del reflejo postural y lentitud de movimientos, a menudo se manifiestan dolor y depresión antes de que los síntomas motores lleguen a ser graves (Agid, 1991).

2.2 Fisiopatología

El déficit primario es la pérdida de las neuronas de la sustancia nigra parte compacta, que brindan inervación dopaminérgica al cuerpo estriado (núcleo caudado y putamen). Se ha demostrado que una reducción de 80% del contenido de DA en el cuerpo estriado, está relacionado a la pérdida de alrededor de 80% de neuronas dopaminérgicas, lo cual sugiere que la restitución de DA, restablece la funcionalidad dopaminérgica (Hornykiewicz, 1973, Delle y cols., 2008). Estas observaciones básicas han orientado las investigaciones hacia el metabolismo y efectos de la DA y sobre todo para comprender el efecto que tiene el déficit de DA en los ganglios basales de un paciente con PD.

2.3 Vías metabólicas de la dopamina

La dopamina (3,4-dihidroxifeniletilamina; 3-hidroxitiramina), es un neurotransmisor endógeno distribuido en el cerebro medio en cantidades importantes, este neurotransmisor está limitado a áreas específicas en el cerebro, donde existen un gran número de terminales neuronales que contienen DA (Gerlach y cols., 1996). La mayoría de las neuronas que contienen DA se localizan en el cerebro medio y pertenecen a una de las cuatro vías dopaminérgicas: la vía nigroestriatal, la vía mesolímbica, la vía tuberoinfundibular y la vía mesocortical.

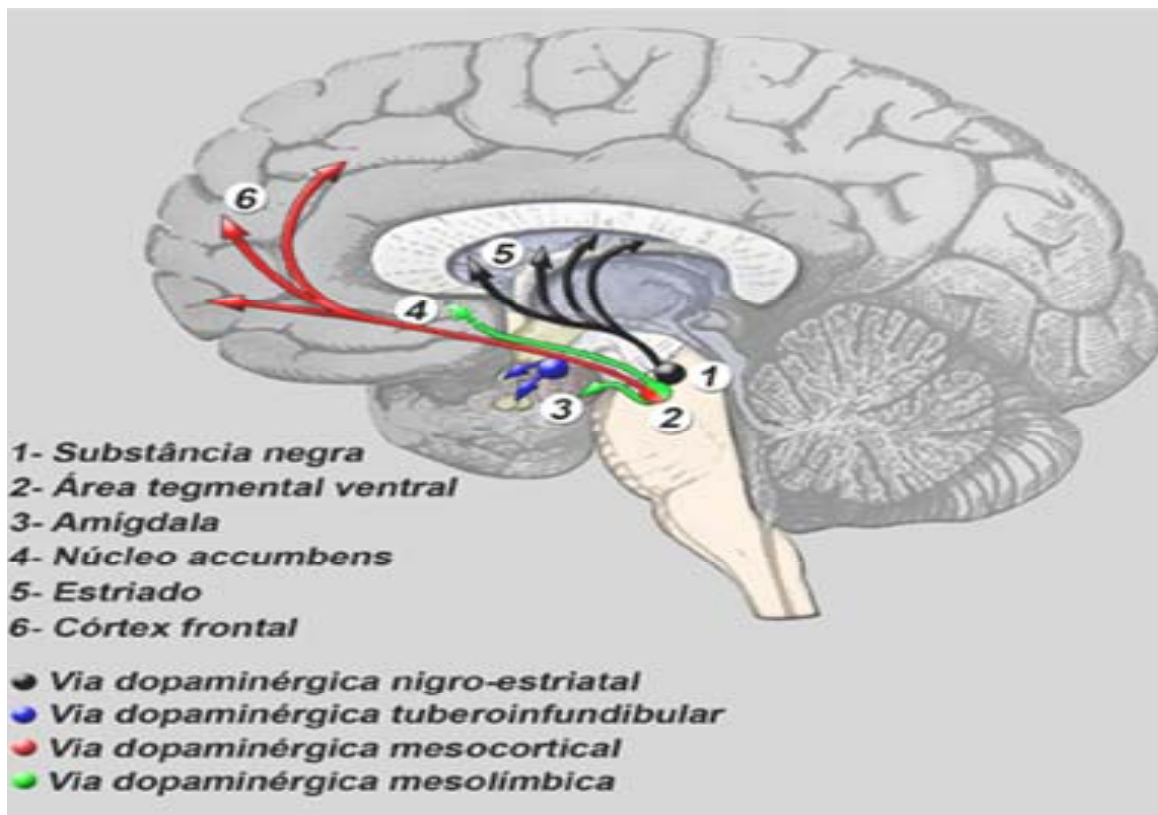


Figura 1. Vías dopaminérgicas, por colores se aprecian las 4 diferentes vías dopaminérgicas y las diferentes regiones involucradas.

El sistema dopaminérgico nigroestriatal está constituido de neuronas espinosas de tamaño medio, estas tienen sus cuerpos celulares localizados en la parte compacta de la sustancia negra y le envían sus axones al núcleo caudado y putamen (cuerpo estriado).

La vía mesocortical: Nace en el cerebro medio (área ventral tegmental), cercana a la sustancia negra parte compacta y los axones de esas neuronas inervan, regiones circunscritas del telencéfalo que incluye parte del sistema límbico y hasta la corteza frontal, en regiones asociadas con procesos cognitivos (memoria y control emocional).

La vía mesolímbica, tiene su origen también en el área ventral tegmental, pero a diferencia de la vía mesocortical, donde las fibras neuronales inervan a parte de sistema límbico y hasta corteza, aquí solo llegan a parte de sistema límbico (núcleo acumbens y amígdala), por medio del núcleo acuminado, la amígdala y el hipocampo, cuyas zonas están asociadas a los centros los centros de placer y recompensa.

Finalmente al sistema tuberoinfundibular pertenecen un grupo de neuronas que nacen en el núcleo arqueado del hipotálamo mediobasal, llamada también región tuberal, que llevan sus fibras a la eminencia media o región infundibular (de ahí el nombre), cuya porción es la región más inferior del hipotálamo regulando la secreción de prolactina en la adenohipófisis .

2.4 Tirosina hidroxilasa (TH)

El primer paso en la síntesis de la DA y de las otras catecolaminas es la hidroxilación de L-tyr a L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA). Esta reacción es catalizada por la enzima tirosina 3-monooxigenasa, el cual es llamada comúnmente como tirosina hidroxilasa (TH) (Figura 2). Donde los átomos de hidrogeno y oxígeno, constituyen el nuevo grupo hidroxilo, que son donados por el oxígeno molecular (O_2) y por el cofactor tetrahidrobiopteridina reducida (BH_4). Una segunda reacción produce H_2O y dihidrobiopteridina quinonoide oxidada (DH_2). Consecuentemente la DH_2 se regenera nuevamente a BH_4 gracias a la nicotin adenina dinucleotido reducido (NADH), que dona su protón y a la dihidrobiopteridina reductasa (Feldman y cols., 1997; Ali y cols., 2005; Nakashima y cols., 2009) (Figura 3).

La TH es una enzima que aparentemente existe tanto en forma soluble (citoplasmica) como particulada (enlazada a la membrana). La TH es una monooxigenasa dependiente de pteridinas, y requiere de tirosina y oxígeno molecular como sustrato y de (6R)-L-Eritro-tetrahidrobiopteridina (BH₄) mas ión Ferroso (Fe²⁺), como cofactor. La TH es un homotetrámero compuesto de 4 subunidades idénticas de 60KDa, cada una con un BH₄ y Fe²⁺. Se han caracterizado cuatro isoformas de TH, que difieren por sus propiedades cinéticas (hTH1, hTH2, hTH3 y hTH4) (Feldman y cols., 1997; Nakashima y cols., 2009). Las cuatro isoformas son producidas a partir de un único gen por splicing alternativo de la mRNA en la N-terminal. Un dominio catalítico se encuentra en el C-terminal de las dos terceras partes de la molécula, mientras que la parte que tiene el control enzimático se asigna al extremo N-terminal como el dominio regulador. Grima y cols., en 1987, descubrieron que las cuatro regiones principales de codificación son constantes en las cuatro isoformas de TH, pero diferentes en el extremo N terminal, cada uno de ellos puede codificar una molécula de TH similar pero en realidad diferente. Los tipos 2 y 3 contienen secuencias de ARNm de 12 pb y 81 pb, respectivamente y entre 90 y 91 nucleótidos son los mismos que en el tipo 1. En el tipo 4 el mRNA tiene una secuencia de 93 pb, compuesto por secuencias de 12 y 81 pb que se insertan en la misma posición que del tipo 1. Las isoformas de tipo 1 y 2, son las que se encuentran en mayor cantidad en el cerebro humano y las del tipo 3 y 4 en mucha menor cantidad (Nagatsu, 1995). La actividad está regulada en el corto plazo mediante la inhibición por retroalimentación de las catecolaminas, en competencia con la tetrahidrobiopteridinas y por la activación y desactivación debido a la fosforilación y desfosforilación, principalmente en Ser 19 y Ser 40 de hTH1. Adicionalmente las múltiples isoformas en los seres humanos y los monos tienen fosforilaciones adicionales, dando lugar a una

regulación más sutil. En la regulación de largo plazo bajo condiciones de estrés, la proteína de TH es inducida. CRE y AP1 en la región 5' del gen de la TH puede ser de los principales elementos funcionales para la expresión génica de TH.

Por otra parte la TH puede estar estrechamente relacionada con la patogenia de PD (Nagatsu, 1995). Se han hallado niveles marcadamente disminuidos de mRNA de todas las isoformas (hTH1-4) en cerebros humanos posmortem de pacientes con PD, en neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra, (Nakashima y cols., 2009).

La TH es la enzima que limita la síntesis de la DA, probablemente por que su velocidad máxima es más baja que de cualquier otra enzima de la síntesis de las catecolaminas. Por lo tanto, para inhibir la síntesis de catecolaminas, basta con inhibir la TH. Generalmente la TH actúa por uno de los tres mecanismos: 1) por quelación de los iones Fe^{2+} , 2) por competencia al sitio de enlace a las pteridinas, o 3) por competencia al sitio de enlace a Tyr. (Feldman y cols., 1997).

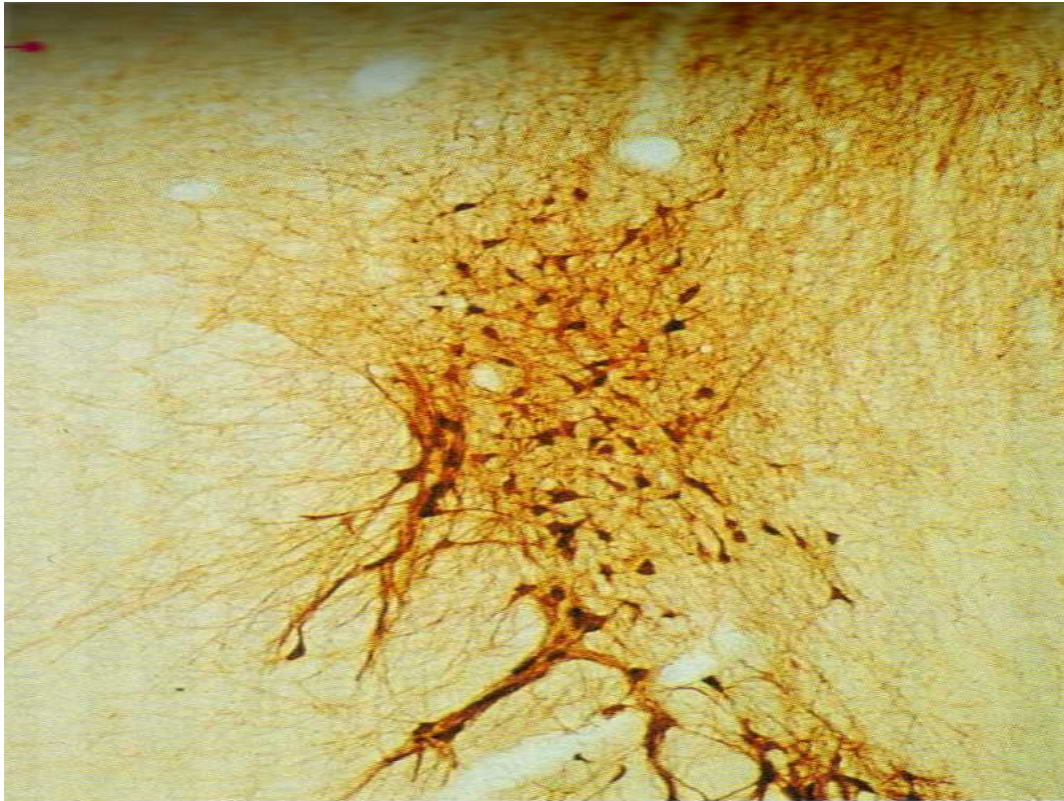


Figura 2. Inmunohistoquímica contra TH, en un corte de sustancia nigra de un cerebro de rata. Donde se muestran las fibras dopaminérgicas de color café (100x).

Posteriormente, sigue la formación de la DA, a partir de L-DOPA. Esto ocurre vía la remoción del grupo carboxilo del lado de la cadena donde está el carbón- α , con la consecuente liberación de CO₂ libre. La descarboxilación de L-DOPA, esta catalizada por la enzima aminoácido L- aromático descarboxilasa (AADC), una enzima hidrosoluble que requiere de 5'-fosfato de piridoxal (derivado de la vitamina B₆), como un cofactor. En las neuronas dopaminérgicas, este es el paso final en la biosíntesis (Feldman y cols., 1997; Qi Xu, y cols., 2008).

Como su nombre lo dice, la AADC actúa sobre una variedad de aminoácidos aromáticos además de L-DOPA. Por ejemplo cuando actúa sobre tirosina, puede formar la tiramina, la cual puede ser tomada y liberada por las terminales catecolaminérgicas en un

fenómeno llamado “Falsa transmisión”, este fenómeno se presenta sobre todo en pacientes tratados con inhibidores de MAO. Adicionalmente la AADC se encuentra en muchos tejidos incluyendo el cerebro, el hígado, el estómago y el riñón. La presencia de la enzima fuera del sistema nervioso sugiere otras funciones aún no descritas con precisión. La AADC puede ser inhibida por algunas drogas como la carbidopa, la inhibición de esta enzima, causa la acumulación de L-DOPA en el cerebro (Feldman y cols., 1997).

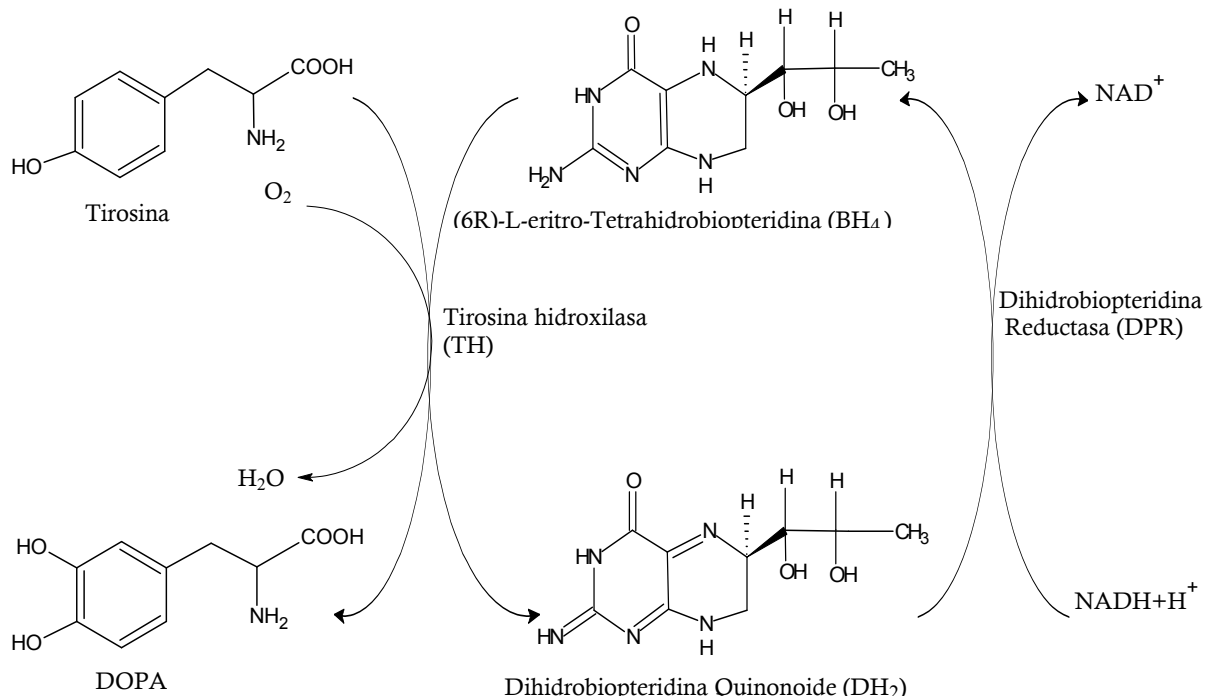


Figura 3.0 Paso de conversión de L-Tyr a L-DOPA, debido a la acción de TH y BH₄

2.5 Neuromelanina

La sustancia nigra es un área pequeña del mesencéfalo humano y es importante para el control de los movimientos. Se llama así porque las neuronas de esta zona contienen una sustancia de color negro que da al tejido un tono oscuro. La pérdida de este

pigmento oscuro y la palidez resultante de la sustancia nigra es una de las características patológicas de la PD (Figura 4). La neuromelanina es un pigmento que se halla en el citoplasma de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra y el locus coeruleus del cerebro humano. Es detectable a los pocos años del nacimiento y se acumula por todo el citoplasma en gránulos asociados a la lipofuscina.

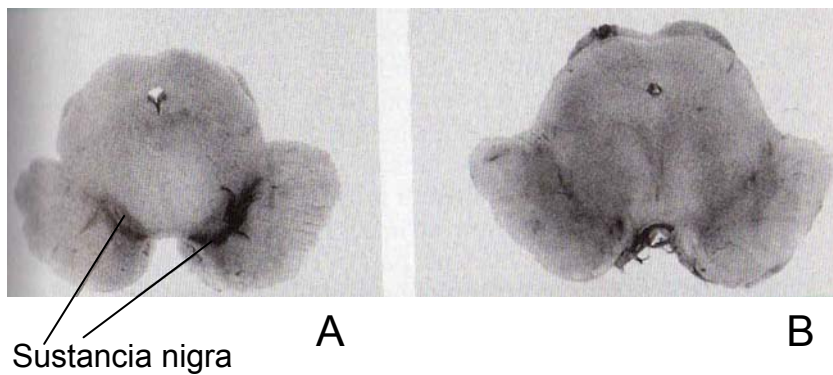


Figura 4. Cortes posmortens dela sustancia nigra de (A) Sujeto sano y (B) sujeto con Parkinson, donde se aprecia la pérdida de la sustancia nigra. (Tomado de Bear, 2002).

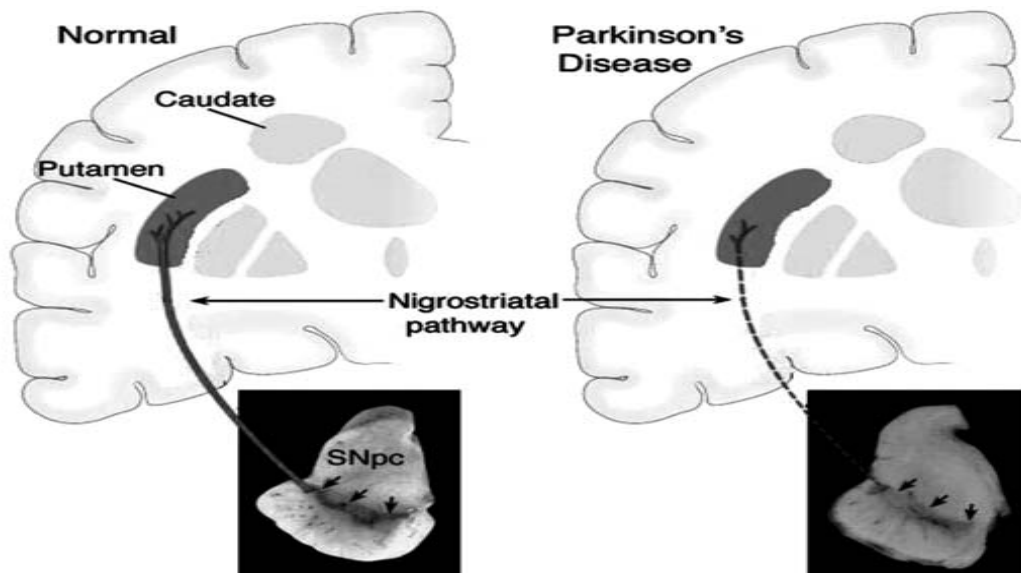
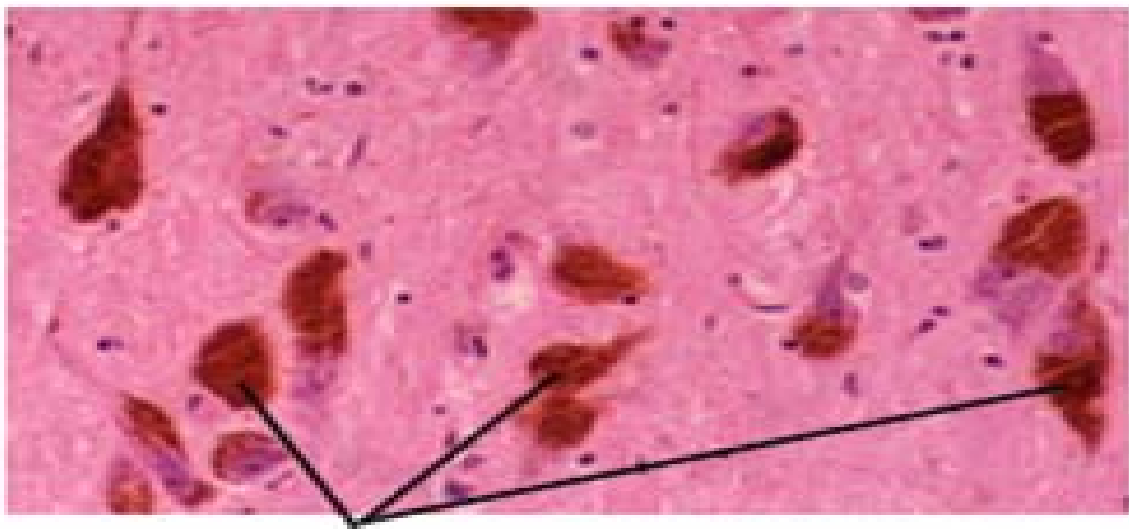


Figura 5. Esquema que representa la comparación de cortes nigrales, entre un cerebro sano y uno con PD, (tomado de Andreas Hald y cols., 2007).

Se considera generalmente que las dos formas principales de neuromelanina son producto de la autooxidación espontánea de la dopamina en sustancia nigra. La polimerización de las catecolaminas y sus productos de oxidación representan una tercera vía, probablemente menor, para el metabolismo de las catecolaminas, además de las vías metabólicas clásicas de desaminación catalizada por la monoaminoxidasa (MAO) y *O*-metilación catalizada por la catecol-*O*-metiltransferasa (COMT).



Células nerviosas de la sustancia nigra, que contienen pigmentos de melanina café oscuro

Figura 6. Microfotografía de la sustancia nigra humana normal parte compacta, teñida con hematoxilina y eosina. La neuromelanina teñida se observa en forma de gránulos café-oscuro, dentro de las células dopaminérgicas.

No se conoce la vía exacta de formación de neuromelanina, pero diversos investigadores han propuesto que se genera *in vivo* a través de una vía oxidante después de la hidroxilación de la tirosina para formar 3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA). Este paso inicial es catalizado por la TH y se trata de la fase que limita la producción de dopamina. La L-DOPA es descarboxilada a través de la dopa descarboxilasa para formar

el transmisor nativo o se oxida en fases progresivas para formar varios productos intermedios de vida corta, algunos de los cuales pueden ser incorporados al polímero final de melanina, tal como se describe a continuación:

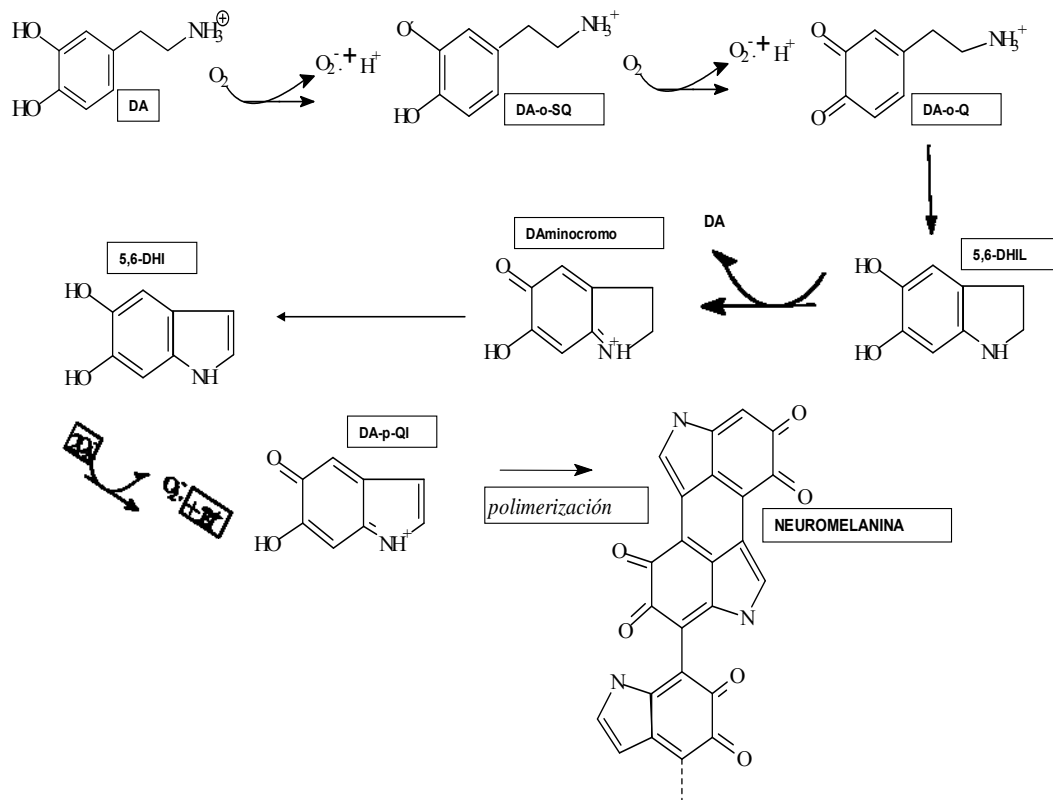


Figura 7. Una posible vía de formación de neuromelanina en la sustancia nigra iniciada por la oxidación progresiva del precursor de la dopamina, levodopa, para formar una serie de productos oxidados de la dopamina que llegan a constituir el polímero final de neuromelanina basado en la dopamina.

El complejo polimérico resultante parece estar compuesto de los aminocromos dopaminocromo y noracromo en la sustancia nigra y el locus coeruleus respectivamente (Smythies, 1996; Zecca y cols., 2008). La neuromelanina de la sustancia nigra, parece ser un copolímero de las dos clases principales de melanina, las eumelaninas insolubles de color negro compuestas por monómeros de indoles y la feomelanina soluble en

álcalis, de color marrón, formada a partir de productos de la cisteinildOPA (cisDOPA) oxidada (William y cols., 2006; Zhang y cols., 1994; Carstam y cols., 1991; Graham, 1978). Por otra parte, se ha sugerido que también están presentes el metabolito dopaminérgico 5-*S*-cisteinildopamina (cisDA), derivado del producto intermedio de la *O*-quinona por adición de L-cisteína o glutatión, y la DA en la forma no cíclica (Graham, 1978; Smythies, 1996; Ikuko y Masato, 2008). Aunque otro trabajo sugiere que la cisDA no se incorpora a la neuromelanina (Rosengren y cols., 1985). Otros estudios han demostrado que la neuromelanina se forma principalmente a partir de una estructura de cadena alifática y un eje central más pequeño de estructuras aromáticas, que posiblemente procede de los productos oxidativos de la dopamina. Zecca y cols., en 1992, detectaron la presencia de compuestos alquilos de cadena larga en la neuromelanina humana, sugiriendo que la neuromelanina humana consiste de anillos indoles unidos a mitades de lípidos de cadena larga. La resonancia magnética del estado sólido indicó la presencia de una matriz glucídica y lipídica. Los anillos de indoles pueden identificarse como cisDA, formada a partir del acoplamiento oxidativo de la cisteína a la dopamina, ya que este compuesto se ha detectado en la sustancia nigra (Zhang, 1994). Sin embargo, Carstam y cols., en 1991 sugirieron que los grupos indólicos en la neuromelanina son identificables como cisDA sólo y que el metabolito relacionado y precursor de la feomelanina cisDOPA no está presente. Ello sugiere que el precursor de DA, además de pequeñas cantidades de dopamina reducida (DAH), pueden incorporarse directamente al polímero. La neuromelanina puede unirse a una serie de metales, añadiendo un elemento inorgánico a lo que es en esencia un polímero orgánico. Se ha encontrado que el 7% de la neuromelanina aislada consta de elementos inorgánicos, incluyendo Fe, Cu, Zn y Cr (Zecca, y cols., 1992; Zecca, y Swartz, 1993; Qi

Xu y cols., 2008), además se ha detectado un 2,8% de hierro en neuromelanina humana aislada (Gerlach y cols., 1995), el hierro en estado férrico (Fe^{3+}) se ha calculado en 6,780 ng de hierro/mg de tejido de sustancia nigra intacta o 11.300 ng de hierro/mg de neuromelanina aislada con resonancia paramagnética de electrones (Shima, y cols., 1997). Por otra parte, el hierro se une directamente a los gránulos de neuromelanina en la sustancia nigra (Zecca y cols., 1993; Jellinger y cols., 1992; Good y cols., 1992; Zecca y cols., 1996; Youdim y cols., 1994). Zecca y Qi Xu han propuesto que la neuromelanina puede ser una espada de doble filo, un mecanismo celular que puede cambiar de comportamiento según el entorno celular, de tal forma que la neuromelanina podría actuar como un quelante, eliminando sustancias posiblemente dañinas del entorno celular activo (Zecca, y cols., 2008; Qi Xu, y cols., 2008). Sin embargo, en la enfermedad de Parkinson, el hierro reviste especial interés porque existe un aumento de las concentraciones de hierro (Fe^{2+}) en la sustancia nigra de estos enfermos (Gerlach, y cols., 1994; Qi Xu, y cols., 2008; Zecca y cols., 2008). En presencia de hierro, cambia el comportamiento de la neuromelanina: en vez de inactivar radicales libres, empieza a actuar como un prooxidante eficaz (Sarna y cols., 1986; Pilas y cols. 1988; Xu, y cols., 2008; Zecca y cols., 2008), con lo cual se generan radicales libres dentro de las neuronas, al igual que el aumento específico del hierro en la sustancia nigra de los enfermos de Parkinson, en esta y otras enfermedades que cursan con estrés oxidativo, el incremento significativo del hierro tisular sólo se encuentra en las regiones cerebrales en proceso de degeneración. El aumento del hierro en la sustancia nigra sólo se asocia a neurodegeneración avanzada y no se observa en las fases tempranas de la enfermedad de Parkinson (Jenner, 1993; Bobby y Beal, 2007), lo cual sugiere que el aumento de hierro puede ser secundario a un desencadenante inicial desconocido.

Como región cerebral dopaminérgica, la sustancia nigra está constantemente expuesta a una tasa relativamente alta de producción de ROS. Tanto el metabolismo de la dopamina mediado por la MAO-B como su autooxidación producen peróxido de hidrógeno, un compuesto que suele ser inactivado por conversión a agua a través del sistema glutatión (Reacción 4). Mientras que las neuronas sanas cuentan con una serie de mecanismos para inactivar los radicales libres, las neuronas de pacientes con PD se caracterizan por una reducción de su capacidad antioxidante. De esta manera, la neurodegeneración en la sustancia nigra depende de tres factores principalmente:

Primero: tanto la síntesis como la degradación de la DA son en sí mismo un conjunto de reacciones de oxidación, así como la síntesis intraneuronal de neuromelanina.

Segundo: en la sustancia nigra, aumenta de forma considerable el hierro tisular que puede interactuar con la neuromelanina que se está formando.

Tercero: la producción posterior de radicales libres aumenta, superando las capacidades antioxidantes de estas neuronas en la enfermedad de Parkinson (Figura 8), (Shankar y Julie, 2008; Zhenquan y cols., 2008; Amany y Hala, 2008; Ikuko and Masato, 2008; Heinz y Wolfgang, 2008).

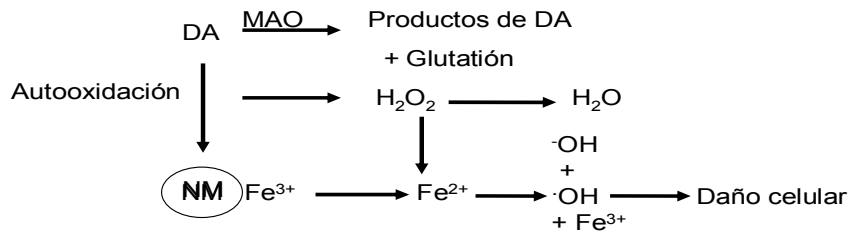


Figura 8. Esquema según el cual puede potenciarse la neurodegeneración en la sustancia nigra en enfermos con Parkinson.

La naturaleza de las células dopaminérgicas, tienen como resultado la formación de H₂O₂ a través de dos vías: 1) el metabolismo enzimático de la dopamina y 2) la autooxidación de la DA al pigmento con DA-neuromelanina (DA-NM). La interacción del hierro ferroso libre produce el radical hidroxilo, muy tóxico, que vía reacciones de Fenton atacan una serie de componentes celulares (membranas, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos), provocando daño celular (Yoshiro, 2007).

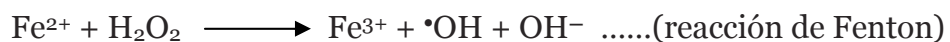
La NM se une al hierro férrico y de esta manera elimina al hierro libre del entorno celular, ejerciendo así un efecto protector sobre la célula, sin embargo la NM puede cambiar el estado redox del hierro férrico unido al estado ferroso, aumentando la interacción entre H₂O₂ y el hierro ferroso, unido a la NM o bien liberado por ella, elevando la producción radicales hidroxilo. De este modo ambos factores pueden contribuir al aumento de la carga oxidativa dentro de la sustancia nigra. Dado que las

fases iniciales de la enfermedad parecen caracterizarse por un cambio en los mecanismos celulares antioxidantes y que el aumento del hierro sólo se observa después del desarrollo de los signos neuropatológicos típicos de la enfermedad de Parkinson (cuerpos de Lewy y pérdida celular en la sustancia negra), probablemente la neuromelanina no es importante en la etiología primaria de la enfermedad de Parkinson, pero si contribuye de una manera fundamental a la progresión del daño y la muerte neuronal.

2.6 Generación de especies reactivas

La acumulación de hierro puede tener consecuencias especialmente graves en las neuronas dopaminérgicas, porque el metabolismo de la dopamina genera cantidades importantes de H₂O₂. El hierro ferroso (Fe²⁺) reacciona con el H₂O₂ a través de la reacción de Fenton para generar el radical hidroxilo (·OH), altamente reactivo y otros radicales citotóxicos. Así, el hierro puede contribuir al daño oxidativo que caracteriza a la PD. Además, los elevados niveles de hierro pueden desempeñar un papel en la acumulación de la α-sinucleína en las neuronas dopaminérgicas en la PD.

Existen dos tipos de reacciones que comúnmente se llevan a cabo en los ambientes biológicos:



En la reacción de Fenton, se requiere un metal de transición como elemento de reacción, no necesariamente debe ser hierro.

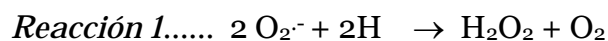
2.7 ¿Por qué se acumula hierro en PD?

Se ha sugerido que una proteína mitocondrial que contiene un grupo Fe-S, puede actuar como un "sensor" del estado del hierro mitocondrial (Rouault y Tong, 2005). Estas proteínas son extraordinariamente sensibles a los ataques de superóxido, que se genera por la disfunción del complejo I en el modelo de rotenona (Panov y cols., 2005) y probablemente en PD.

2.8 Sistemas antioxidantes en el sistema nervioso central

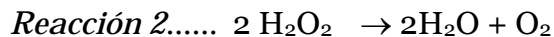
Dentro de las células existen sistemas que contrarrestan el incremento excesivo de especies oxidantes. Estas defensas antioxidantes se expresan cuando aumentan las especies reactivas y tratan de mantener el equilibrio redox para evitar que en las células se pierda el balance de oxido reducción y se llegue a un estado de estrés oxidativo (Valko y cols., 2007). Estos sistemas los podemos dividir en enzimáticos y no enzimáticos. Los sistemas antioxidantes enzimáticos se expresan en respuesta a un aumento en los radicales libres, estos incluyen a la superóxido dismutasa (SOD Cu/Zn y SOD Mn), la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (Gpx) y el sistema glutatión (glutatión reductasa, GSH) y el sistema tiorredoxin tiorredoxin–reductasa (Trx/TrxR).

En células eucariotas la SOD toma 2 moléculas de $O_2^{\cdot-}$ y las convierte a H_2O_2 de la siguiente manera:

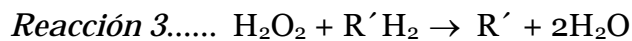


Esta reacción es eficiente en condiciones de equilibrio redox, solo limitada por la difusión, en la mitocondria es formada en altas concentraciones debido a la fuga de electrones de la cadena respiratoria (Valko y cols., 2007).

La CAT se encuentra predominantemente en los peroxisomas celulares en mamíferos y su función principal es catalizar al H_2O_2 a H_2O de la siguiente manera:



La CAT también puede detoxificar diferentes sustratos como fenoles, alcoholes, vía reducción acoplada a peróxido de hidrógeno:



La Gpx existe en 4 isoformas distintas en los mamíferos, todos ellos con selenio como centro activo. Excepto la hidroperóxido-lípido (Gpx4), las demás Gpx tienen la característica de catalizar la reducción de H_2O_2 utilizando GSH como sustrato, también puede reducir otros peróxidos a alcoholes (Valko y cols., 2007). En donde intervienen 2 moléculas de GSH, que donan sus protones a la Gpx y se oxidan a GSSG, pero en un segundo paso de la reacción la GSSG se regenera mediante la glutathion reductasa (GR) con NADPH como donador de electrones, para volver a formar GSH:

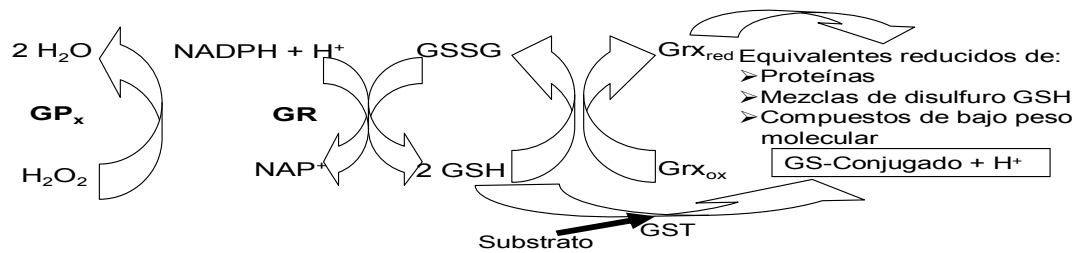
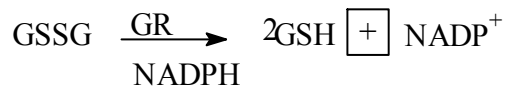
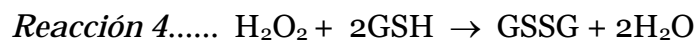
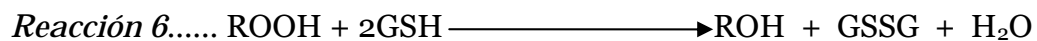


Figura. 9. Se muestra de manera esquemática, el sistema acoplado de glutatión, desde sustratos hasta productos de reacción.



Reacción 5.....

Acoplado a Gpx :



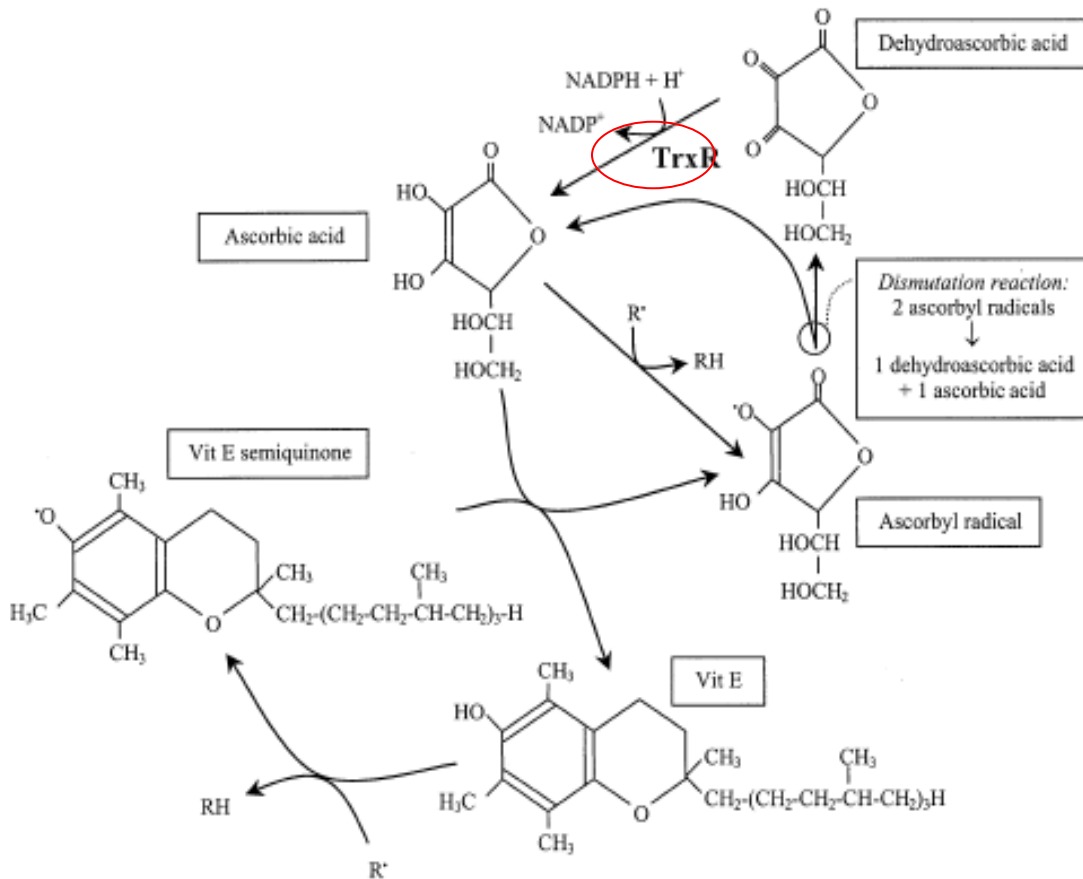


Figura 10. El sistema Trx/TrxR, es un sistema oxidoreductasa con propiedades antioxidantes, tanto el Trx, como la TrxR tienen por sí solas esta función. Sin embargo la particularidad de las tioredoxinas, es que funcionan eficientemente acopladas a otros sistemas antioxidantes. El sistema Tioredoxil puede actuar conjuntamente con la vitamina C, que a su vez es también un antioxidante efectivo, que se acopla a el sistema tioredoxin y a la vitamina E, atrapando electrones en un primer momento y transfiriéndolos en un segundo momento, formando radicales ascorbiles, de tal manera que la vitamina C, no solo es un antioxidante sino también un efectivo sistema reparador-donador de protones para otros antioxidantes. (Tomado de Jonas y Arner., 2001).

La ubiquinona (Q₁₀), tiene una función natural en la mitocondria como parte de la cadena de transporte de electrones, aunque también se encuentra en bajas concentraciones en el plasma y membrana celular, cuya función es prevenir la peroxidación de lípidos (Ernster, 1995; Aman y Hala, 2008). También los sistemas antioxidantes no enzimáticos desempeñan un papel importante para mantener el

equilibrio redox entre estos se encuentran las vitaminas C, E, los β -carotenos y el ácido úrico.

Ácido ascórbico (vitamina C)

El ácido ascórbico es un antioxidante soluble en agua, conocido más por sus efectos directos de atrapador de especies reactivas y por lo tanto es consumido durante el curso de su acción antioxidante (actividad antioxidante de sacrificio), a diferencia de los sistemas antioxidantes anteriormente descritos. En una reacción global de:

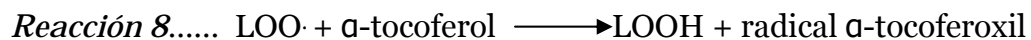


Donde $\text{AOO}\cdot$ es un radical peroxil acuoso y AOOH es un hidroperoxilo (Valko y cols., 2007).

El ácido ascórbico actúa principalmente para prevenir la formación de hidroperóxidos de lípidos.

α -TOCOFEROL (vitamina E)

Es un antioxidante soluble en lípidos presente en membranas biológicas, que al igual que el ácido ascórbico se consume en su reacción:



Donde $\text{LOO}\cdot$ es un radical peroxilo y el LOOH es un hidroperoxilo

En este caso el α -tocoferol, tiene un mayor efecto al prevenir la propagación de la peroxidación de lípidos.

El sistema TrxR juega un papel importante para la función antioxidante tanto del ácido ascórbico como de la vitamina E (Figura 10).

2.9 Barrera hematoencefálica

La barrera hematoencefálica (BHE) es un conjunto de células, endoteliales microvasculares especializadas, que protegen al sistema nervioso. Esta barrera está compuesta de endotelio microvascular, astrocitos, membrana basal, pericitos y neuronas, que se encuentran cerca al endotelio. La base estructural de esta barrera se debe a que las células endoteliales de los capilares en el sistema nervioso poseen uniones estrechas, a diferencia de lo que ocurre en la mayor parte de los lechos capilares del organismo. Las membranas endoteliales y los pies de los atrociitos que forman la barrera aumentan el contenido en fosfolípidos de la misma, impidiendo el pasaje de sustancias que no sean liposolubles. Todos esos elementos son parte de una unidad funcional neurovascular, que cuando se mantiene íntegra y en condiciones fisiológicas, aporta oxígeno de manera constante, glucosa y otros nutrientes al sistema nervioso (Bradbury, 1979, Nicolas y cols., 2009; Abbot y cols., 2010).

2.9.1 La BHE y el líquido extracelular

Probablemente la BHE mantiene la constancia del ambiente de las neuronas en el SNC. Las neuronas son tan dependientes de la concentración de Ca^{2+} , K^+ y Mg^{2+} , y otros iones en el líquido que las rodea. La constancia de la composición del líquido extracelular, en

todas las partes del cuerpo, se mantiene por múltiples mecanismos homeostáticos, pero debido a la sensibilidad de las neuronas corticales a los cambios iónicos, no es sorprendente que hayan evolucionado defensas adicionales para protegerlas.

2.9.2 Desarrollo de la BHE

Los capilares cerebrales son mucho más permeables al nacer que en la edad adulta y la BHE se desarrolla durante los primeros años de vida. El sitio de la barrera es el endotelio de los capilares cerebrales y el epitelio del plexo coroideo, en áreas circunvecinas que están rodeando al ventrículo, en el encéfalo como la hipófisis posterior (neurohipófisis), la parte ventral adyacente y la eminencia media del hipotálamo, el área postrema y el área órgano vascular de la lámina terminal (cresta supraóptica) y por el área subtrigonal, estas estructuras se conocen colectivamente como órganos circunventriculares y debido a su permeabilidad se dice que “están fuera de la BHE” (Terasaki y cols., 1990; William, 2004; Nicolas y cols., 2009; Abbot y cols., 2010).

2.9.3 Componentes estructurales de la BHE

Células endoteliales. Las células endoteliales microvasculares cerebrales, se sitúan en la interfase entre la sangre y el cerebro, ejerciendo funciones biológicas esenciales, incluyendo barrera, transporte de nutrientes, señalización mediada por receptores, tráfico leucocitario y osmoregulación. Los componentes estructurales responsables de ese funcionamiento incluyen (1) uniones estrechas (TJ), compuestos por proteínas como las ocludinas, claudinas, zonula occludens (ZO-1, ZO-2, ZO-3), cingulinas, AF6, y 7H6;

(2) Uniones adherentes (AJ), compuestas por caderinas, cateninas, vinculina y actinina; y (3) Células endoteliales microvasculares cerebrales (BMVEC) (Doolittle y cols., 2005). El citoplasma celular endotelial tiene un espesor uniforme con muy pocas vesículas pinocíticas (Abbot, 2005). Las células endoteliales microvasculares de la barrera hematoencefalica (BMVEC), tienen un gran número y volumen de mitocondrias comparados con el endotelio de otros órganos. Este incremento en el contenido de mitocondrias, incrementa su potencial de energía y se piensa que es requerido para el transporte activo de nutrientes en el cerebro. Se estima que los capilares cerebrales tienen de 5 a 6 veces más mitocondrias por sección capilar más que los capilares del músculo esquelético (Oldendorf y cols., 1997). También existen enzimas en el endotelio cerebral, capaces de metabolizar drogas y nutrientes. Estas enzimas incluyen a la γ -glutamyl transpeptidasa, fosfatasas alcalinas y descarboxilasas de L- aminoácidos aromáticos. En su conjunto proveen a esta zona una “polaridad” entre la membrana luminal y la superficie de las células endoteliales (BMVEC) que contribuye a la función de la barrera. Los transportadores de drogas, como la glicoproteína-P, esta principalmente presente en la superficie de la membrana luminal (Loscher y Potschka, 2005).

Astrocitos. Los astrocitos son células gliales que envuelven alrededor del 99% del endotelio de la BHE (Hawkins y Davis 2005). Los astrocitos y las células endoteliales son las estructuras principales de la BHE. Sus interacciones inducen y modulan el desarrollo de la BHE. La interacción de los astrocitos con la BHE, incrementan el volumen de las células endoteliales y reducen el área de las uniones de brecha (gap junctions). (Tao-Cheng y Brightman 1988; Britta E & Lydia S; 2009), así mismo sus

interacciones incrementan el número de partículas membranales astrocíticas ensambladas y la densidad astrocítica (Tao y cols., 1988; Abbot 2002; Britta y Lydia, 2009). Los astrocitos son esenciales para las funciones neuronales y la proximidad de cuerpos celulares neuronales de los capilares cerebrales sugieren que las interacciones BHE-astrocitos son esenciales para la unidad neurovascular funcional (Abbott y cols., 2006 y 2010).

Pericitos. Se ha sugerido que la asociación de los pericitos a los vasos sanguíneos, regula la proliferación, sobrevivencia, migración, diferenciación y ramificación vascular (Lai y Kuo 2005). Los pericitos son planos sin diferenciarse de las células del tejido conectivo contractil, que se desarrollan alrededor de las paredes capilares. Parte de los pericitos de la BHE pueden provenir de la línea celular de macrófagos, poseyendo capacidad para fagocitar proteínas exógenas y presentar antígenos (Williams y cols., 2001). Los pericitos tiene una asociación física muy cercana con el endotelio y la comunicación GJ entre el pericito y las células endoteliales mostradas *in vitro* (Lai y Kuo 2005). Los pericitos envían fuera sus proyecciones celulares, los cuales penetran a la lámina basal y cubren aproximadamente de entre 20 y 30% de la circunferencia microvascular. Sin embargo en eventos de hipoxia los pericitos migraran hacia los microvasos cerebrales (Gonul y cols., 2002; Karin y cols., 2008; Lochhead y cols., 2010), tambien en caso de trauma cerebral (Dore y cols., 2000; Nicolas y cols., 2009).

Neuronas. Los altos niveles de actividad neuronal y la naturaleza dinámica de sus necesidades metabólicas requieren regulaciones junto a la microcirculación y los tejidos suplementarios. La disrupción de la BHE, puede ocurrir en condiciones patológicas donde disminuye el flujo sanguíneo cerebral o en eventos de reperfusión (por ejemplo,

isquemia, hemorragia o trauma) (Petty y Wettstein 2001). Lee y cols., en 1999 demostraron que el incremento en la permeabilidad de la BHE, puede ser un evento compensatorio específico, sugiriendo que las comunicaciones neurales-microvasculares pueden modular la permeabilidad de la BHE. Las células endoteliales microvasculares cerebrales de la BHE (BMVEC), están asociadas a procesos astrocíticos y están inervados por neuronas noradrenérgicas (Cohen y cols., 1997^a), serotoninérgicas (Cohen 1997b) Colinérgicas (Tong y Hamel 1999), y neuronas GABAérgicas (Abbot y cols., 2010).

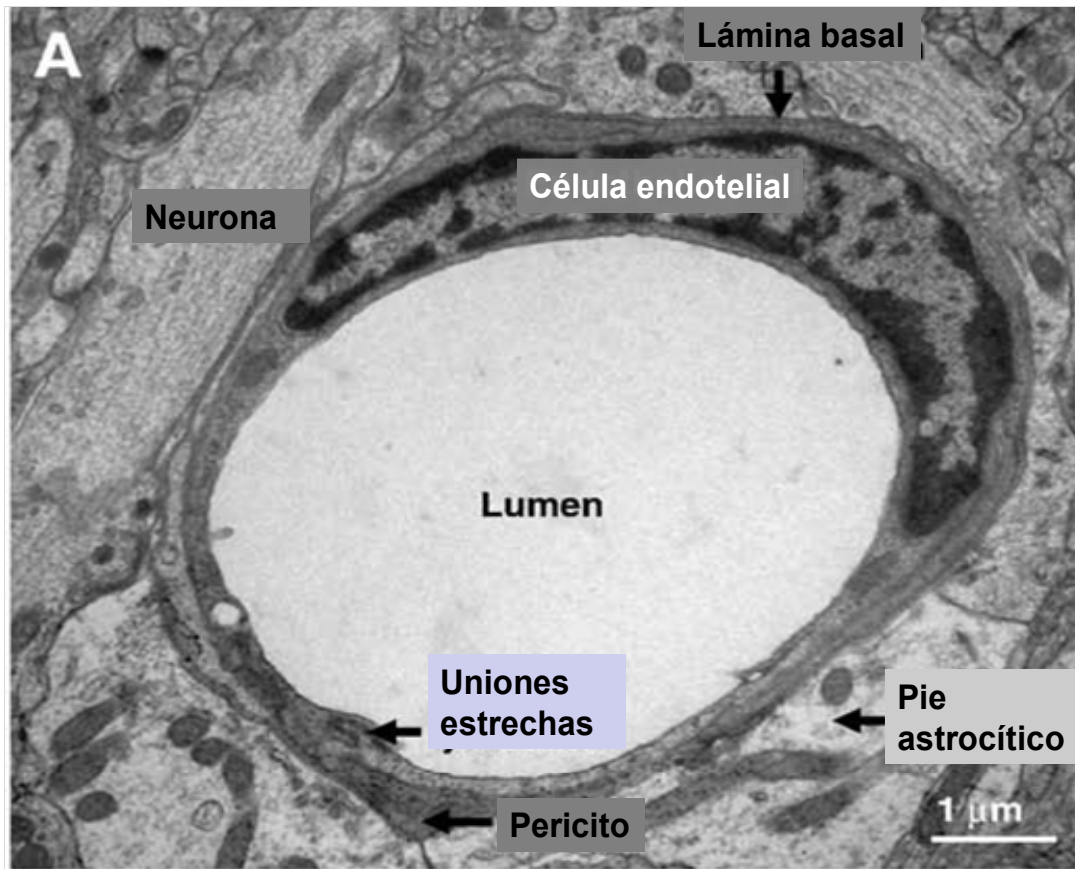
El daño inducido químicamente en el locus coeruleus, el cual envía las proyecciones noradrenérgicas a la microvasculatura, incrementa la vulnerabilidad de la BHE a la hipertensión aguda (Ben-Menachem y cols., 1982). La pérdida significativa de inervación colinérgica de los microvasos corticales que se han visto en la enfermedad de Alzheimer está asociada con una pérdida de la función cerebrovascular (Tong y Hamel 1999). También existen evidencias de que las neuronas inducen la expresión de las enzimas únicas para la BMVEC (Tontsh y Bauer, 1991; Britta y Lydia, 2009). En resumen existen evidencias de que las neuronas pueden regular la funcionalidad de la BHE.

La matriz extracelular. La matriz extracelular de la membrana basal también interactúa con el endotelio microvascular cerebral. La disrupción de la matriz extracelular está fuertemente asociada con el incremento de la permeabilidad de la BHE en estados patológicos (Rascher y cols., 2002; Jian y Rosemberg 2005). La matriz provee un soporte para BMVEC vía la interacción con la laminina, colágeno tipo IV y otras proteínas de matriz con los receptores de integrinas sobre la BMVEC (del Zoppo y

Hallenbeck 2000). Las interacciones de la matriz celular, median algunas vías de señalización intracelular (Tillin y cols., 2002) y las proteínas de matriz promueven la expresión endotelial de proteínas de TJ (Savettieri y cols., 2000), la membrana basal está fuertemente ligada al mantenimiento de estas (Nicolas y cols., 2009).

2.9.4 Integridad estructural de la BHE

La integridad de las uniones estrechas, determina la permeabilidad de la barrera, para moléculas solubles en agua que cruzan la BHE. La unión estrecha, está compuesta de las proteínas transmembranales integrales, conocidas como ocludinas. La ocludina es una proteína de 65KDa, que se encuentra altamente expresada en las BMVEC (Wolburg y Lippold., 2002; Nicolas y cols., 2009). Se ha demostrado que altos niveles de ocludina, mantienen una alta resistencia eléctrica de la monocapa de células epiteliales (McCarthy y cols., 1996). La ocludina está compuesta por cuatro dominios transmembranales, con las terminales carboxil y amino, orientadas al citoplasma y dos giros extracelulares (Furuse y cols., 1993).



Fig

ura 11. Composición de la barrera hematoencefálica

Microscopia electrónica de una unidad neurovascular de una sección del cerebro de rata. Este complejo incluye las células endoteliales de los microvasos, sobre la lámina basal, pericitos incrustados en la lámina basal, los pies terminales de los astrocitos y en las proximidades algunas neuronas (Tomado de Nicolas y cols., 2009).

2.9.5 Transportadores de la BHE

Debido a que la principal función de la BHE es regular el transporte de los solutos entre la sangre y el cerebro, para mantener la homeóstasis, es importante considerar los transportadores tanto para el suministro de energía, como de neurotransmisores involucrados en este proceso. El cerebro consume el 18% del total de energía corporal, mientras que su peso es del 2% del peso total del cuerpo, sin embargo el cerebro no puede almacenar glucosa para la síntesis de energía y la BHE juega un papel importante

en el suministro de glucosa al cerebro, mediante la expresión de transportadores de glucosa, conocidos como GLUT1 (Terasaki y cols., 1990 Nicolas y cols., 2009). La BHE, también posee sistemas de transportadores para ácido L-glutámico y L-Aspartico, transporte para citocinas a través de la BHE (William y Michelle, 2010), para GABA (GAT2/BGT-1), norepinefrina (NET) y serotonina (SERT). Además la barrera hematoencefálica es selectiva ya que por ejemplo el isómero L-aspártico atraviesa la BHE, mientras que el D-Aspártico, no lo hace, aunque todos estos transportadores están expresados en la membrana (Abbot y cols., 2010).

2.9.6 Catecolaminas y la BHE

Los grupos catecoles confieren a una molécula la polaridad e hidrofobicidad. Por esta razón la DA y las catecolaminas liberadas no cruzan la BHE (Hardebo y Owman, 1979). Sin embargo se ha demostrado experimentalmente que la permeabilidad de la BHE, se incrementa durante la hipertensión moderada inducida por dopamina (DA), donde el incremento heterogéneo en el flujo sanguíneo cerebral y en la permeabilidad de la BHE ocurre principalmente en el tálamo y en el cerebelo (Ben-Shachar y cols., 1995). Por otra parte, la L-DOPA y el triptófano son transportados usando el sistema de leucina, que es un sistema de transportadores de aminoácidos neutros, este transportador es independiente de energía (Egletton y Davis, 1997; Abbot y cols., 2010).

Estos sistemas de transporte, operan en dirección del flujo sanguíneo al cerebro. La presencia de transportadores del cerebro a la sangre ha sido demostrada, sin embargo se ha visto que son diferentes de los anteriores tanto estructural como funcionalmente,

tanto para la desintoxicación como para la prevención de moléculas no esenciales que atraviesen el cerebro (Tamai y Tsuji , 2000; Nicolas y cols., 2009).

2.9.7 Dopamina (DA), un caso singular

La DA además de ser uno de los neurotransmisores más importantes del sistema nervioso, es una bioamina que al ser rápidamente oxidada produce especies reactivas intermediarias. (Ben-Shachar y cols., 1995; Luo y Roth, 2000; Adams y cols., 2001). La DA incrementa los niveles de $[Ca^{2+}]_i$; principalmente en astrocitos, en condiciones homeostásicas la DA puede estar involucrada en la regulación de la actividad estriatal neuronal así como en la función astrocítica vía la modulación de Ca^{2+} . Sin embargo, en los casos en los cuales hay una sobreproducción de DA se puede presentar un incremento en la producción de radicales libres, ya sea de manera directa por oxidación de DA o de manera indirecta por sobrecarga de Ca^{2+} en células estriatales (Ben-Shachar y cols., 1995). Por otra parte, la DA es comúnmente utilizada en unidades de cuidado intensivo, para sostener la presión sanguínea, sin embargo, tanto la dosis como los efectos inmediatos pueden ser también muy variable, la DA también puede producir efectos sobre la presión sanguínea arriba de lo normal, al grado de lesionar la BHE. La 6-OHDA administrada exógenamente y en sitios alejados físicamente de el SNC, produce como efecto inmediato alteraciones en la permeabilidad de la BHE, conduciendo a eventos de inflamación vascular y daño (Carvey y cols., 2005).

2.9.8 Alteraciones de la BHE

La BHE limita la entrada de componentes plasmáticos, eritrocíticos o leucocíticos hacia el cerebro, si estas células cruzan la BHE debido a un daño isquémico, hemorragia intracerebral, trauma, procesos neurodegenerativos, inflamación o alteraciones vasculares, esto genera productos neurotóxicos que comprometen la sinapsis y la funcionalidad neuronal (Abbott y cols., 2006; Hawkins y Davis, 2005). Sin embargo, el daño a la BHE esta en función de la maduración fisiológica cerebral y condición física del individuo (Andrew y cols., 2001). Por otro lado la BHE es también el principal obstáculo para drogas dirigidas contra padecimientos del SNC. Aproximadamente el 98% de fármacos y tanto moléculas pequeñas así como todas las moléculas grandes que pueden ser usadas en el tratamiento, como péptidos recombinantes, proteínas y vectores genéticos, son normalmente excluidos del cerebro, cuando intentan penetrar la BHE (Pardridge, 2007; Phil y Scott, 2010). Se ha reportado que en enfermedades como Alzheimer, los capilares endoteliales se adelgazan y se acortan de manera importante (Bailey y cols., 2004; Wu y cols., 2005). Así mismo, se han encontrado alteraciones en la permeabilidad de la BHE en pacientes con esquizofrenia (Alan, 2010). Por otra parte, inflamaciones localizadas dentro del SNC producen la liberación de ácido quinolínico, un metabolito endógeno de la vía de la kinurenina, producido por células del sistema inmune como los macrófagos, monocitos y microglía, provocando también la alteración de la BHE (Heyes y cols., 1997).

En condiciones experimentales la alteración de la BHE puede inducir la sobreproducción de radicales libres que promueven alteraciones en la cadena respiratoria mitocondrial o resultar en destrucción celular y conducir a un deterioro en

el tejido estriatal (Hamilton y Gould., 1987; Nishino y cols., 1997; Miller y cols., 2009). Así mismo existen evidencias que en la hipoglucemia inducida por insulina se altera directamente la permeabilidad de la BHE (Öztaş y cols., 1985). También el estrés por inmovilización en ratas jóvenes aumenta considerablemente la permeabilidad de la BHE. (Sharma y cols., 1992).

2.9.9 Estrés oxidativo y la alteración de la BHE

Está demostrado que el estrés oxidativo altera la permeabilidad de la BHE (Lochhead y cols., 2010), Incluso se ha planteado la posibilidad que tanto las catecolaminas como otros neurotransmisores, sean capaces de alterar la BHE en eventos de estrés oxidativo (Jezřova´ y cols., 1989). En este sentido, se ha reportado que tanto las enfermedades como el Alzheimer (DA), el Parkinson (PD), la esquizofrenia, corea de Huntington (HD), la esclerosis lateral amiotrófica, la esclerosis múltiple entre otras enfermedades neurodegenerativas además del cáncer y la artritis reumatoide, tienen una estrecha relación con el estrés oxidativo y/o con la pérdida de la integridad de la BHE, (Nicolas y cols., 2009; Britta y Lydia ; 2009; Tracey y Wen , 2009; Alan 2010; William y Michelle, 2010; Tansey y Goldberg, 2010; Lochhead y cols., 2010; Tsuyoshi y cols., 2010), por lo que resulta interesante suponer que si estas enfermedades causan alteraciones en la vascularización cerebral y otros eventos de tipo inflamatorio, se puede inferir que la alteración de la BHE se encuentra involucrada, tanto en el inicio como en el sostenimiento y amplificación del daño a neuronas. Las evidencias tanto clínicas como experimentales indican que una vez que la BHE sufre una alteración también se altera la permeabilidad y el transporte de las moléculas entre el torrente sanguíneo y el SNC, provocando angiogénesis aberrantes y respuestas inflamatorias que eventualmente

pueden iniciar y/o contribuir a un círculo vicioso que mantienen el proceso neurodegenerativo, (William y Michelle, 2010), resultando en la alteración de las sinapsis así como en disfunción neural (Nicolas y cols., 2009; Miller y cols., 2009; Britta y Lydia, 2009). Además, estas alteraciones vasculares también podrían disminuir el transporte de sustratos de energía y nutrientes que cruzan la BHE y entonces generar alteraciones metabólicas en el cerebro. Por tal motivo, la comprensión de los mecanismos de transporte y regulación del paso de sustancias a través de la barrera hematoencefálica, nos permitirá entender parte del círculo vicioso que está implicado en los procesos degenerativos y las alteraciones metabólicas que mantienen y acompañan a los mismos, así como también la participación de otras células no neuronales de la unidad vascular en las enfermedades neurodegenerativas crónicas.

III. ANTECEDENTES

3.1 Estrés oxidativo y enfermedad de Parkinson

El estrés oxidativo es un fenómeno biológico, que se presenta cuando se incrementa excesivamente la producción de radicales libres o especies reactivas y disminuyen los sistemas antioxidantes endógenos. Esta pérdida del balance óxido-reducción en el organismo produce daño celular severo que puede llevar a la muerte celular (Halliwell, 1992; Halliwell y Gutteridge, 2006; Miller y cols., 2008; Shankar y Julie, 2008; Heinz y Wolfgang, 2008; David y cols., 2008).

Por otra parte el estrés oxidativo participa en el proceso de envejecimiento (Carney y cols., 1995; LaVoie y Hastings, 1999; Barja y Herrero, 2000; Furkawa y cols., 2000; Dawson y Dawson, 2003; Rashmi y Gavin 2008) y las enfermedades neurodegenerativas relacionadas con la edad, como el PD, la esclerosis lateral amiotrófica, la AD y la HD (Lou y Roth, 2000; Beckman y Ames, 1998; Olanow, 1993; Simonian y Coyle, 1996; Smith y cols., 2000; Ikuko y Masato, 2008), además existen evidencias de daño oxidativo vía radicales libres en sujetos jóvenes con alteraciones cognitivas (Burke y Taylor, 1992).

Sin embargo, de los anteriores procesos, una de las enfermedades más estudiadas y relacionadas con el estrés oxidativo es la PD, tal como se mencionó debido al metabolismo de la DA en sustancia nigra que es particularmente oxidativa, que involucra cantidades importantes de especies reactivas (Jenner, 1991, 2003; Youdim, y cols., 1989; Ikuko y Masato, 2008). Resumiendo, el aumento de las especies reactivas

de oxígeno y nitrógeno produce a su vez un aumento en la oxidación de la DA, autooxidación de catecolaminas en el sistema nervioso central (SNC), formación del radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), producción de Quinonas de DA (DAQ's), liberación y oxidación de metales de transición (Fe^{2+} , Cu^{2+}), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo ($\cdot OH$) (Graham, 1978; Bagh y cols., 2008; Ikuko y Masato, 2008; Shankar y Julie, 2008), así como daño a proteínas vía ataques nucleofílicos sobre sus cadenas expuestas (Graham y cols 1978), las DAQ's pueden reaccionar con la cisteína y producir residuos de cisteinil, estos residuos son capaces de inhibir la función de muchas proteínas, y producir disminución de ATP por bloqueo de la cadena respiratoria (Ramsden, 2001; Jana y cols., 2007; Bagh y cols., 2008).

3.2 Modelos experimentales de la PD

En el estudio de la PD, algunos modelos experimentales pueden proveer información acerca de los aspectos bioquímicos y moleculares que conducen al daño cerebral. Dentro de los modelos farmacológicos más importantes se encuentra el MPTP (1-metil 4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina), una toxina muy usada debido a que reproduce esta patología en el ser humano y primates, esta toxina se fija con gran afinidad a la monoaminoxidasa (MAO), enzima extraneural que la transforma a ión *piridinio* (MPP^+), formando un metabolito tóxico que a su vez se fija a la melanina en neuronas dopaminérgicas estriatales, en cantidad tal que lleva a la muerte a dichas neuronas (Langston y cols., 1984; Markey y cols 1984; Ogawa y cols 1994; Carine y cols., 2008). Otros modelos usados incluyen a las metanfetaminas para roedores y primates no humanos que mediante la activación de los receptores N-Metil-D-aspartato (NMDA) inducen a una apertura de los canales iones de Calcio (Ca^{2+}) al espacio citoplásmico

neuronal de manera constante y excesiva, ocasionando excitotoxicidad y muerte neuronal (Radi y cols., 1994; Syed y cols., 1999).

3.3 Modelo de la enfermedad de Parkinson producido por estrés oxidativo causado por ozono (O₃)

Se ha demostrado que el O₃ inhalado dependiendo de la dosis de exposición, produce un aumento en las ROS, las cuales al no poder ser eliminadas por las defensas antioxidantes pulmonares llevan a una formación secundaria de más ROS y especies reactivas del nitrógeno (RNS) en el organismo (Dorado y cols., 2001), las especies reactivas viajan a través del flujo sanguíneo hasta el SNC, y al no ser compensadas por los sistemas antioxidantes endógenos, conducen a un estado de estrés oxidativo (Dorado y cols., 2001; Pryor y Church, 1991; Sies, 1991).

3.4 Alteraciones bioquímicas, histológicas y conductuales causadas por O₃

La exposición a O₃ produce aumento en los niveles de lípidos peroxidados en diferentes estructuras cerebrales, lo que indica que la exposición a este gas induce un estado de estrés oxidativo (Rivas-Arancibia y cols., 2000). El estado de estrés oxidativo, produce daño neuronal, como la pérdida de espinas dendríticas (Avila y cols., 1999), alteración de la plasticidad cerebral reflejada en una alteración de los procesos de memoria y aprendizaje (Rivas-Arancibia., y cols., 2003). Además produce cambios intracelulares, tales como: edema de la mitocondria, del aparato de Golgi y del retículo endoplásmico, incremento en los gránulos de lipofuscina, y de peroxisomas; también se observan neuronas electrodensas en el bulbo olfatorio, hipocampo, estriado y corteza frontal (Colín y cols., 1999).

En nuestro modelo, la exposición repetida a bajas dosis de O₃, durante 4 horas diarias en ratas, producen daño progresivo a medida que aumenta el tiempo de exposición. Cuando se aplica crónicamente durante 4 h diarias y a dosis de 0.25 ppm durante 1 mes, encontramos alteraciones estructurales, conductuales y muerte de neuronas dopaminérgicas, similar a la encontrada en la enfermedad de Parkinson.

3.5 Metabolismo de DA

3.5.1 Biosíntesis de DA

La DA es una monoamina biogénica, la cual en su estado reducido no cruza la barrera hematoencefálica. Por esta razón se infiere que toda la DA que se encuentra en el cerebro es sintetizada en neuronas catecolaminérgicas. El 80% de la DA cerebral se localiza en el estriado (Versteeg y cols., 1976). La DA se sintetiza a partir de L-tirosina y a través de la acción secuencial de *Tirosina hidroxila* (TH) y *L-aminoácido descarboxilasa* (AADC).

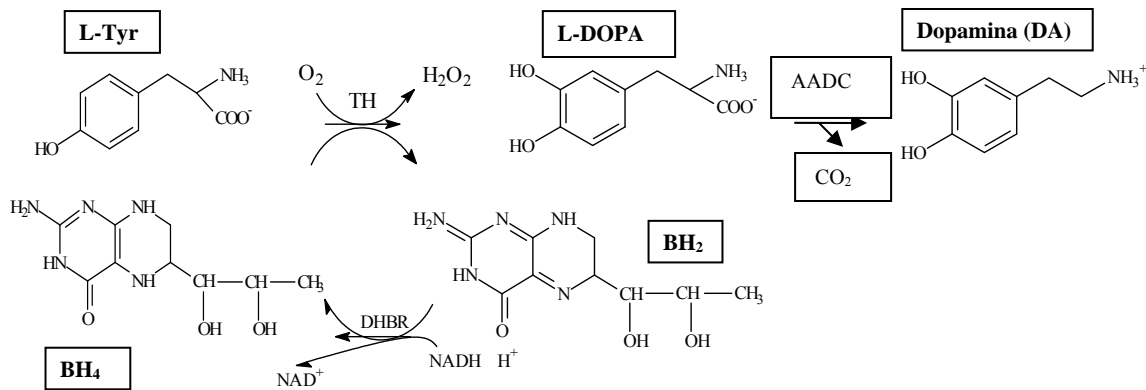


Figura 12. Síntesis de DA (Tomado de Santiago y Rivas, 2008).

Como se observa en la Figura 12 la conversión de L-tyr a L-DOPA requiere hidroxilarse, esto se logra a partir de la acción enzimática de TH y requiere como cofactor a las tetrahidrobiopteridinas (BH_4). Se sabe que la TH es la enzima limitante de la reacción en la síntesis de DA y que es una enzima soluble compuesta de 4 subunidades de aproximadamente 60KDa c/u. La cual está localizada en las terminales nerviosas dopaminérgicas. La actividad de la TH está controlada principalmente por inhibición de productos finales (Javoy y cols., 1972). De hecho, una alta concentración citoplasmática de DA inhibe la actividad de TH y la disminución de la actividad neuronal de los niveles de DA reactivan la TH, porque bajo esas condiciones el neurotransmisor compite por el sitio de enlace con BH_4 .

La TH se activa en las terminales nerviosas por fosforilación reversible (Zigmond y cols, 1989; Haycock y Haycock, 1991). Cuando el potencial de acción llega a la terminal nerviosa, se abren los canales de Ca^{2+} , lo que ocasiona un incremento del mismo intracelular, el cual provoca a su vez la fosforilación de AMPc dependiente de proteína cinasa, que después induce la fosforilación de TH en la serina-40 y consecuentemente su activación. Adicionalmente el incremento de Ca^{2+} intracelular, también provoca la fosforilación de Ca^{2+} -calmodulina dependiente de proteína cinasa II, el cual induce la fosforilación de TH al nivel de la serina-19, lo que resulta en la activación de la enzima por reducción de la inhibición de la retroalimentación (Goldstein y Lieberman, 1992).

Diagrama esquemático de los sitios de fosforilación de TH

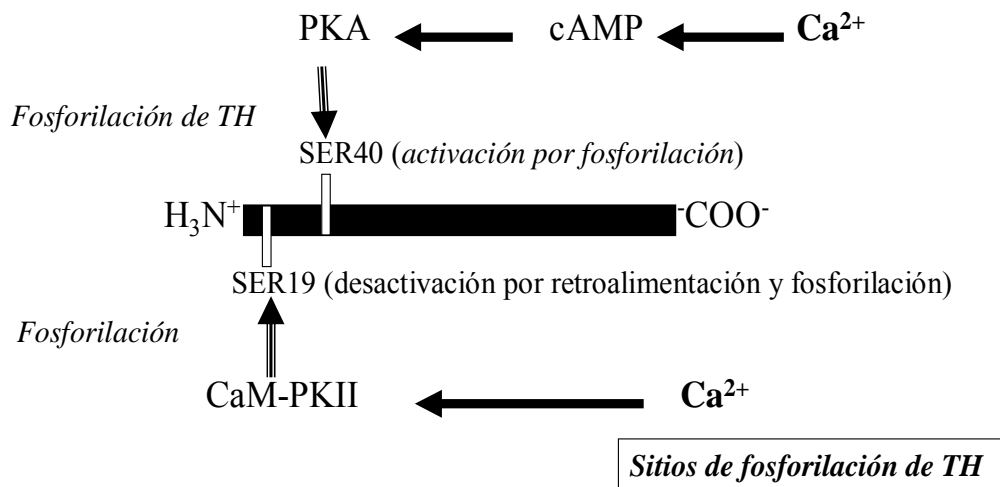


Figura 13. Diagrama esquemático de los sitios de fosforilación de TH

El siguiente paso, es la descarboxilación de L-DOPA a DA, catalizada por AADC, una enzima ampliamente difundida tanto en SN central como en SN periférico, que requiere de fosfato de piridoxal como coenzima, la enzima tiene una baja Km y una alta Vmax para este sustrato, el cual garantiza una eficiente conversión de L-DOPA endógeno a DA (Christenson y cols., 1970), lo cual es consistente con los bajos niveles de L-DOPA en el cerebro. El AADC presente en el citoplasma de terminales nerviosas dopaminérgicas y está constituida por un tetrámero de subunidades idénticas de 280KDa cada una, sin embargo esta enzima se encuentra también presente en neuronas noradrenérgicas, neuronas serotoninérgicas y células no neuronales como, astrocitos y células de los vasos sanguíneos (Li y cols., 1992; Eaton y cols., 1993; Poewe W. y cols., 2010), esto

garantiza una eficiente conversión de la L-DOPA administrada a DA en el tratamiento contra el PD. Sin embargo, la presencia considerable y la actividad de AADC en tejido periférico (hígado, riñón, pared intestinal y capilares) necesita una inhibición selectiva de AADC extracerebral en el tratamiento farmacológico de la PD con L-DOPA para garantizar una biodisponibilidad en el cerebro, como bencerasida y carbidopa, que son inhibidores selectivos de AADC en tejido periférico que no atraviesan la barrera hematoencefálica (BHE) (Yahr y Duvoisin, 1972; Poewe y cols., 2010)

3.5.2 Almacenamiento, liberación y recaptura de DA

Una vez que es sintetizada la DA en el citoplasma, es incorporada a las vesículas sinápticas a través de la acción de los *transportadores de monoaminas vesiculares de tipo 2* (VMAT2), los cuales concentran DA dentro de las vesículas a través de una bomba ATP-protón dependiente, que además de generar un gradiente ácido, produce a la forma activa de DA (DA⁺). En dichas vesículas se alcanzan concentraciones de 500mM aproximadamente. En estudios experimentales se ha reportado que el uso de inhibidores de VMAT2 (como la *reserpina*) incrementa la concentración citoplasmática de MPP⁺, (metabolito tóxico del MPTP, compuesto que causa parkinsonismo) e incrementa la neurotoxicidad dopaminérgica. (Roland y cols., 2000; Vergo y cols., 2007; Guillot y cols., 2008). Las VMAT2 tienen una doble función, por una parte mantener listos los niveles de transmisores y por la otra proteger a la DA de la oxidación enzimática de la célula. La liberación de DA de las vesículas sinápticas es un proceso mediado por la acción de canales de calcio sensibles a voltaje, el cual promueve la fusión de las vesículas sinápticas con la membrana neuronal que resulta en la liberación de DA⁺ al espacio sináptico. Después de la acción de la DA sobre su receptor

postsináptico, el neurotransmisor es recapturado por transportadores de DA (DAT), una proteína que esta presente en la membrana plasmática de neuronas dopaminérgicas en forma de dímero. Este transportador es dependiente de sodio y cloro (Hastrup H, y cols., 2001). La recaptura es inhibida por antidepresivos tricíclicos y cocaína pero no por reserpina. Se ha visto que el MPP⁺ y un metabolito oxidado de DA (6-hidroxidopamina, neurotóxico), son recapturados por DAT (Gerlach y Riederer, 1996).

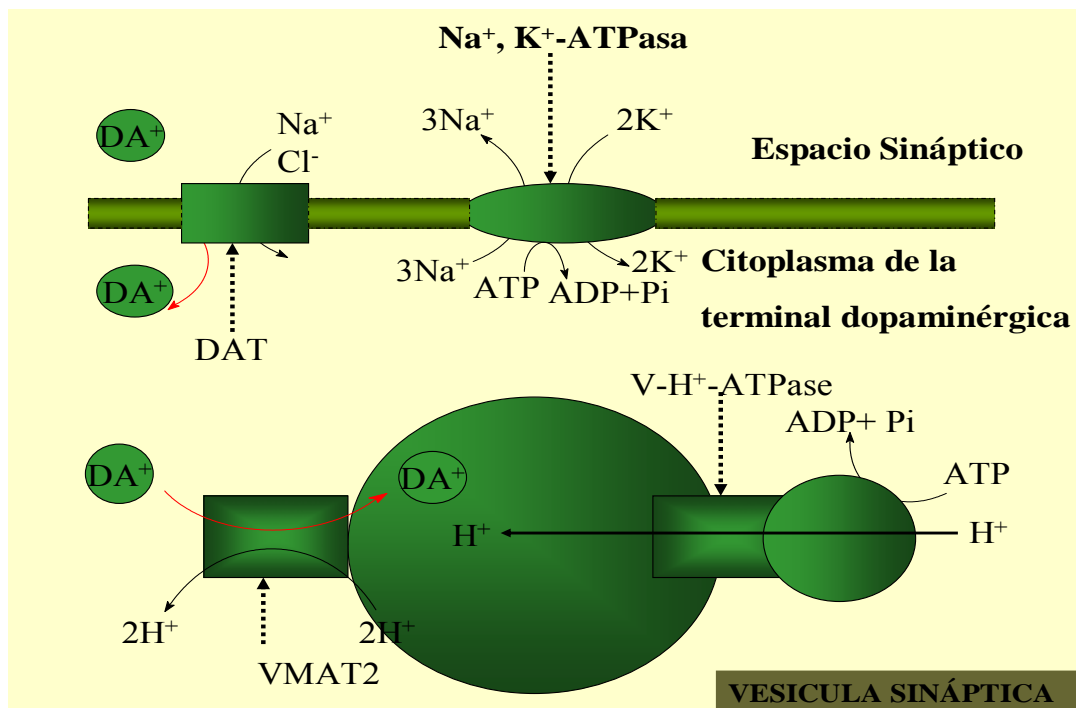


Figura 14. Esquema que representan el mecanismo para el almacenamiento, transporte y recaptura de DA

3.5.3 Degradación enzimática de DA

El metabolismo de DA involucra tres enzimas principales, monoaminoxidasa (MAO), Aldehído-deshidrogenasa (ADH) y catecol-orto-metiltransferasa (COMT), estas enzimas

participan en procesos básicamente oxidativos y de desaminación cuyos productos finales son DOPAC y ácido homovanílico.

3.6 Oxidación de Catecolaminas

En el SNC las catecolaminas son una importante fuente de producción de radicales libres, por ejemplo el paso catalizado por la MAO durante la ruptura metabólica de la DA, serotonina y noradrenalina (NA) produce H_2O_2 (Cohen, 1987), o las mismas catecolaminas pueden incluso autooxidarse y formar quinonas de DA, NA y Adrenalina (Graham, 1978). El orden de ciclización a leucocromos de menor reactividad es en orden inversa, se piensa que adicionalmente a la generación de H_2O_2 o O_2^- por productos de quinona (Dopaquinona y dopacromo), las proteínas pueden dañarse vía ataques nucleofílicos sobre esa zona de la cadena (Graham y cols., 1978; Irmgard y cols., 2007; Zhenquan y cols., 2008; Hatasu y cols., 2009).

3.7 Toxicidad del metabolismo de DA

El metabolismo de DA, en condiciones de homeostasis redox es oxidativo. Inicialmente la MAO oxida la vía catabólica primaria de DA hasta DOPAC (3,4-dihidroxifenilacético), generando peróxido de hidrógeno. Este en presencia de ión ferroso, que es relativamente abundante en los ganglios basales, puede generar radicales libres hidroxilo ($OH\cdot$), en una reacción de tipo Fenton (Olanow, 1993). Si los mecanismos protectores son insuficientes, los radicales podrían ocasionar degeneración de neuronas dopaminérgicas (Jana y cols., 2007; Masato y cols., 2008; David y cols., 2008; Shankar y Julie, 2008; Ikuko y Masato, 2008; Miller y cols., 2009).

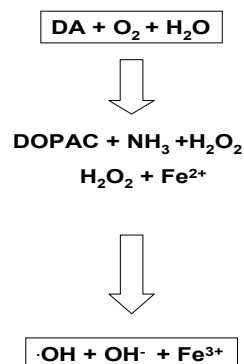


Fig 15. Producción de radicales libres por el metabolismo de DA

3.8 Quinonas de DA (DAQ's)

Por otro lado, la DA puede formar metabolitos reactivos a través de una vía secundaria de reacción, cuyos metabolitos también son tóxicos directamente sobre la célula. Debido a la naturaleza inestable del anillo fenólico de la DA, pueden ser oxidados a moléculas reactivas llamadas quinonas de DA (DAQ's). (Graham y cols., 1978; Irmgard y cols., 2007; Zhenquan y cols., 2008; Hatasu y cols., 2009; Jana y cols., 2007; Masato y cols., 2008; David y cols., 2008; Shankar y Julie, 2008; Ikuko y Masato, 2008; Miller y cols., 2009).

Las quinonas en general son compuestos fenólicos, productos de la oxidación sobre sus grupos -OH (como las DAQ's). Estas especies sufren reacciones de transferencia electrónica reversible, ello produce que se autooxiden o se autoprotoneen incluso en el mismo momento de procesarlas para su evaluación cromatográfica (Kankaanpää y cols

2001). Además, debido a que estos compuestos presentan un potencial de redox particular, una herramienta que podemos utilizar para su determinación es la Voltamperometría Cíclica (VC).

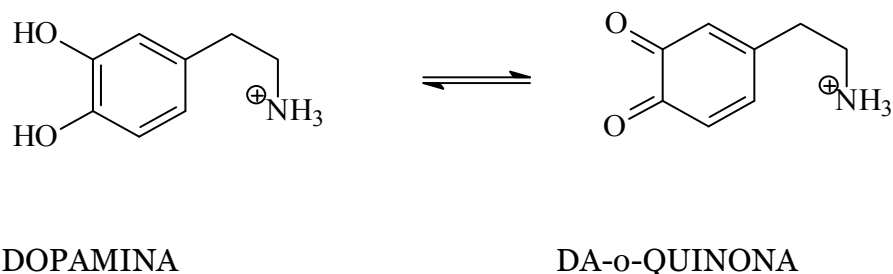


Figura 16. Esquema que representa a la DA (en su estado reducido) y a una quinona (DA en uno de sus estados oxidados, aquí se muestra la O-quinona de DA –DAQ-)

Una vez formados estos compuestos pueden reaccionar con la cisteína y producir residuos de cisteinil, estas estructuras son capaces de inhibir la función de muchas proteínas, y producir disminución de ATP por bloqueo de la cadena respiratoria (Ramsden y cols., 2001). Sin embargo parte de las especies reactivas que se generan son neutralizadas principalmente por la *neuromelanina*, que es un polímero con fierro como centro quelante (Enochs y cols., 1994; Zecca y cols., 1992; Zecca y Swartz, 1993; Qi Xu y cols., 2008). Paradójicamente la neuromelanina se forma de DAQ's (La DA-p-quinona imina). Además, el metabolismo de la DA tiende a formar colateralmente otras especies tóxicas que pueden dañar a las neuronas dopaminérgicas de modo no específico (Zecca y cols., 2006; Bisaglia y cols., 2007; Graham y cols., 1978; Irmgard y cols., 2007; Zhenquan y cols., 2008; Hatasu y cols., 2009; Jana y cols., 2007; Masato y cols., 2008; David y cols., 2008; Shankar y Julie, 2008; Ikuko y Masato, 2008; Miller y cols., 2009).

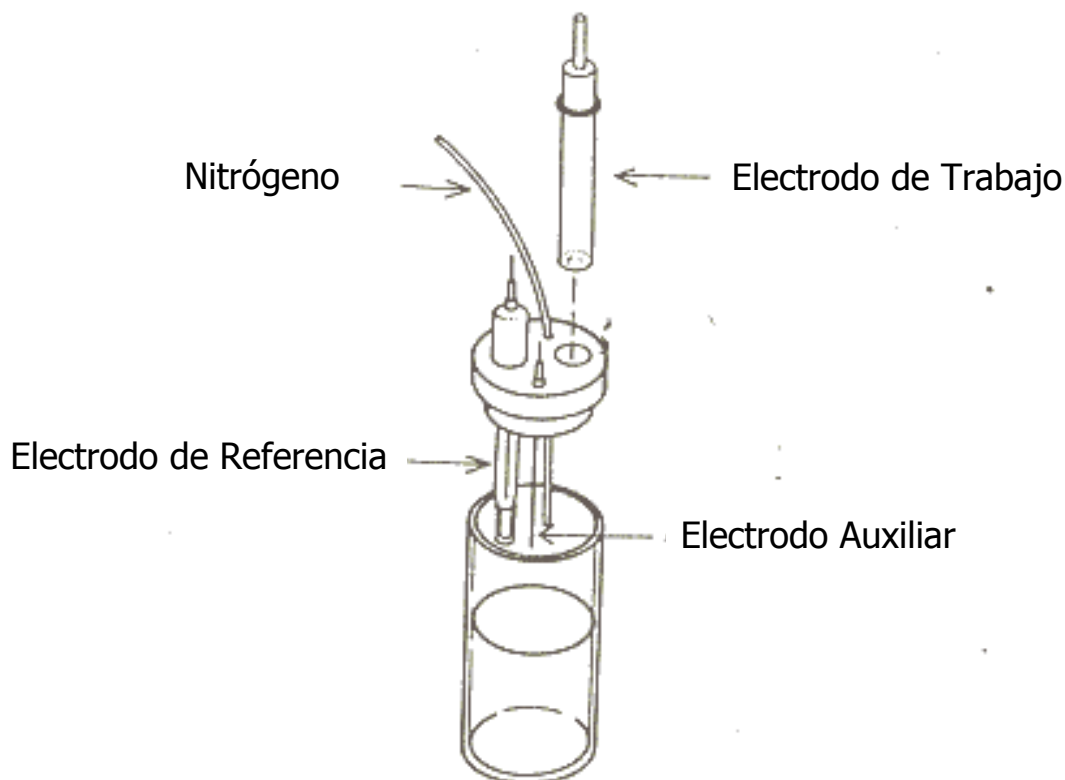


Figura 18. Esquema que representa una celda de reacción típica para voltamperometría cíclica. Se muestra con un arreglo de tres electrodos, aislado del exterior con un conducto que provee al sistema un ambiente inerte (N_2), necesario para evitar las reacciones con el oxígeno atmosférico y para evitar reacciones con la luz, dicha celda se cubrió con un chaleco de aluminio.

Una de las características más importantes de la VC es que es un método que provee una medida rápida y directa de las propiedades redox de una molécula, al grado que registra con exactitud, las señales de una misma molécula tanto en estado oxidado en un barrido, como reducido en el otro barrido de sentido inverso en la misma corrida. El fundamento de la VC, es que se impone un potencial al sistema (con el potencióstato), después de lo cual se inicia un fenómeno de desplazamiento de electrones a través de las moléculas que se encuentran inmersas dentro de la celda de reacción, y este es el principio para poder detectar tanto las señales catódicas como anódicas que se generen

en la ventana del potencial impuesto de trabajo (ver la descripción de la técnica en su respectiva sección).



A

B

Figura 19. Fotografías en A la celda de reacción y en B el potenciostato, ambos de Bioanalytical Systems.

IV JUSTIFICACIÓN

Aunque desde un tiempo a la fecha la PD ha sido extensamente estudiada, tanto la etiología como su cura siguen siendo desconocidas (Heinz y Wolfgang, 2008; Shankar y Julie, 2008).

Se han postulado diversas teorías alrededor del origen de la enfermedad en el caso idiopático (sólo un 5% de los casos clínicamente estudiados tiene un origen genético) (Heinz y Wolfgang, 2008) que engloban varias líneas de investigación:

Algunos estudios se han enfocado en el reconocimiento de alteraciones que van que van desde la falla mitocondrial (probable falla genética) y el desacoplamiento del complejo I, falla en el complejo Na-K-ATPasa, caída de ATP, (asociados probablemente también a procesos de envejecimiento (Tretter y cols., 2004; Parker Jr y Parks, 2005; Rashmi y Gavin, 2008).

Otros estudios se enfocan en la falla del sistema de ubiquitinación, otros más se han especializado en el estudio de la disminución de sistemas antioxidantes, principalmente el sistema de glutatión (GSH) (Zhi, 2006; Gail y cols., 2008) y en las alteraciones de la síntesis de DT-Diaforasa. Incluso del 2000 a la fecha se han realizado un número significativo de investigaciones en la ruta de síntesis de neuromelanina y sus productos metabólicos, incluyendo a los metales de transición, abundantes en las vías dopaminérgicas nigroestriatales (Zecca y cols., 1992; 1993; 1996; 2006; 2008).

Asi mismo y por lo anteriormente descrito, ha cobrado importancia en los últimos años el área de la Neuroinmunología, que desde su abordaje nos ha permitido acercarnos más

a las reacciones moleculares que se desarrollan tanto en la glía como en las neuronas (Heinz y Wolfgang, 2008; Miller y cols., 2008).

Sin embargo una ruta común de participación, que podría explicar en parte, los anteriores procesos y otros más que se describirán posteriormente en el presente trabajo, es la que involucra principalmente al *estrés oxidativo*, en el cual se presentan y se enfrentan reacciones químicas redox, reacciones de competencia, ataques electrofílicos, nucleofílicos, sustracción y donación de electrones, donde los protones van y vienen (o moléculas que se oxidan y reducen), produciendo reacciones reversibles e irreversibles, así como cambios conformacionales en las estructuras involucradas directa e indirectamente, así como también a sus productos metabólicos, un desequilibrio redox, que lleva a una condición de homeórresis.

Independientemente si el estrés oxidativo es causa o consecuencia del padecimiento, es claro que es la ruta necesaria por la que cursa el daño neuronal, así como el sostenimiento, propagación y progresión de la enfermedad de Parkinson.

Existen modelos de la enfermedad de Parkinson, que van desde los farmacológicos hasta los genéticos o celulares.

Dentro de los modelos farmacológicos que se han utilizado con mayor frecuencia son los siguientes:

Modelo de 6-OHDA (6-Hidroxi dopamina)

La 6-OHDA fue la primer neurotoxina altamente selectiva identificada para las neuronas catecolaminérgicas, con alta afinidad para la noradrenalina y para los

transportadores de la DA (DAT). Se inyecta con estereotáxico intraestriatalmente una dosis de 6-OHDA, que produce alteraciones ipsilaterales, involucrando a los receptores D2 e hipersensibilizando el lado lesionado. Produciendo a un nivel sistémico alteraciones motoras y disfunciones bioquímicas. Sin embargo la administración de 6-OHDA como modelo de neurotoxina, en estudios preclínicos tiene como inconveniente que es una neurotoxina exógena e invasiva y por lo tanto produce destrucción adicional de neuronas dopaminérgicas (Miller y cols., 2008).

Modelo de MPTP (1-metil 4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina)

El MPTP es una pro-neurotoxina selectiva dopaminérgica que cruza la barrera hematoencefálica, y es convertida por la acción de la monoaminoxidasa-B (MAO-B) al metabolito activo MPP⁺, (ión 1 metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridinio), que es neurotóxico selectivo para los DAT, se acumula en las terminales dopaminérgicas, desde donde inhibe el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, interfiriendo con la producción de ATP, llevando también a la liberación excesiva de Ca²⁺, ocasionando con ello neurotoxicidad. El MPTP produce parkinsonismo irreversible en primates, incluyendo humanos, la administración crónica de este compuesto, produce disminución dosis-dependiente de los niveles de la DA estriatal y pérdida correspondiente de vesículas transportadoras de monoamina-2 (VMAT-2) en modelos murinos. Inhibe también el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial. El principal inconveniente de este modelo es que es una proneurotoxina exógena, que además en sujetos jóvenes expuestos a este compuesto produce severo parkinsonismo de manera rápida, mientras que la enfermedad de Parkinson se presenta gradualmente y en sujetos mayores (Miller Rebecca L. y cols., 2008).

Modelo de Rotenona

La infusión unilateral de rotenona reproduce las alteraciones neuroquímicas y neuropatológicas de hemiparkinsonismo en ratas, la degeneración de neuronas dopaminérgicas esta acompañada por un incremento en las proteínas oxidadas (carbonilos) en las regiones cerebrales dopaminérgicas. Ello puede conducir a una disfunción mitocondrial y ocasionar una hiperfosforilación de la proteína Tau, favoreciendo agregados de α -sinnucleína, este modelo tiene a favor que no tiene que ser inyectado intracerebralmente, evitando así el consecuente daño neuronal directo, (Miller y cols., 2008).

4.1 Modelo de daño por ozono

El modelo por ozono reproduce alteraciones bioquímicas, histológicas y conductuales semejantes a la enfermedad de Parkinson, en ratas expuestas a bajas dosis de ozono y a exposiciones crónicas.

No es invasivo, además no produce alteraciones farmacológicas

Requiere mínima manipulación del sujeto (ya que a las ratas se les deja en una caja de acrílico a respirar libremente aire con ozono).

Genera estrés oxidativo.

Las alteraciones no se producen inmediatamente, se requiere un tiempo mínimo.

El daño se presenta de manera gradual.

Conforme transcurre el tiempo se produce un proceso de neurodegeneración progresiva que afecta principalmente las neuronas dopaminérgicas de sustancia nigra y el estriado.

4.2 Justificación del uso de la técnica (voltamperometría cíclica)

Pese a que los primeros y escasos reportes fueron en los principios de los 70's, no ha sido sino hasta fines de los 90's, que ha surgido la mayor parte de la aun escasa investigación de la mayoría de éstos compuestos tóxicos, producidos principalmente en la misma ruta de síntesis, almacenamiento, liberación, recaptura y degradación de la dopamina. Una probable razón de por que ha habido poca investigación, de estos compuestos químicos formados endógenamente en el cerebro de los pacientes con esta enfermedad, quizá sea por que la caracterización en tejido vivo, que supone en principio métodos invasivos y dolorosos, adicionalmente una vez que se obtuviera la muestra, no se garantizaría que los compuestos buscados aún permanecieran intactos, sin embargo si ello fuera posible, todavía quedaría la dificultad de medir o cuantificar dichos compuestos, ya que hasta donde se sabe, la naturaleza de estos compuestos los llevaría a sufrir cambios conformacionales espontáneos, debido a su sensibilidad al pH, temperatura, ambiente (luz y redox), de tal manera que supondría un reto para las técnicas convencionales conocidas.

En ese sentido la voltamperometría cíclica ofrece algunas ventajas:

Es una técnica con fundamento en un fenómeno electrocinético.

Es una técnica con principio en un fenómeno de reacción de superficie de membrana.

Su principal característica es que registra las reacciones de transferencia electrónica en compuestos biológicos.

Diseños adaptados para el estudio de centros activos redox de proteínas:

- CITOCROMO C
- GRUPOS DE Fe-S
- INTERMEDIARIOS ALTAMENTE OXIDANTES Fe(IV)=O
- NAD(P)⁺ / NAD(P)H
- O-QUINONAS Y P-QUINONAS
- INMUNOENSAYOS

-El intercambio de electrones con un electrodo es directo e inmediato, así mismo no involucra mediadores electroactivos.

-La transferencia electrónica superficial es rápida (reversible).

- Hay una Reorganización energética mínima.

-Acoplamiento máximo entre el sitio activo y la superficie del electrodo.

-La proteína no es desnaturalizada.

-La actividad catalítica no es perjudicial para el registro.

-Proveen una medida rápida y directa de las propiedades redox de los compuestos a estudiar.

V. HIPÓTESIS

Si la exposición repetida a O₃ causa un estado de estrés oxidativo que induce daño y muerte celular en la sustancia nigra y el estriado, entonces la oxidación de la dopamina y sus metabolitos participan en el propio proceso de neurodegeneración progresiva.

VI. OBJETIVOS

1. Evaluar en grupos de ratas tratadas con O₃ la producción de dopamina oxidada a medida que avanza el proceso neurodegenerativo en la sustancia nigra.
2. Relacionar los niveles de la DA oxidada con el número de células dopaminérgicas en las ratas que tienen diferentes tratamientos.
3. Medir los niveles de lípidos peroxidados en la sustancia nigra, el estriado y el plasma de ratas expuestas en forma repetida a O₃ durante diferentes tiempos (15 días, 30 días y 60 días).

VII. METODOLOGÍA GENERAL

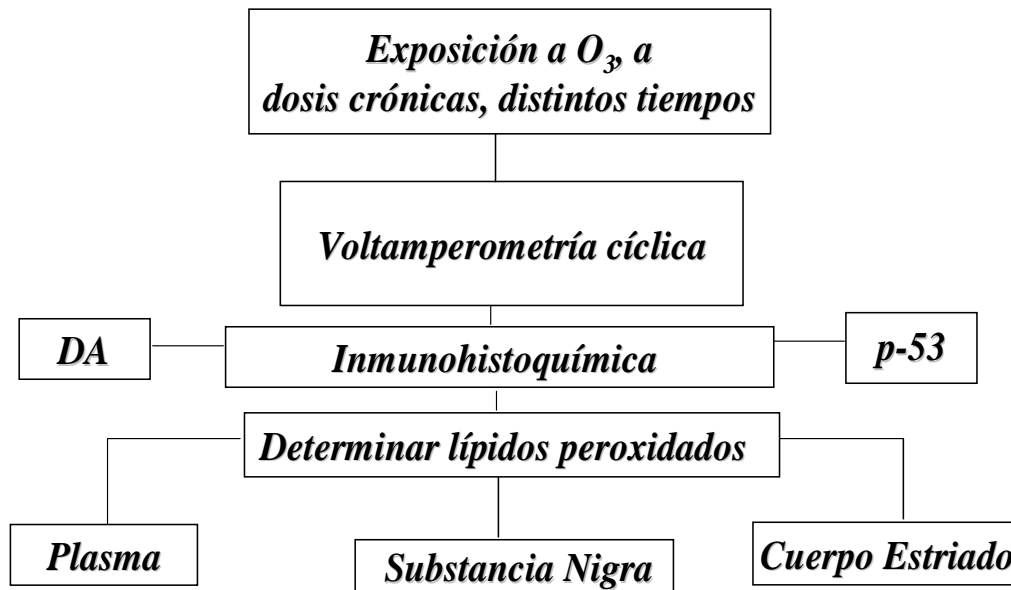


Figura 20. Se muestra un diagrama de flujo, que representa la metodología general de trabajo en el presente proyecto.

Sesenta y cuatro ratas machos de la cepa Wistar (250-300 g) fueron alojadas en cajas de acrílico individuales con libre acceso a agua y comida. Los animales fueron divididos al azar en 4 grupos (n=16 para cada grupo). Grupo 1) Control (expuesto a aire); Grupo 2) 15 días de exposición a O₃; Grupo 3) 1 mes de exposición a O₃; Grupo 4) 2 meses de exposición a O₃. De cada grupo experimental se utilizaron 6 ratas para VC, 6 animales para cuantificar los niveles de LPO y, 4 sujetos para técnicas inmunohistoquímicas. Los

animales se expusieron a O₃ durante 4 horas diarias a 0.25 ppm a los tiempos señalados para cada grupo.

Exposición a O₃

Los animales fueron expuestos a O₃, durante cuatro horas diarias. Para dicho fin, se utilizó una cámara de acrílico, sellada y conectada a un generador de O₃ de flujo variable (5L/s). La producción de los niveles de O₃ fue proporcional a la intensidad de corriente y el flujo de aire. Un monitor “*PCI Ozono & Control System Monitor*” fue utilizado para medir la concentración de O₃ dentro de la cámara durante todo el experimento.

Niveles de lípidos peroxidados (LPO)

Los niveles de LPO fueron cuantificados usando el kit de Kamiya (*K-ASSAY LPO kit, Kamiya Biomedical Co.*), después de la última exposición, seis animales de cada grupo fueron sacrificados por decapitación (de acuerdo a los lineamientos internacionales de cuidado de animales y a la norma mexicana), se obtuvo su sangre e inmediatamente se centrifugo y se separo el plasma de los elementos formes.

Cada muestra de plasma fue almacenado a -70 °C hasta el día del ensayo para medir los niveles de LPO.

Para las lecturas de los niveles de LPO en la SN y el CE, primero se procedió a disecar sobre una platina de hielo la región específica, después de lo cual se procedió a homogenizar en amortiguador de fosfatos (0.2M), finalmente se congeló a -70°C hasta el día de su determinación.

El día de la determinación se descongelaron los homogenados, se centrifugó a 3000 rpm y se tomó el sobrenadante, éste se incubó durante 10 min con el reactivo enzimático (oxidasa ascórbico y lipoproteína lipasa) a 35° C, posteriormente se le adicionó el cromógeno (10-N-metilcarbamoil-3,7-dimetilamina-10-H-fenotiazida) y se volvió a incubar la mezcla a 30° C otros 10 min, finalmente se leyeron a una absorbancia de 675 nm, en un espectrofotómetro *Jenway 355*. Previamente se hizo una curva de calibración de dos puntos, usando un blanco de solución salina (0 nmol/ml) y un estándar de *cumeno hidroxiperoxidasa* (50 nmol/ml), que proporciona el Kit.

Los valores de las absorbancias fueron transformadas a concentraciones de nmol/mL, mediante la ecuación:

$$\text{LPO [nmol/mL]} = [(E_s - E_b) * 50,0 / (E_{std} - E_b)]$$

Donde *E_s*: es la absorbancia de la muestra; *E_b* es la absorbancia del blanco; *E_{std}* es la absorbancia del cumeno (50nmol/ml).

Voltamperometría cíclica (VC)

Las medidas de la VC fueron hechas, usando un potenciostato *BAS Epsilon* (*West Lafayette, Indianapolis, USA*), conectado a un juego de tres electrodos C-3, con la siguiente configuración: un electrodo de trabajo de carbón vítreo (*BAS model MF-2012, Ø = 3mm*); un electrodo de referencia de AgCl/Ag 3M KCl (*BAS model MW-2063*) y un electrodo auxiliar de platino (*BAS model MW-1032*), todos ellos de West Lafayette, Indianapolis, USA, las señales originales fueron transformados usando, *OriginPro 7.0 software*, y la primera derivada de las señales voltamperométricas fueron obtenidas en

orden, para amplificar y clarificar los picos redox (señales óxido-reducción) presentes en las medidas. Todos los potenciales fueron corregidos a la referencia internacional (*Electrodo Normal de Hidrógeno, NHE*)

El Clorhidrato de Dopamina (DA), L-DOPA, 6-Hidroxidopamina, 5-Hidroxitriptamina (serotonina), L-epinefrina y adrenalina, así como el ácido ascórbico (vitamina C), fueron utilizados de *Sigma-Aldrich* (St. Louis Missouri, USA).

Un volumen de 1.5 ml de plasma fue puesto en una celda de pequeño volumen, protegido con papel aluminio de la luz ambiental y conservados en hielo hasta la lectura, una vez puestos en la celda, fueron sometidos a un ambiente inerte con un flujo de nitrógeno constante (*Ultra Alta Pureza, Praxair, México*).

Los voltamperogramas fueron registrados sobre una ventana de trabajo de entre -1.3 a 1.7 V, a una velocidad de 0.1 Vs⁻¹.

Todas las medidas fueron hechas entre las 11:00 AM y las 16:00 a temperatura ambiente. El electrodo de carbón vítreo fue pulido manualmente con alúmina ($\emptyset = 0,05\mu\text{m}$; *LECO St Joseph Missouri, USA*), con agua bidestilada, usando un pad de algodón (*BAS*) y secados con acetona (*Buehler, Lake Bluff, Illinois USA*), antes de las mediciones.

Inmunohistoquímica

Dos horas después de la última exposición a O₃ cuatro animales de cada grupo fueron anestesiados con pentobarbital sódico (50 mg/Kg i.p.) y perfundidos intracardialmente con paraformaldehído al 4% (*Sigma-Aldrich Chemie, St Louis*

Missouri, USA) en 0.1 M de amortiguador de fosfatos-salina (PBS, *Tecsiquim*; pH 7.4), después, los cerebros fueron fijados con formaldehído 10% por 24 h e incluidos en parafina (*E. Merck, R.F. Alemania*), posteriormente los cerebros fueron cortados en secciones sagitales, a nivel de la SN y del CE a 5 μm en un microtomo (*American Optical, 820 Rotatory*). La inmunohistoquímica para DA y p53 fue hecha de acuerdo a lo siguiente: secciones de cada corte fueron desparafinados en una estufa (*Ríos-Rocha, SA, HS41*) durante 5 minutos, entre 55-60° C, enseguida se pretrataron con solución recuperadora de antígenos (*Biocare Medical*) e introducidos a una olla eléctrica de presión (*Decloacking Chamber, Biocare Medical*) a 25 lb/pulg², durante 5 minutos. Después se lavaron con agua destilada y fueron tratados con H₂O₂ (dilución 1:5 *Fisher Cientific*) por 5 minutos, cada corte fue tratado enseguida con un bloqueador (*Background Sniper, 4plus Detection Component, Biocare Medical*) por 10 minutos, al término del cual fueron lavados con amortiguador de fosfatos (0.1M de PBS, pH 7.4, Merck) e incubados por 12 h a 4 C° con su respectivo anticuerpo (para DA, anticuerpo policlonal de conejo purificado, diluidos 1:500, *Chemicon International*) o p53 (anticuerpo policlonal de conejo purificado, diluidos 1:200, *Biocare*), al final de lo cual los cortes fueron lavados con PBS y tratados con un anticuerpo secundario biotinilado (*Universal Link, Biocare Medical*) por una hora, se lavaron con PBS y tratados con un conjugado de Streptavidina-peroxidasa (*4 plus detection component, streptavidin-hrp, Biocare Medical*) por 30 minutos y lavados con PBS, posteriormente se les trato con 3,3-Diaminobencidina (*DAB substrate Kit, ScyTek*) como cromógeno. Finalmente los cortes fueron lavados con agua destilada y contrastados con solución amortiguadora-hematoxilina.

Secciones cerebrales representativas de cada grupo fueron procesados en paralelo. Secciones representativas del cerebro de cada grupo fueron procesados en paralelo, después de cubrir con cubreobjetos Permount, las secciones fueron examinadas con un microscopio Olympus BX41 y fotografiadas con una cámara Evolución-Qimagin Digital Kit (MediaCybernetics).

Análisis estadístico

Los datos, fueron analizados con una prueba de homogeneidad de varianza (Prueba de Levene) y de acuerdo a la distribución de los datos, se aplicaron pruebas no paramétricas (Prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba U de Mann Whitney).

VIII. RESULTADOS

Los datos de los niveles de peroxidación lipídica y cambios en el número de células inmunorreactivas en la sustancia nigra en función del tiempo de exposición a ozono se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis y cuando se encontraron diferencias estadísticamente significativas se aplicó la prueba de U de Mann-Whitney. Las quinonas de DA (Voltamperometría cíclica) y los datos del nivel de peroxidación de lípidos fueron analizados con pruebas no paramétrica. Para facilitar el análisis de los datos de la voltamperometría cíclica, los datos fueron tratados matemáticamente para obtener la primera derivada de los picos catódicos. Esto permitió el aumento y la definición de las señales que de otro modo no puede observarse tan claramente en un voltamperograma típico. Los valores de la primera derivada de cada grupo se expresaron como mediana y representados en una gráfica para analizarlos estadísticamente, utilizando la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y U de Mann Whitney según Siegel (1991).

Determinación electroquímica de especies oxidadas de DA (DAQ´s)

Curva estándar de DA

La determinación de la curva estándar de DA en un plasma de rata control, se realizó cuando a 1.5 ml de plasma de rata control se le hicieron adiciones en cantidades crecientes de 1 mg de clorhidrato de dopamina (stock), para fijar condiciones iniciales de trabajo (Figura 21).

Grupo control

Al determinar las condiciones de trabajo experimental, encontramos en las curvas del plasma de ratas control –típicas-, una alta conductividad, una electroactividad que va de -1.6 V a +1.7 V, por lo que este rango, fue considerado como nuestra ventana de trabajo. Una resistencia promedio de 200 Ω , en nuestro arreglo de celda electroquímica. Los potenciales reportados están dados con respecto al electrodo normal de hidrógeno (NHE).

Cuando los voltamperogramas se escanean de cero a potenciales positivos, se registran dos pequeñas ondas anódicas, Ia y IIa, que se encuentran en 0.597V y 1.147V respectivamente (figura 2a). La onda Ia es amplia y es causada por la oxidación de especies de DA y por el ácido ascórbico, que ocurre también a potenciales muy cercanos. La onda IIa es causado por la oxidación de otros componentes plasmáticos. Cuando en el mismo plasma, se hace el barrido de cero a potenciales negativos, no se observan picos catódicos, incluso intentando primera derivada matemática (Figura 22b).

Grupos de ozono

Los voltamperogramas cíclicos de plasma de ratas expuestas a ozono por 15, 30 y 60 días (Figuras 23^a 24^a y 25^a), muestran un pico (Ic) en la zona catódica, que son debidas a un proceso de electroreducción irreversible de DAQ's sobre el electrodo de carbón vítreo, sin interferencia del ácido ascórbico (AA).

Los valores de densidad de corriente del pico Ic, se incrementan directamente como una función del tiempo de exposición a ozono, como se observa en la primera derivada matemática de las señales catódicas (Figuras 23b, 24b y 25b). Esos resultados, son las medias de la primera derivada de los picos catódicos. Los registros electroquímicos de los plasmas de los animales expuestos a ozono por 15, 30 y 60 días, muestran un

incremento en los valores de la densidad de corriente que se observan en los picos Ic de $22\mu\text{A cm}^{-2}$, $40\mu\text{A cm}^{-2}$, y $90\mu\text{A cm}^{-2}$ (Figuras 23b, 24b y 25b respectivamente).

Niveles de Dopamina Oxidados (DAQ's)

Al tabular los promedios de las señales de las especies oxidadas de DA (DAQ's) para todos los tratamientos, la prueba de Kruskal-Wallis arrojó diferencias significativas en los valores en la densidad de corriente del pico Ic entre los diferentes grupos ($p < 0,001$). La prueba de U de Mann Whitney mostró que la primera derivada de los valores de densidad de corriente de los picos catódicos (pico Ic) en todos los grupos expuestos a ozono, muestran diferencias significativas a 15, 30 y 60 días ($p < 0,05$) comparados con el grupo control (Figura 26).

Índice de Dopamina oxidada/ Dopamina reducida

Cuando se tomaron los valores de especies oxidadas de DA y se dividieron con los valores de la DA reducida (DAoxidada/DA reducida), se calculó un coeficiente de relación para cada grupo. Se observó que los tratamientos son diferentes estadísticamente, con respecto al grupo control, se nota un incremento gradual y constante en ellos. Por lo tanto deducimos que entre mayor DA oxidada es menor la DA reducida, lo que indica que la DA que originalmente estaba reducida se fue transformando en DA oxidada. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba de Kruskal-Wallis, seguido por U de Mann-Whitney con un nivel de significancia de $*p < 0,05$, donde las barras representan el error estándar, $n=6$. (Figura 27).

Peroxidación lipídica (LPO's)

LPO's plasmáticos

En el análisis de los niveles plasmáticos de LPO, encontramos los aumentos de $59,3 \pm 1,2$ nmol / mL, $69,3 \pm 1,5$ nmol / mL y $78,33 \pm 0,4$ nmol / mL en función del tiempo de

exposición al ozono (15, 30 y 60 días), en comparación con el grupo control, que tenía un nivel de LPO de $47,37 \pm 0,63$ nmol/mL (Figura 28). La prueba de Kruskal-Wallis mostró diferencias significativas entre los grupos en los niveles de LPO en plasma ($P < 0,001$). La prueba de Mann-Whitney mostró que en los niveles de LPO todos los grupos expuestos a ozono, fueron significativamente mayores en comparación con el grupo control ($p < 0,001$).

LPO´s Cuerpo Estriado (CE)

Los datos promedio de los diferentes niveles de lípidos peroxidados (LPO) en homogenados de cuerpo estriado (CE) de ratas expuestas a O_3 , se compararon primero vs el grupo control, y se encontró una diferencia significativa de $*p < 0.001$, solo en los grupos de 30 y 60 días. Enseguida se compararon entre los tratamientos y se observa diferencia significativa entre 15 y 60 días. Sin embargo entre 15 y 60 días hay tendencia a ser diferentes a $**p < 0.05$. Apenas una ligera diferencia que ya no es tan clara, lo que indica que desde los 15 días de exposición a ozono (10.5 nmol/mL ± 1.2), el daño a cuerpo estriado se hace presente y una vez que empieza, este progresa de manera irreversible, llegando incluso a estar a más del doble de oxidado que el grupo de 15 días de exposición a ozono (22.5 nmol/mL ± 5.5). El análisis estadístico se realizó mediante una prueba de Kruskal-Wallis, seguido por U de Mann-Whitney, $n=6$. Las barras representan el error estándar (Figura 29).

LPO´s en Sustancia Nigra

Al mostrar concentraciones de los niveles de LPO´s, en homogenados de SN de ratas expuestas a O_3 , nos percatamos que aquí se presenta el mayor aumento en los niveles de

LPO's (15 días de exposición a ozono: 9 nmol/mL \pm 2, 30 días de exposición a ozono: 19.1 nmol/mL \pm 3 y 60 días de exposición a ozono: 30.5 nmol/mL \pm 3.5), ya que el aumento total de LPO's en CE es de 12 nmol/mL en 45 días de exposición a ozono, mientras que el aumento total de LPO's en SN es de 21 nmol/mL, y el de plasma de 19 nmol/mL en ese mismo lapso de tiempo, representando casi el doble que el aumento de CE y ligeramente mayor al aumento en el plasma, lo que nos da una clara idea del grave daño que se presenta de manera particular en la sustancia nigra, en eventos de estrés oxidativo y siendo consistente con lo reportado en la bibliografía. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba de Kruskal-Wallis, seguido por U de Mann-Whitney con un nivel de significancia de * $p < 0.05$, $n=6$. Las barras representan el error estándar (Figura 30).

Inmunohistoquímica

Inmunoreactividad contra Dopamina

Las neuronas dopaminérgicas sanas y un pericarion bien definido puede ser visto en la inmunohistoquímica contra DA en el grupo control (Figura 31, foto a). En los grupos expuestos a ozono, la morfología normal de las neuronas se perdió en la sustancia nigra para los 30 y 60 días (Figura 31, fotos c y d), adicionalmente se observa una disminución progresiva en la inmunoreactividad, causada por el aumento en la muerte celular dopaminérgica. En la sustancia nigra de los animales expuestos a ozono en los 30 y 60 días, el núcleo se desplaza y las vacuolas citoplasmáticas se pueden ver.

En la gráfica 12, se muestran diferencias significativas en los grupos expuestos a ozono, por 15, 30 y 60 días ($P < 0,05$) en comparación con el grupo control. Los grupos

expuestos a ozono durante los días 30 y 60, tienen significativamente menos neuronas que el grupo de 15 días expuesto a ozono ($p < 0,05$).

Inmunorreactividad contra p53

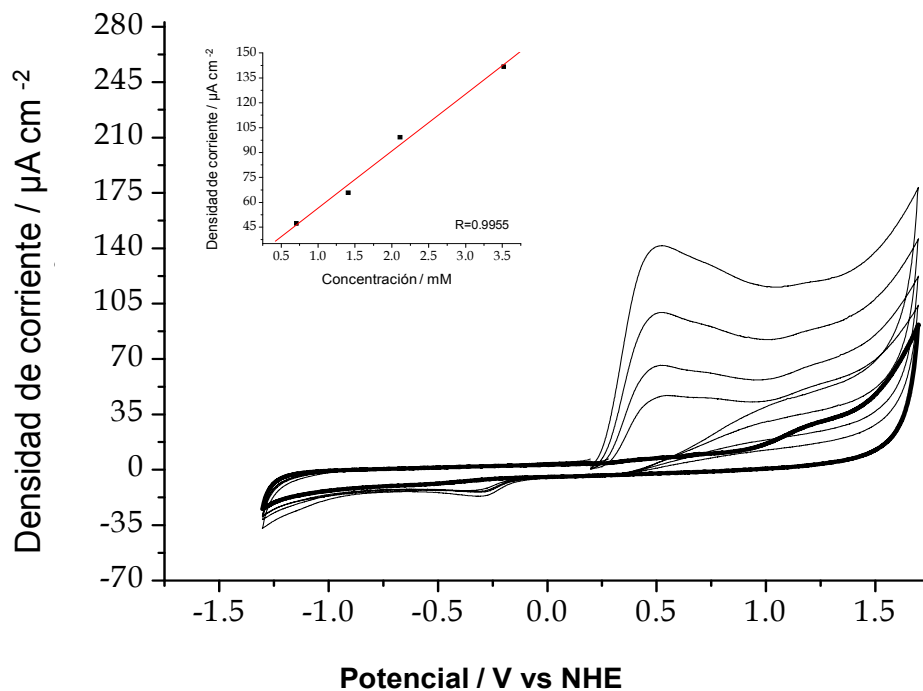
Inmunorreactividad de p53 en sustancia nigra. Se observa Aumento progresivo de la inmunorreactividad en las células desde los 15 días de tratamiento a ozono y se puede observar translocación del núcleo de p53 después de 30 días en la sustancia nigra (Figura 33, fotos c y d).

La prueba de Kruskal-Wallis mostró diferencias significativas en el recuento de células endoteliales ($p < 0,05$). La U de Mann-Whitney U-test mostró una diferencia significativa entre el control y los grupos tratados con ozono de 30 y 60 días ($p < 0,05$) (Figura 34).

Relación entre LPO's y DAQ's

Para obtener el nivel de correlación que existe entre los niveles de las especies DA-oxidada y los niveles de LPO, los datos primero fueron agrupados en una gráfica de Scatter plot, y posteriormente se calculo un coeficiente de correlación de Spearman y nuestros resultados indican que existe una fuerte correlación entre los LPO's y los metabolitos de DA oxidada, con un coeficiente de 0.940 (Figura 35).

VOLTAMPEROMETRÍA CÍCLICA



Curva estándar de DA

Figura 21. En esta gráfica se muestra la curva estándar de DA en un plasma de rata control. A 1.5 ml de Plasma control se le fueron agregando 1mg de clorhidrato de dopamina.

VOLTAMPEROGRAMA DE PLASMA DE RATA CONTROL (Y SU PRIMERA DERIVADA)

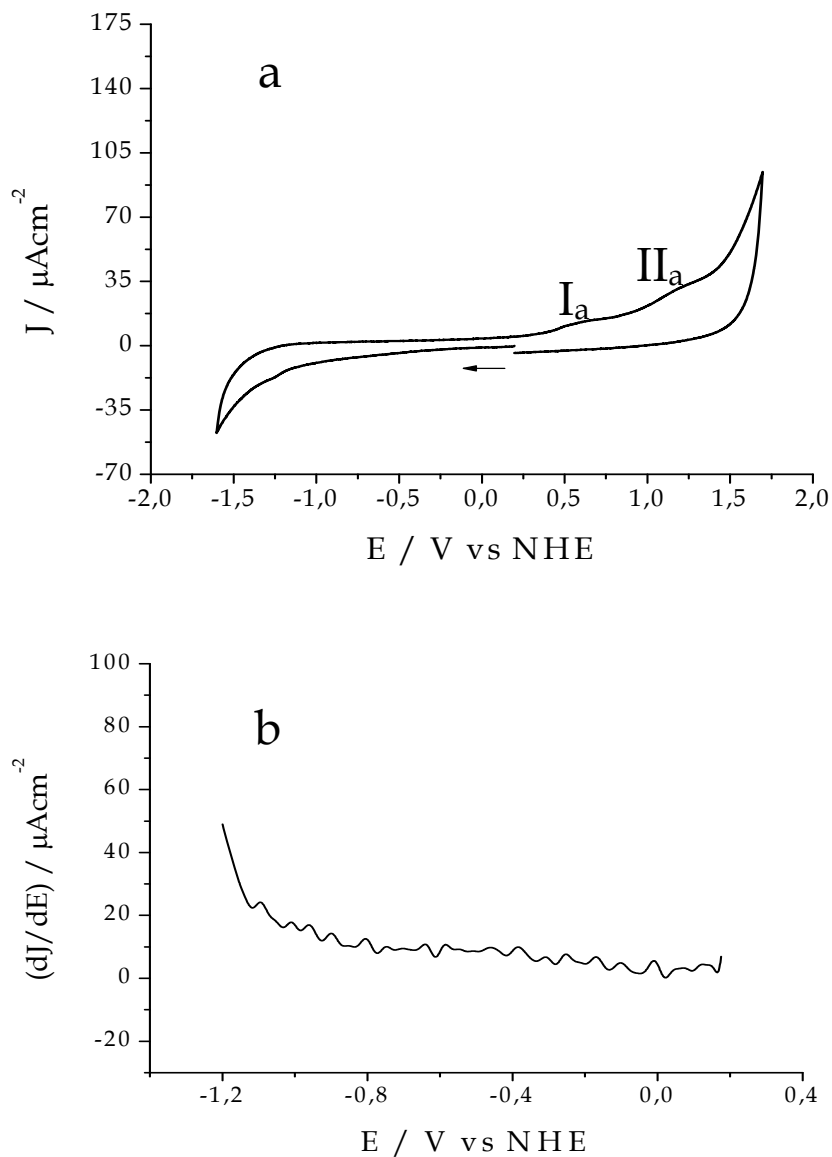


Figura 22. Se muestra un voltamperograma tipo, de una lectura tomada del plasma de una rata control, en donde en el pico I_a (corriente anódica), muestra el potencial que corresponde a la DA reducida. En la gráfica 2b aparece la primera derivada (no se observa una señal que haga pensar en la DA oxidada).

VOLTAMPEROGRAMA TIPO DE PLASMA DE RATA EXPUESTA A 15 DÍAS

DE O₃

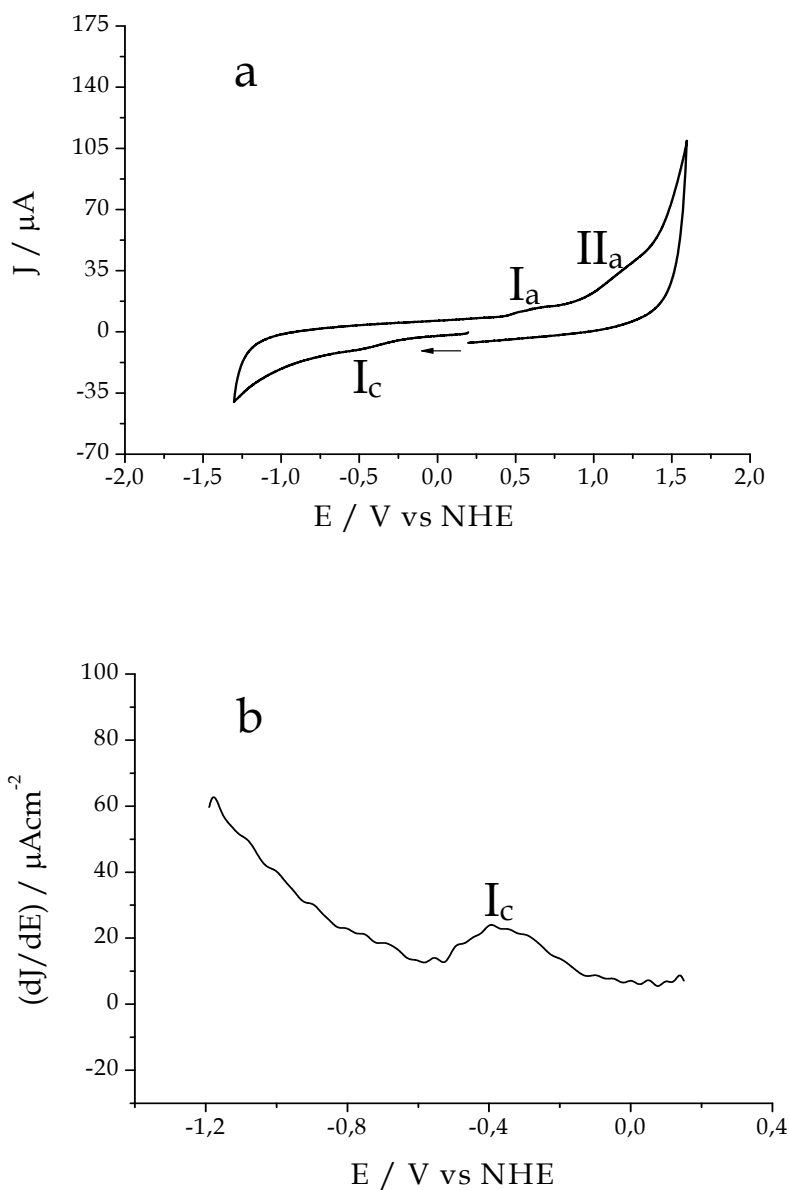


Figura 23. Muestra un voltamperograma tipo, de una lectura tomada del plasma de una rata con 15 días de exposición a O₃, en donde en el pico **I_a** (corriente anódica), muestra el potencial donde se halla la DA reducida. Y en el pico **I_c** (corriente catódica), señala el potencial donde empieza a formarse la DA oxidada (Amplificado, para definirlo mejor con la primera derivada de la señal **I_c**, en la gráfica 3b).

**VOLTAMPEROGRAMA TIPO PARA UNA RATA DE UN MES DE
EXPOSICIÓN A O₃**

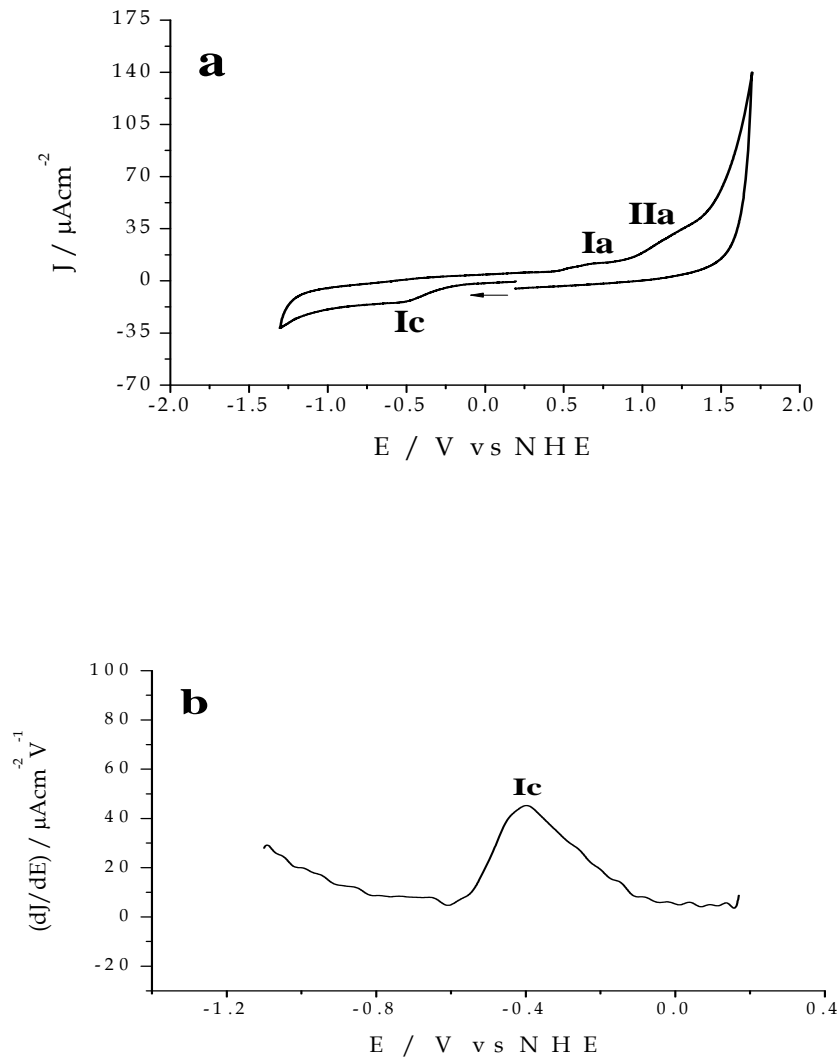


Figura 24. Se muestra un voltamperograma tipo, de una lectura tomada del plasma de una rata con 1 mes de exposición a O₃, en donde en el pico Ia (corriente anódica), muestra el potencial que corresponde a la DA reducida. Y en el pico Ic (corriente catódica), señala el potencial que corresponde a la DA oxidada. En la gráfica 4b (abajo) aparece la primera derivada de ese pico, para ampliar y definir mejor el potencial hallado.

**VOLTAMPEROGRAMA TIPO DEL PLASMA DE RATA DE 2 MESES DE
EXPOSICIÓN A O₃**

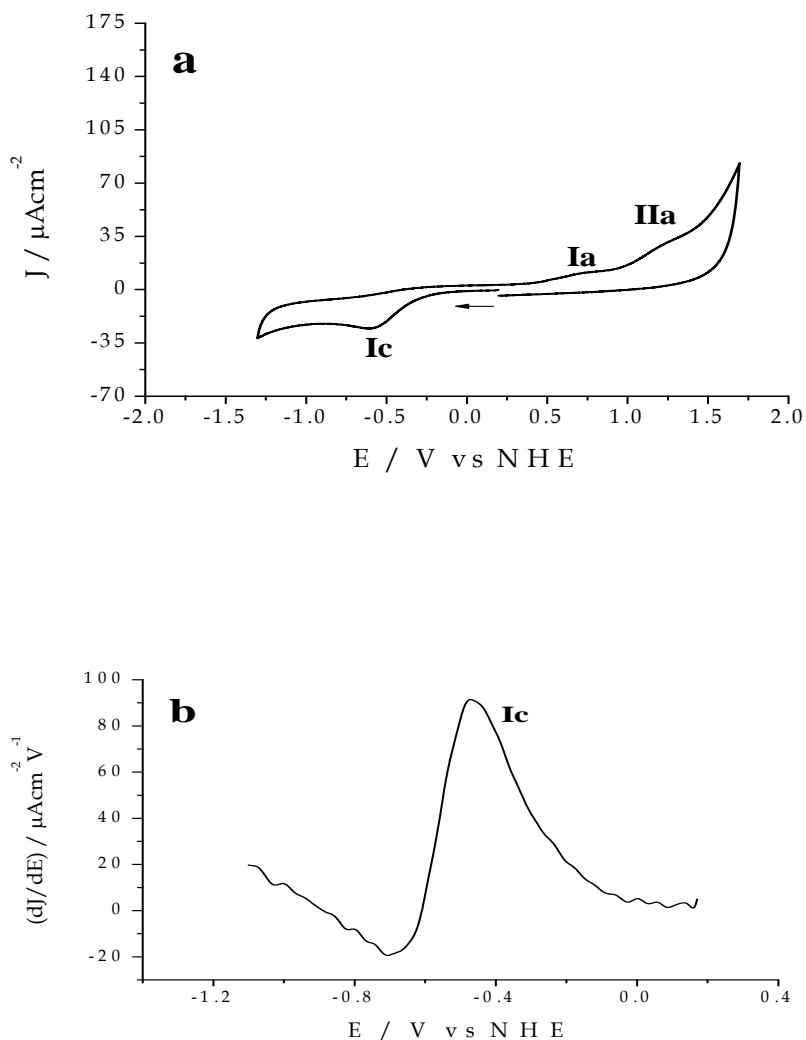


Figura 25. Muestra un voltamperograma tipo del plasma, de ratas expuestas durante 2 meses a O₃, en donde en el pico **Ia** (corriente anódica), muestra el potencial que corresponde a la DA reducida. Y en el pico **Ic** (corriente catódica), señala el potencial que corresponde a la DA oxidada. Con respecto al grupo de 1 mes (Gráfica 4), ese potencial se ha incrementado notoriamente, lo que es indicativo de la formación de quinonas de dopamina. En la gráfica de abajo aparece la primera derivada de ese pico, para ampliar y definir mejor el potencial hallado (5b).

CONCENTRACIONES DE DOPAMINA OXIDADA

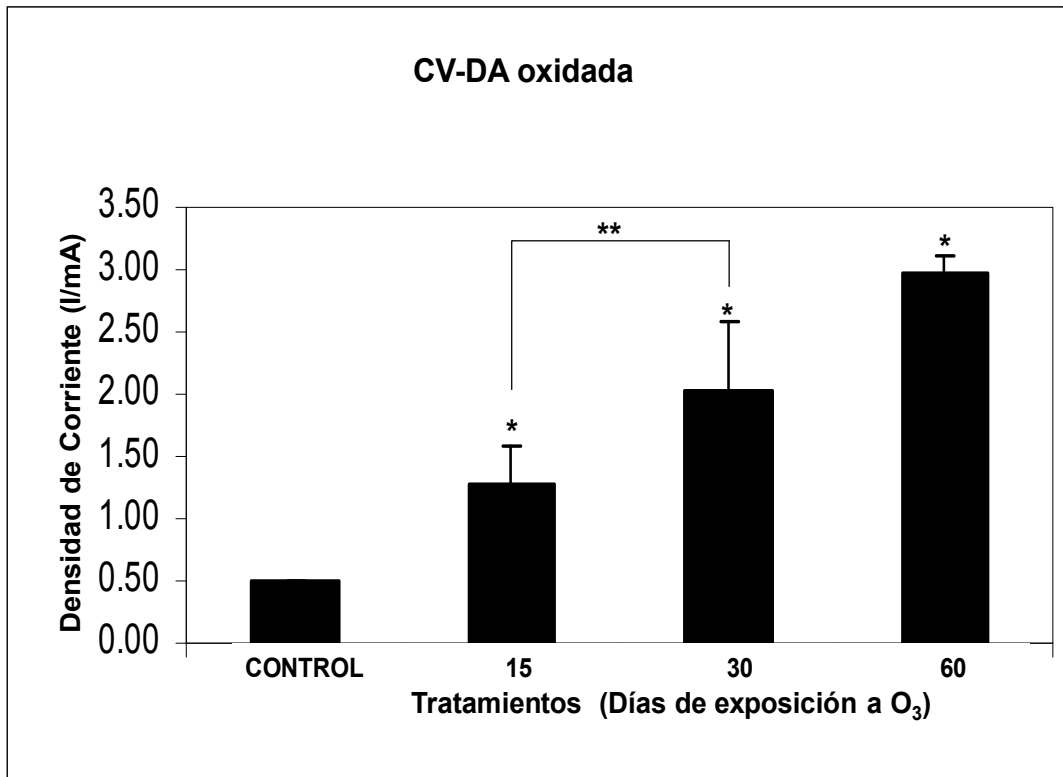


Figura 26. En la gráfica se presenta el promedio de las lecturas tomadas en los voltamperogramas en el plasma de ratas expuestas a O₃. En el eje de las ordenadas se muestran los niveles de DA oxidada (Dado por la densidad de corriente I/mA) y en el eje de las abscisas los tratamientos. Todos los grupos presentan diferencias respecto del control a * $p < 0.05$, $n=6$, las barras representan el error estandar.

INDICE DE DOPAMINA

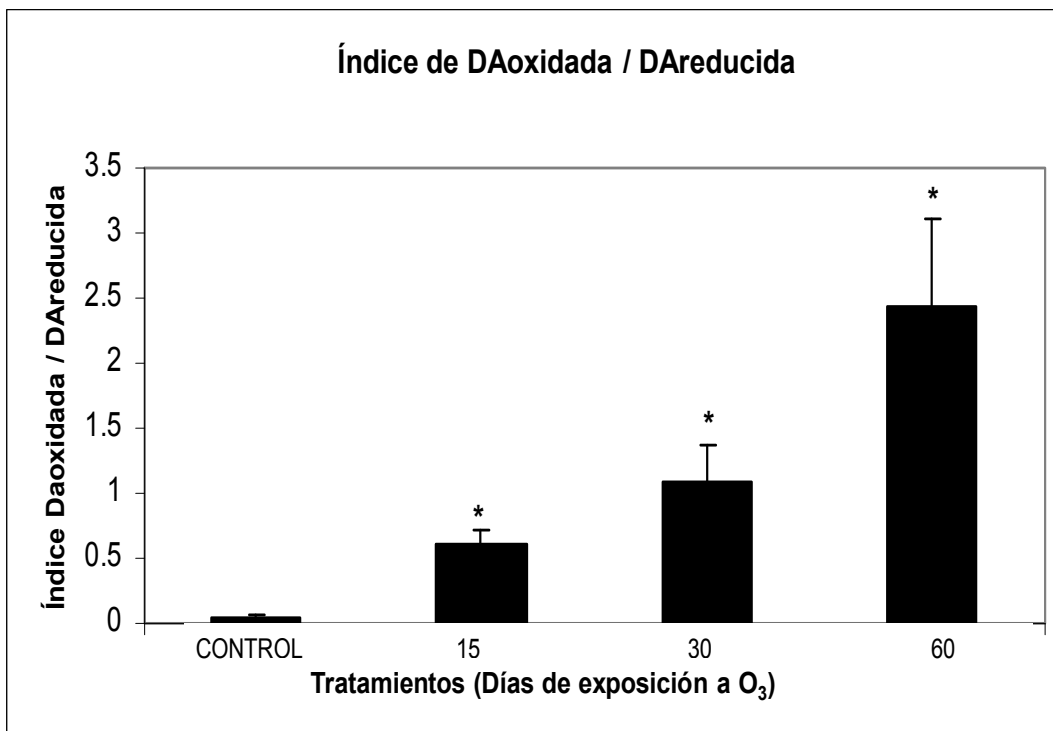


Figura 27.0 Representa el coeficiente de la dopamina oxidada como tasa de relación entre lo que se oxida y se reduce (DAoxidada/DAreducida), del promedio de lecturas tomadas en plasma de ratas expuestas a O₃. En el eje de las ordenadas se encuentra el coeficiente de DAoxidada / DAreducida y en la abscisa se registran los diferentes tratamientos. Nivel de significancia de * $p < 0.05$, $n=6$. Las barras representan el error estándar.

PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS (LPO) EN PLASMA

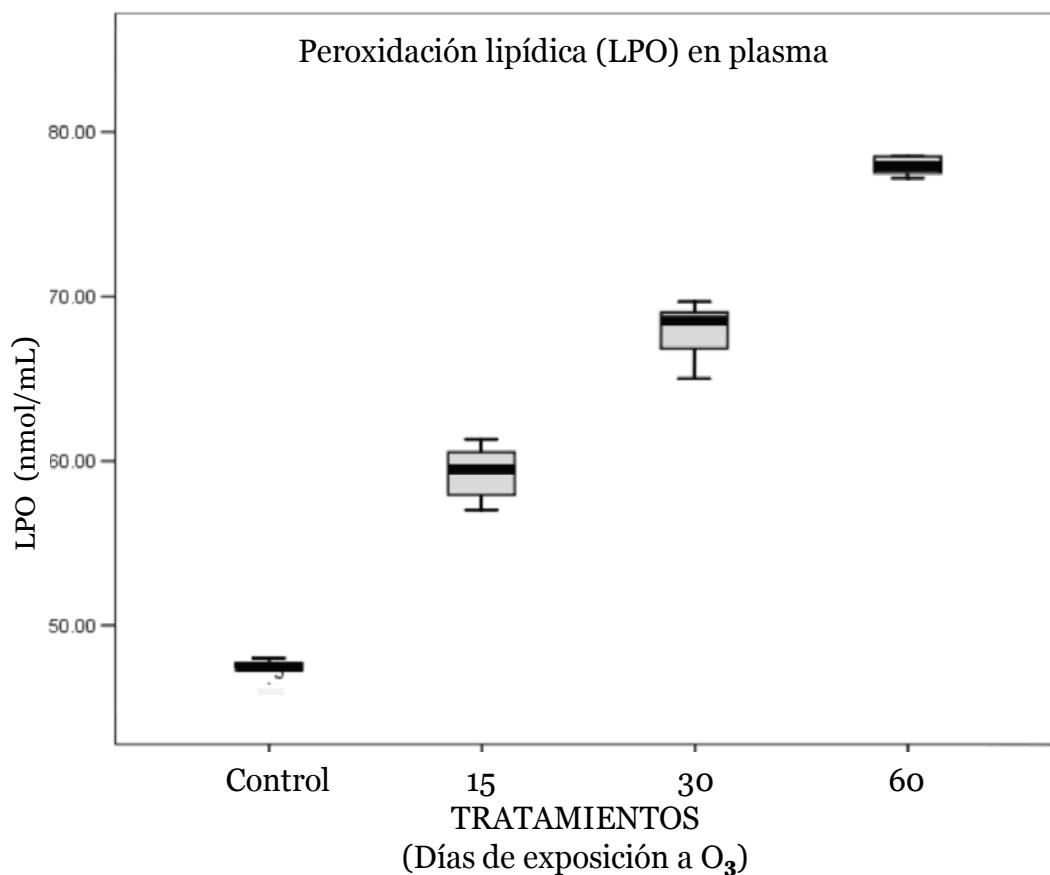


Figura 28.0 Gráfica que muestra los niveles de peroxidación lipídica (LPO) en el plasma de ratas expuestas a O₃. Los histogramas muestran la concentración de LPO (nmol/mL) en el eje de las ordenadas. El tratamiento (grupo control, 15, 30, y 60 días de exposición al ozono) se representa en el eje de las abscisas. Las cajas representan la media de los niveles de LPO's (para cada grupo de n = 6). Los errores estándar están representados por la línea sobre el cuadro.

PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS (LPO) EN CUERPO ESTRIADO

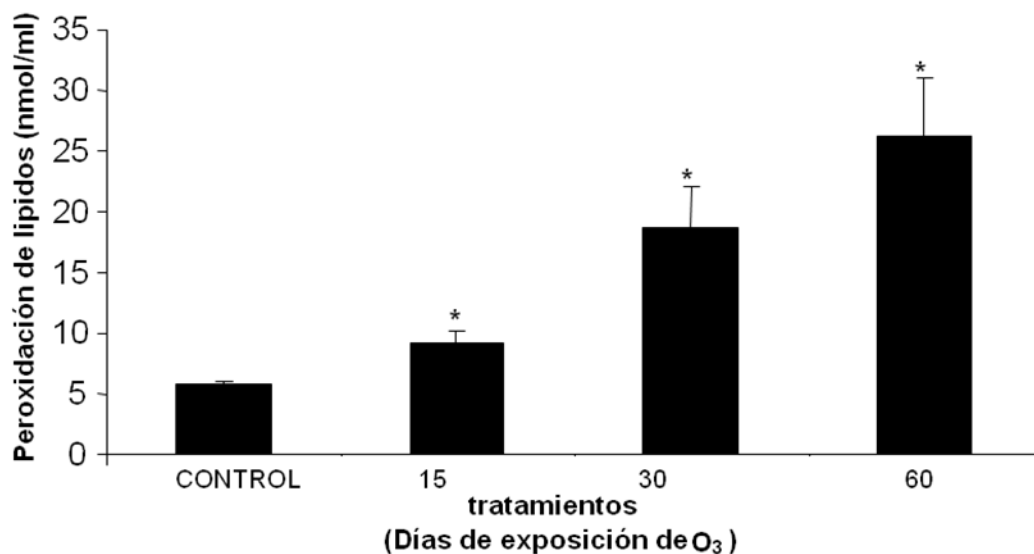


Figura 29.0 En el histograma se muestran los niveles de lípidos peroxidados (LPO) en homogenados de cuerpo estriado (CE) de ratas expuestas a O₃. En el eje de las ordenadas están las concentraciones de LPO's (nmol/mL) vs tratamientos (Eje de las abscisas). Se compararon los tratamientos primero vs el grupo control, y se encontró una diferencia significativa de *p< 0.05. n=6. Las barras representan el error estándar.

PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS (LPO) EN SUSTANCIA NIGRA

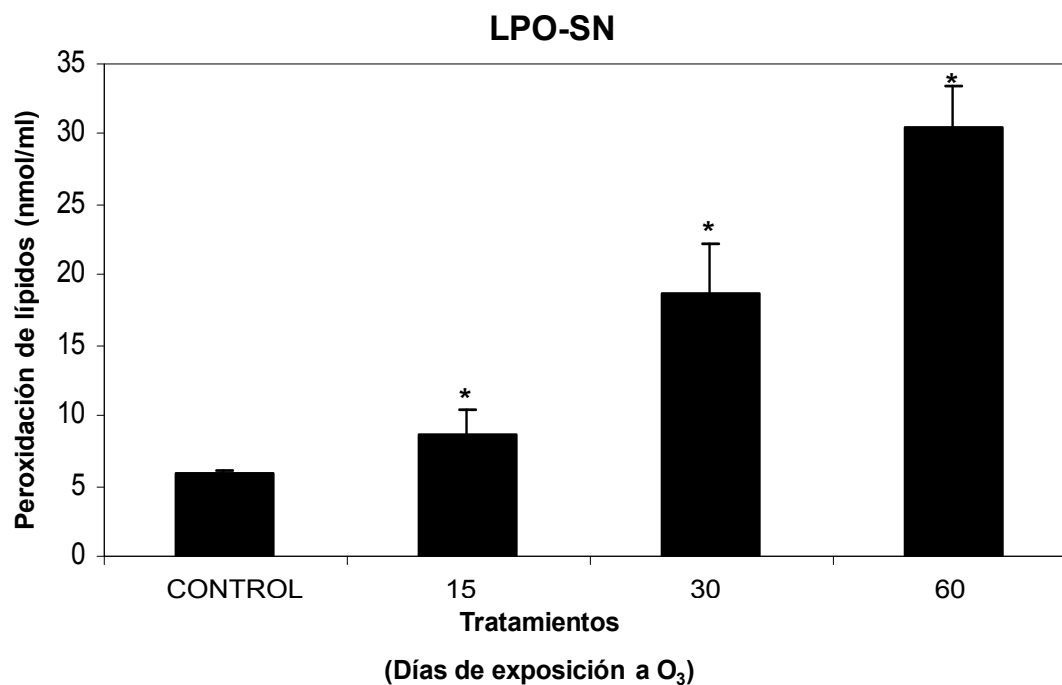


Figura 30 Se muestran concentraciones de los niveles de LPO's, en homogenados de SN de ratas expuestas a O₃. En el eje de las ordenadas se encuentran estos niveles (nmol/mL) y en el eje de las ascisas se representan los tratamientos, *p < 0.05. n=6. Las barras representan el error estándar.

INMUNOHISTOQUIMICA (IHQ) vs DOPAMINA

IHQ-DA

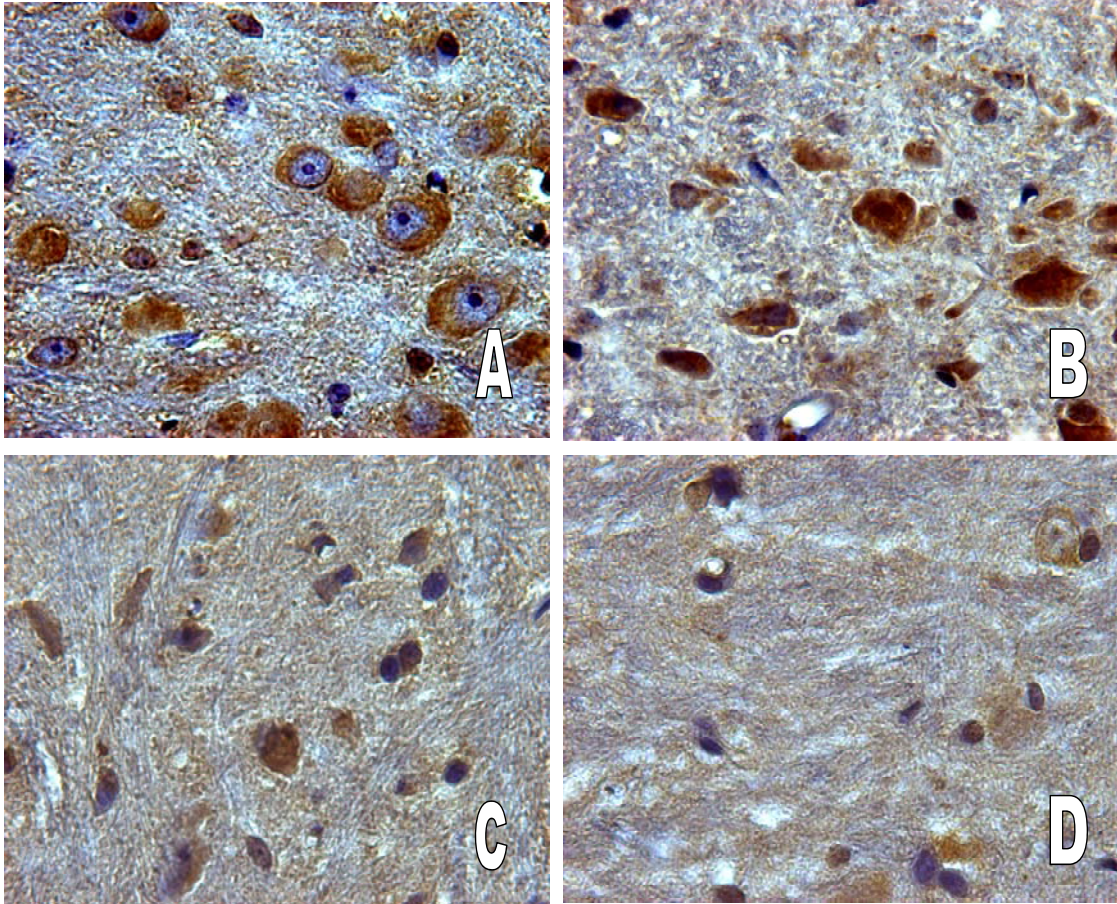


Figura 31 La microfotografía muestra las células inmunoreactivas contra DA en SN debido los efectos de la exposición a O₃. (A) Grupo control, (B) ratas con 15 días de tratamiento a O₃, (C) ratas con un mes a O₃ y (D) ratas con 2 meses de tratamiento a O₃. Se observa una pérdida progresiva y constante en el número promedio de neuronas. Las microfotografías fueron tomadas a 40x y contrastadas con Hematoxilina.

NÚMERO DE CELULAS DOPAMINERGICAS EN SUSTANCIA NIGRA (SN)

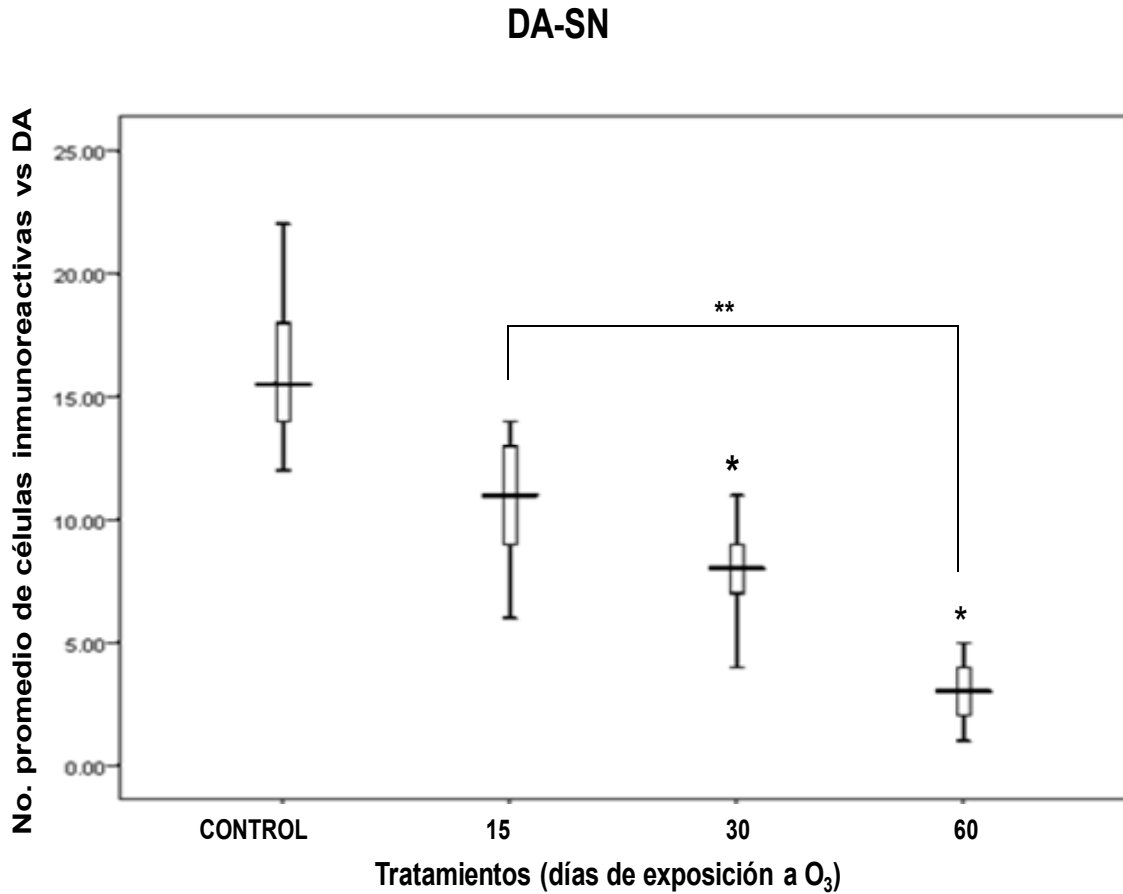


Figura 32 Efectos de la exposición a O₃, sobre el número promedio de células inmunoreactivas contra DA en sustancia nigra. En el eje de las ordenadas se encuentra el número de células inmunoreactivas contra p53 en sustancia nigra y en la abscisa se encuentran los tratamientos, se muestra las diferencias estadísticamente significativas entre 30 y 60 días contra el grupo control a $p < 0.05$, también existen diferencias significativas entre 15 y 30 días de exposición a O₃

INMUNOHISTOQUIMICA (IHQ) vs p53

P 53

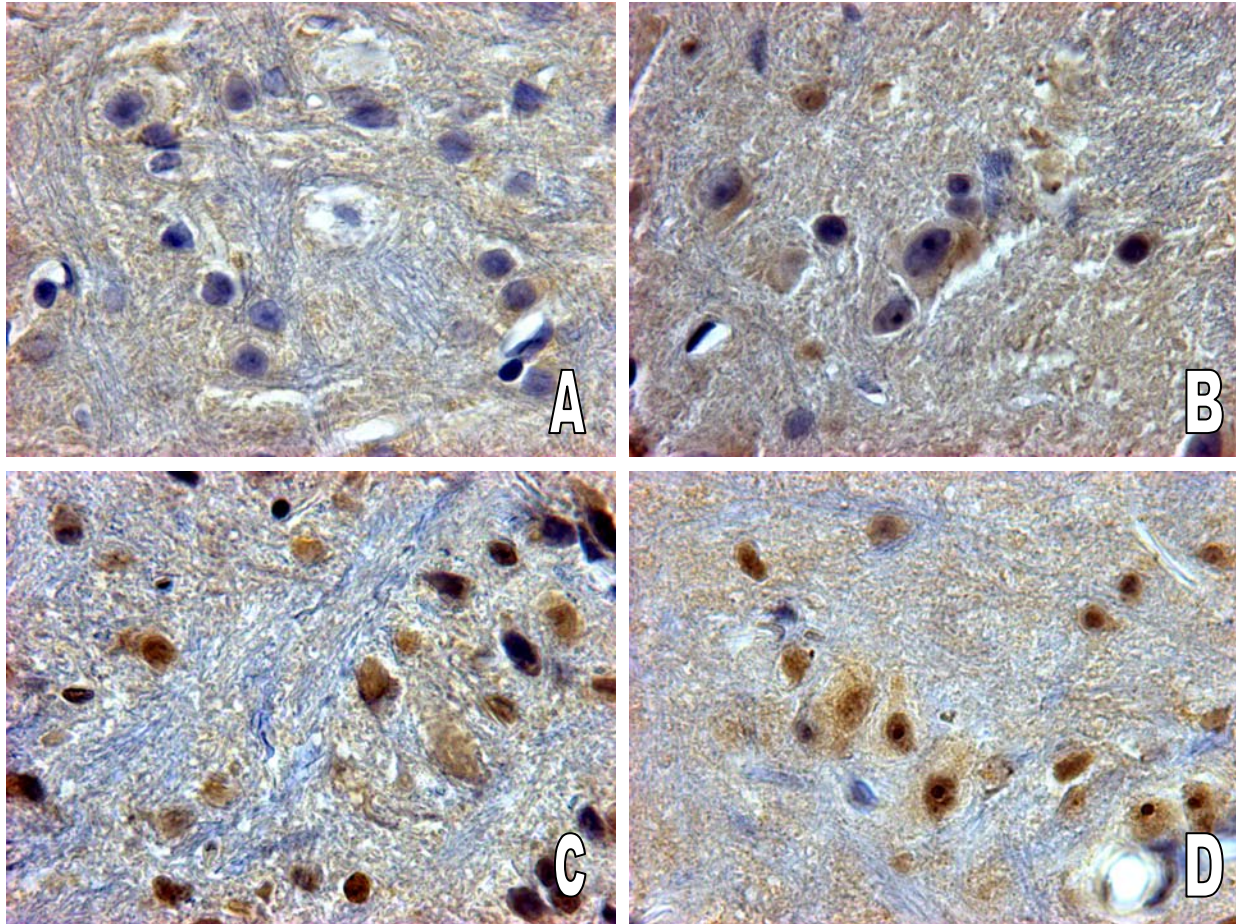


Figura 33 La microfotografía muestra las células inmunoreactivas contra p53 en SN debido los efectos de la exposición a O₃. (A) Grupo control, (B) ratas con 15 días de tratamiento a O₃, (C) ratas con un mes a O₃ y (D) ratas con 2 meses de tratamiento a O₃. Se observa como aumenta la inmunoreactividad en la sustancia nigra y la translocación de p53 al núcleo. Las microfotografías fueron tomadas a 40x y contrastadas con Hematoxilina.

CONTEO CELULAR DE p53 EN SUSTANCIA NIGRA

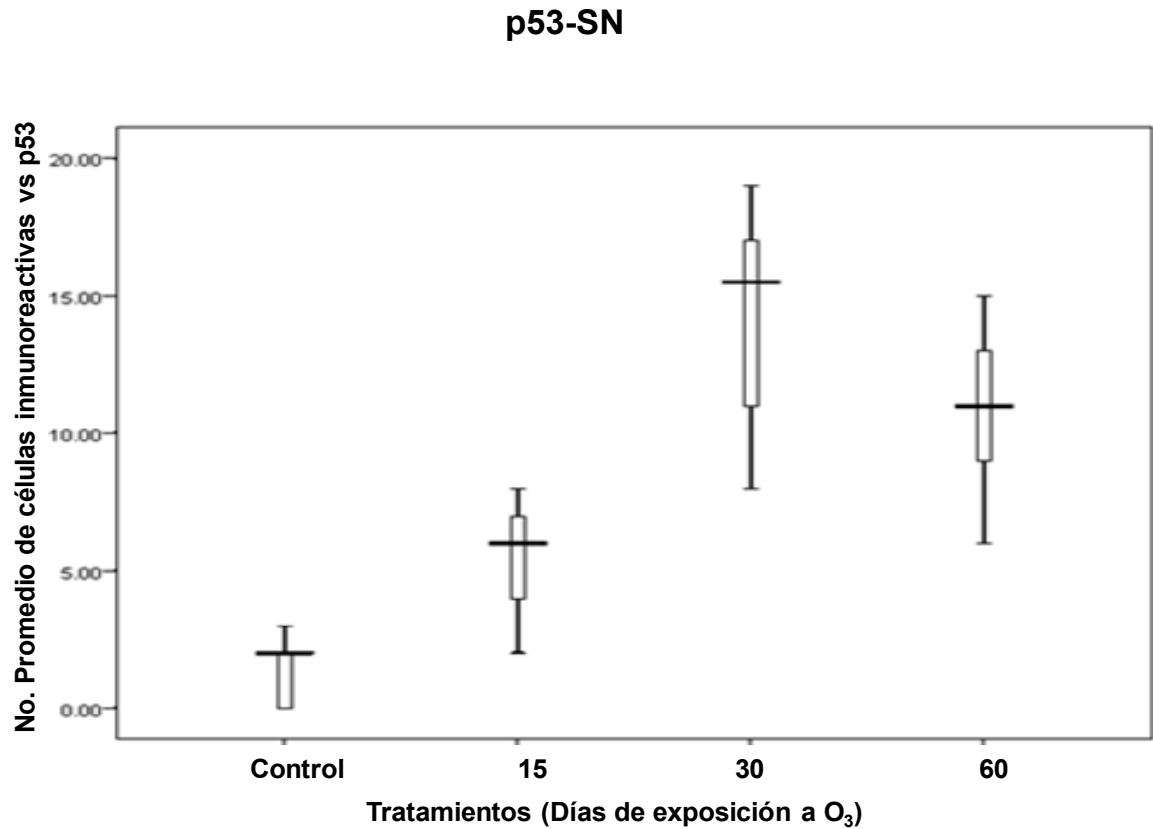


Figura 34 Efectos de la exposición a O₃, en el número de células inmunoreactivas contra p53 en sustancia nigra. En el eje de las ordenadas se encuentra el número promedio de células inmunoreactivas contra p53 en sustancia nigra y en la abscisa se encuentran los tratamientos, se muestra las diferencias estadísticamente significativas entre 30 y 60 días contra el grupo control a $p < 0.05$, aunque no hay diferencia significativa entre los tratamientos.

**COEFICIENTE DE CORRELACIÓN DE SPEARMAN ENTRE LPO'S Y DAQ'S
PLASMATICOS**

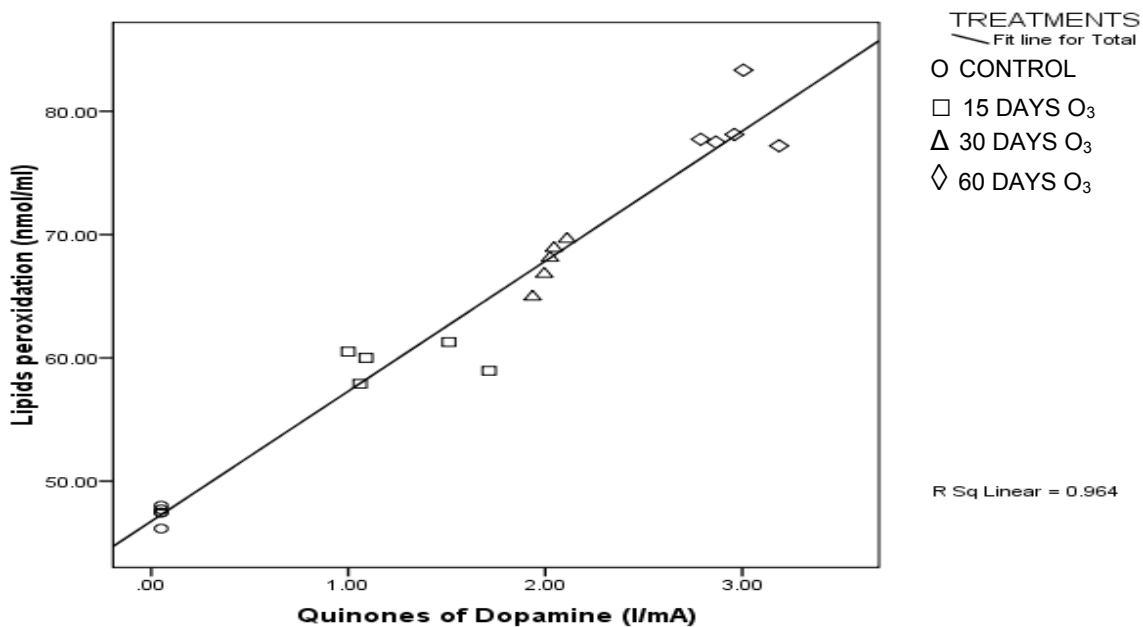


Figura 35. Muestra la correlación que existe entre los LPO plasmáticos y las DAQ's determinadas en plasma. El valor del coeficiente de correlación que existe entre ambos fenómenos, es de 0.961. Del cual se interpreta que existe una correlación significativa entre la formación de las DAQ's y el daño a lípidos plasmáticos.

IX) DISCUSION

En el presente trabajo se muestran evidencias de cómo el estrés oxidativo causado por exposición crónica a O_3 , induce a un proceso de neurodegeneración progresiva, el cual cursa con un aumento en la producción de metabolitos oxidados de la dopamina en rata.

En condiciones de homeóstasis tanto la síntesis de DA, como de neuromelanina presentan un metabolismo oxidativo, en cuya vía se van originando una serie de productos y subproductos altamente reactivos que en su mayoría son ROS y RNS. En la síntesis de DA se produce H_2O_2 cuando la TH actúa sobre la L-Tyr para sintetizar L-DOPA, el H_2O_2 es un producto de la reducción que indirectamente sufre el O_2 a causa de transferir el grupo hidroxilo sobre la L-Tyr (Graham, 1978). Ya que una vez sintetizada la DA, la vía de degradación más común, sufre una serie de pasos, también oxidativos que producen especies reactivas, a través de la acción de la MAO (principalmente MAO-B) y de oxígeno molecular para producir 3,4-dihidroxifenilacetaldehído (DOPAL). Debido al metabolismo oxidativo que sufre la síntesis de DA, existen mecanismos que contrarrestan el efectos de esas especies reactivas en SN, como la formación del pigmento neuromelanina, que en condiciones de homeóstasis redox actúa neutralizando químicamente una importante variedad de DAQ's (Zecca y cols., 2006). Así como también los sistemas antioxidantes endógenos como el sistema glutatión, cuyo contenido mitocondrial en las neuronas es importante, (Marian y cols., 2007; Sanchez y cols., 2010) y antioxidantes no enzimáticos como el ácido ascorbico (Kedar y cols., 1999; Sanchez y cols., 2010), el efecto antioxidante de la Q_{10} (Navarro y Boveris, 2010; López

y cols., 2010), el sulfuro de Hidrógeno (H_2S), que como gas, difunde eficientemente entre las estructuras membranales, favoreciendo reacciones antioxidantes (Sebastian y cols., 2011).

Durante la síntesis de la neuromelanina a partir de la DA. El primer compuesto que se sintetiza puede ser la DA-orto-semiquinona, formando como subproducto de la reacción radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Enseguida, se sintetiza la DA-o-quinona, produciéndose nuevamente en este punto más $O_2^{\cdot-}$, para luego sintetizar Dopaminocromo, 5,6-Dihidroxiindol y finalmente DA-p-quinona, a partir de este último compuesto, se inicia la polimerización (y formación de neuromelanina), formando como subproductos de reacción cantidades adicionales de $O_2^{\cdot-}$. El metabolismo oxidativo de la dopamina puede ser contrarrestado eficientemente por la coenzima Q_{10} o ubiquinona (CoQ_{10}), la cual sirve como un donador y aceptor de electrones. La inclusión de la Q_{10} en la dieta tiene la capacidad de modular las especies reactivas que se forman durante la actividad cotidiana (Shults y cols., 1999; Navas y cols., 2002; Hart, 2005; Amany y Hala, 2008; Carine y cols., 2008; Navarro y Boveris, 2010; López y cols., 2010). Aunque la formación de neuromelanina sigue siendo aceptada como la estrategia de contención de especies reactivas formadas por DAQ's más importante (Zecca y cols., 2006).

Por otra parte, la DA puede formar metabolitos reactivos a través de una vía secundaria de reacción. Debido a la naturaleza inestable del anillo fenólico de la DA, los dos grupos OH, pueden ser oxidados a DAQ's. Las quinonas de DA (DAQ's) pueden reaccionar con la cisteína y producir residuos de cisteinil, estos residuos son capaces de inhibir la función de muchas proteínas, y producir disminución de ATP por bloqueo de la cadena respiratoria (Ramsden y cols 2001; Van y Berman, 2009). El daño que eventualmente

pueden causar en eventos de estrés oxidativo van desde daños directos e indirectos (Ikuko y Masato, 2008, 2009; Masato y cols., 2004, 2008; Van y cols., 2004; Yang y Garry, 2010).

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que conforme aumenta el tiempo de exposición a O₃ en las ratas, se va incrementando el estrés oxidativo (Figuras 26-34), induciendo un aumento en la oxidación de la DA (Figuras 23, 24, 25, 26 y 27) y por lo tanto un incremento en la formación de DAQ's, así mismo va disminuyendo la DAH (Figura 27). La progresión del daño y muerte de neuronas dopaminérgicas se va extendiendo (figuras 31 y 33). Así mismo el incremento en los niveles de lípidos peroxidados (LPO) indica que los animales presentaban estrés oxidativo (Figura 28, 29 y 30). Los LPO hechos en homogenados de cuerpo estriado de ratas expuestas a O₃ a los diferentes tiempos, muestran diferencia significativa con respecto del grupo control, se observa también que los niveles más altos de LPO se presentan a los dos meses de exposición a O₃ (Figura 29). Los LPO en sustancia nigra, presentan niveles elevados desde los 15 días de exposición a O₃ (Figura 30), a diferencia de los niveles en el estriado. Estos niveles continúan aumentando hasta los dos meses de exposición a O₃. Las concentraciones de LPO determinados en el plasma de las ratas expuestas a O₃, en los diferentes tratamientos son más elevados respecto de los niveles cerebrales (cuerpo estriado y sustancia nigra), cuyo rango va de 5 a 35nmol/mL (Figura 28). Esto tiene sentido con el modelo de exposición a O₃, ya que al inhalar el gas, las primeras estructuras involucradas en el daño, son los pulmones y cuando las defensas antioxidantes pulmonares no alcanzan a contrarrestar el daño oxidativo crónico, se forman especies reactivas secundarias, que llegan por el torrente sanguíneo a SNC

(Dorado y cols., 2001; Pryor y cols., 1991 y 2003; Sies, 1991 y 2007). La estructura que presenta los niveles más elevados de lípidos peroxidados es la sustancia nigra, a razón de 25 veces más a los dos meses de exposición a ozono con respecto de su control (Figura 30).

Los niveles de LPO, en cuerpo estriado, SN y plasma de ratas expuestas a O₃ también aumentan, conforme aumenta el tiempo de exposición a O₃ (15 días, uno y dos meses), lo que nos indica que el estado de estrés oxidativo se va incrementando a medida que aumenta el tiempo de exposición a O₃, esto lo podemos relacionar con el daño oxidativo a las neuronas que también va aumentando, estableciendo un proceso de neurodegeneración progresiva (Figura 31 y 33).

Por otro lado el número de células inmunoreactivas contra DA (Figura 31), muestra una disminución estadísticamente significativa de los tratamientos con respecto al control y también existe una diferencia entre 15 días, 1 mes y 2 meses de exposición a O₃, lo que demuestra que las neuronas dopaminérgicas se van perdiendo conforme aumenta el daño oxidativo ocasionado por O₃ (Figura 32), adicionalmente se demuestra por el número de células reactivas a p53 comparados con las mismas condiciones (Figura 33 y 34), similar a lo reportado por da Costa C.A. y cols., 2010.

Estos resultados nos indican que conforme se va estableciendo el estrés oxidativo por un aumento en el tiempo de exposición a O₃, va aumentando también la cantidad de DA oxidada, que a su vez, va acompañando por un incremento en la muerte de neuronas dopaminérgicas.

Aunque la causa de la pérdida selectiva de las neuronas dopaminérgicas en la PD no ha

sido bien definida, el estrés oxidativo desempeña un papel importante en el desarrollo del proceso de neurodegeneración (Fahn y Cohen, 1992; Halliwell, 2006; Ikuko y Masato, 2008 y 2009; Shankar y Julie, 2008; Miller y cols., 2008 y 2009) ya que incrementa el metabolismo oxidativo de la dopamina y sus productos metabólicos. Sin embargo esta situación es una consecuencia de factores tanto intra como extracelulares cuya secuencia no queda clara todavía.

Se ha demostrado que existe una alteración en el equilibrio redox en pacientes con PD, así como en otras enfermedades neurodegenerativas (Olanow, 2004; Nicolas y cols., 2009; Britta y Lydia; 2009; Tracey y Wen, 2009; Palmer, 2010; William y Michelle, 2010; Tansey y Goldberg, 2010; Lochhead y cols., 2010; Tsuyoshi y cols., 2010). Hay reportes que muestran una alteración en los niveles de GSH y Ascorbato (Spencer y cols., 1998; Fahn y Cohen, 1992; Liovech y Fridovich 2005; Zhi y Tit, 2006; Gail y cols., 2008; Miller y cols., 2009; Sanchez y cols., 2010), un incremento importante en los niveles de lípidos peroxidados (Dexter y cols., 1990; Carsten y cols., 2004).

En la búsqueda de una mayor claridad sobre el impacto que el estrés oxidativo tiene sobre las vías metabólicas de la DA, sus metabolitos y la relación que tiene con la muerte neuronal, se ha planteado que los transportadores de DA (VMAT-2) están involucrados debido principalmente a que se altera su permeabilidad, favoreciendo la liberación de DA, antes de tiempo y sin que sea necesaria su liberación, ocasionando que la DA se libere sin control dentro del citoplasma (Caudle y cols., 2007; Vergo y cols., 2007), en esa búsqueda por aclarar vías de daño en el metabolismo de la DA, también se ha involucrado a los llamados bifenoles policlorados que tienen una participación discreta pero peligrosa, en el daño por estrés oxidativo (Caudle y cols 2006). Se ha relacionado

una falla mitocondrial con la PD (Schapira y cols., 1989; Lin y Beal, 2006; Van, 2009; Hansruedi, 2009). También se ha planteado que el daño se pueda deber al aumento de Hierro libre en el citoplasma de neuronas dopaminérgicas, debidas a una proteína mitocondrial con contenido de un grupo Fe-S, que puede estar actuando como un "sensor" del estado del hierro mitocondrial (Rouault y Tong, 2005) y que estas proteínas son extraordinariamente sensibles a los ataques de superóxido (Gardner y Fridovich, 1991) generando disfunción del complejo I, en el modelo de rotenona (Panov y cols., 2005) y probablemente en PD.

En ese sentido se han hecho estudios para ubicar alteraciones en el genoma mitocondrial (7 de las 13 subunidades del complejo I son mitocondriales) y se ha sugerido la presencia de alteraciones en el ADN mitocondrial en al menos Parkinson idiopático (Parker Jr y Parks, 2005; Van, 2009), así como alteraciones relacionadas al envejecimiento (Lestienne y cols., 1991; Shankar, 2010).

Así mismo hallazgos recientes han mostrado que la mitocondria neuronal genera más especies $O^{\cdot-}$ que otras células, debidas principalmente a su alta tasa metabólica (el cerebro concentra 30% del total del oxígeno corporal), (Kudin y cols; 2005; Van, 2009), adicional a ello deficiencias en la actividad de la NADH hidrogenasa (complejo I), se ha reportado en SN de pacientes con PD (Schapira y cols., 1989; Mann y cols., 1994).

Por otra parte estudios *posmortem* han reportado exacerbada desaminación de la DA en el citoplasma a causa de MAO en las neuronas sobrevivientes, lo cual llevan a una mayor producción de H_2O_2 (Cohen, 1989; Gal y cols; 2005; Heinz y Wolfgang, 2008; Shankar y Julie, 2008; Ikuko y Masato, 2008), acumulación selectiva de Hierro y disminución de

los niveles de ferritina en sustancia nigra (Sofic y cols., 1991; Burdo y Connor 2003; Zecca y cols., 2004 y 2008), estos cambios se han relacionado con la degradación de la neuromelanina en la sustancia nigra (Youdin, y cols., 1991; Zecca y cols., 1996, 2006 y 2008), esta degradación produce sobreproducción de H_2O_2 y radicales $\cdot OH$ y $O_2\cdot^-$, vía reacciones de Fenton y Haber-Weiss, capaces de producir oxidación tanto de lípidos como de proteínas, ocasionando eventualmente la muerte neuronal (Adams y Odunze, 1991; Smith 2005; Liochev y Fridovich, 2005).

Incluso se ha reportado que sistemas antioxidantes como la glutatión, dejan de funcionar en presencia de Fe libre, por lo tanto el GSH no resulta efectivo contra la oxidación de DA en presencia de Fe^{2+} (Zhou y cols., 2010).

También se ha reportado la falla en el sistema proteasoma ubiquitina (Stefanis y Keller, 2006; Zhi y cols., 2009). En la apoptosis inducida por EO un número de señales celulares induce alteraciones en la mitocondria, lo cual produce liberación de factores de inducción de apoptosis (AIF) y citocromo c (Cyt-c) del espacio intermembranal hacia el citoplasma (Susin y cols., 1999; Lin y Beal, 2006; Amany y Hala, 2008) a continuación el Cyt-c interactúa con Apaf-1, dATP/ATP y procaspasa-9, para formar el complejo conocido como “apoptosoma” (Li y cols., 1997), este complejo lleva a la activación de caspasa 3 y 7 (Srinivasula y cols., 1998; Li y cols., 1997). Así mismo, pero en relación al complejo mitocondrial I, también ha sido documentado una relación con la enfermedad de Parkinson (Greenamyre y cols., 2001; Dawson y Dawson, 2003; Tretter y cols., 2004; Rashmi y Gavin, 2008).

Un modelo de daño debido a especies oxidadas y sus metabolitos, es el MPTP, este compuesto que es transformado en la glía por acción de la monoaminoxidasa B (MAO B) en ion MPDP⁺, formando un compuesto inestable que se transforma rápidamente en el ion 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP⁺), metabolito responsable de la acción citotóxica del modelo de Parkinson por MPTP. El MPP⁺ es captado por las neuronas por el mismo sistema de recaptación de la DA (DAT, D₂) (Jiménez-Jiménez, y Quesada 1990; Engel y Wang, 2005), (aunque estudios posteriores han sugerido que se requiere de transportadores más específicos como los OCT3 (SLC22A3) y PMAT (SLC29A4) para inhibir el complejo I mitocondrial (NADH-CoQ₁ reductasa), (Vyas y cols., 1985, Mizuno y cols. 1987; Haichuan y Joanne, 2010) y el complejo α -cetoglutaratodeshidrogenasa del ciclo de Krebs (Mc Naught y cols., 1995), como consecuencia se produce una marcada disminución de la síntesis de ATP y de glutatión (GSH). Produciendo un déficit energético y disminución de atrapadores de especies reactivas tóxicas que conducen a la muerte neuronal (Carine y cols., 2008).

Además, se han reportado otros compuestos con actividad citotóxica que aportan nuevas evidencias de daño neuronal, involucradas también en la etiología del PD. Las tetrahydroisoquinolinas (TIQ), son análogas de MPP⁺, endógenas y son también derivados metabólicos de la DA, estos compuestos reproducen acciones inhibitorias sobre los complejos enzimáticos mitocondriales, semejantes a los producidos por modelos de PD, como la (1(R), 2(N)-Dimetil-6,7-dihidroxi-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolina, N-metil(R) salsolinol), (Naoi y cols., 1998; Hatasu Kobayashi, y cols., 2009) o el 1,2-dimetil-6,7-dihidroxiquinolina (DMDHIQ⁺) formado a partir del R-salsolinol (Doster y cols., 1990; Hatasu y cols., 2009), compuesto que ha demostrado

que induce necrosis como una consecuencia de una disminución de ATP, causado también por la inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial (Naoi y cols 1996).

En la figura 21 se observa un voltamperograma de una curva estándar de DA (clorhidrato de DA, disuelto en un plasma de rata control) esto es, la DA en su estado completamente reducido y en una muestra plasmática de ratas control. Al compararla con la muestra plasmática de un animal expuesto a 15 días de ozono, se aprecia un ligero pero sensible pico de corriente catódica, (I_c , cuya señal es posible ampliar con la 1ª derivada de la señal original) sugiriendo primero, que ha empezado a oxidarse DA endógena de la rata, y segundo, en el mismo voltamperograma pero en la zona opuesta (de ahí el nombre de voltamperometría cíclica), que esa DA oxidada proviene de la misma DA pero reducida (pico I_a) (Figura 23).

A ese respecto consideramos algunos puntos de interés:

En la literatura todavía no hay reportes semejantes al nuestro, a pesar de que existen algunos esfuerzos en otros grupos de investigación pero en cultivo celular (Staag - Sulzer 2007).

Segundo, 80% de la DA es sintetizada en tejido nervioso y de ella, el 80% se origina en las vías nigroestriatales (Feldman y cols., 1997; Versteeg y cols 1976). El resto es sintetizada en la medula adrenal, sin embargo la DA sintetizada en tejido periférico (médula adrenal) es un precursor que termodinámicamente dura muy poco tiempo, gracias a que la DA- β -Hidroxilasa la convierte casi inmediatamente en noradrenalina, para posteriormente formar adrenalina (Feldman y cols., 1997), de tal manera que podemos asegurar en un buen grado que la DA registrada es neuronal. En ese mismo

sentido, se sabe que en condiciones de homeostasis, la DA no cruza la barrera hematoencefálica (BHE) (Hardebo y Owman, 1979), sin embargo en un estado de estrés oxidativo se ha demostrado que la permeabilidad de la BHE se altera, debido principalmente a la formación de especies reactivas, radicales libres y al proceso inflamatorio que le acompaña (Carvey y cols., 2005; Hawkins y Davis, 2005; Zlokovic, 2005; Abbott y cols., 2006; Miller, y cols., 2008; Ikuko y Masato, 2008, 2009; Masato y cols., 2004, 2008; Yang y Garry 2010) y tal como hemos demostrado en este trabajo, debido a las quinonas de DA (DAQ's) que se forman. De manera que una vez alterada la permeabilidad de la BHE, la dopamina oxidada (como quinona o como aminocromo, cys-dopa, leco o cualquier otro metabolito cíclico de la DA) puede salir, al torrente sanguíneo y de esa manera es posible registrarla en el plasma ya sea de la rata o de los pacientes de Parkinson. Aunque existe la posibilidad de que parte de esas DAQ's, puedan a volver a protonarse en el tejido periférico, debidas al cambio de pH (pasan del pH ácido en que se encuentran dentro de sus vesciculas al pH casi neutro del plasma) y probablemente también debido a los sistemas antioxidantes plasmáticos. Finalmente analizamos la relación que guardan los niveles de DAQ's y los lípidos peroxidados, ambos determinados en plasma, (Figura 35). Y corroboramos que existe una fuerte correlación entre la formación de DAQ's y la formación de LPO's.

Por lo tanto los metabolitos oxidados de DA, están estrechamente relacionados con el daño neuronal progresivo en sustancia nigra y probablemente en el caso del PD, ese daño se perpetua y se amplifica debido, primero al estado de estrés oxidativo y segundo a la formación de quinonas de DA. Parte importante de las alteraciones que están presentes en la patología del PD, se encuentran dentro de la propia vía metabólica

oxidativa de DA, desempeñando un papel crucial en este padecimiento, al grado que como ya se empieza a sugerir (Ikuko y Masato, 2008) y de acuerdo a la hipótesis que planteamos desde el principio del presente trabajo, tanto el estrés oxidativo como las quinonas de DA originadas de ello, participan de forma significativa en la destrucción neuronal dopaminérgica.

X. CONCLUSIONES

La exposición crónica a bajas dosis de O_3 , produce un estado de estrés oxidativo en animales expuestos a este gas. Este estrés, induce un proceso de neurodegeneración progresiva en sustancia nigra de las ratas expuestas a O_3 .

Durante el proceso de neurodegeneración progresiva la auto oxidación de la dopamina puede estar desempeñando un papel crítico en la inducción de la muerte neuronal dopaminérgica y por lo tanto ser directa e indirectamente co-responsables del la muerte de neuronas dopaminérgicas.

El aumento de especies oxidadas de dopamina esta en relación directa con el grado de estrés oxidativo presente y este se relaciona con el tiempo transcurrido de exposición a O_3 .

Es posible sugerir que las DAQ's alteran la permeabilidad de la BHE y con ello, amplificar el daño en tejido nervioso.

Existe una fuerte correlación fenomenológica y estadística entre la formación de DAQ's y el daño neuronal.

Es posible detectar en plasma las especies químicas oxidadas generadas como parte del metabolismo del tejido cerebral de animales expuestos a O_3 .

La cuantificación de DAQ's, se puede monitorear en el curso de la progresión del daño celular.

XI. PERSPECTIVAS

La alta correlación que encontramos entre la formación de LPO's y la formación de DAQ's –ambas en plasma- nos permite suponer que es posible determinar de forma análoga, en el plasma de pacientes de PD los mismos DAQ's previamente encontrados en el modelo animal. Fue así que determinamos DAQ's en pacientes con diferentes grados de avance de la enfermedad, correlacionándolos principalmente con los criterios clínicos (escala de progresión de daño Hoehn-Yahr), encontrando resultados similares a los obtenidos en el modelo animal (datos que no se muestran). Por lo tanto, la determinación de las DAQ's en plasma pueden ser una primera aproximación hacia la búsqueda de un diagnóstico temprano, que combinándolo con la experiencia clínica habitual, nos permita al menos hasta este punto suponer que técnicamente es posible diagnosticar esta enfermedad tempranamente.

Si las manifestaciones de PD, se presentan cuando ha muerto mas del 70% de las neuronas dopaminérgicas aproximadamente, es evidente que el diagnóstico temprano tanto de esta enfermedad, como de otras enfermedades neurodegenerativas que cursan con estrés oxidativo es uno de los aspectos fundamentales a considerar, en la búsqueda de un diagnóstico temprano de una enfermedad extensamente estudiada y poco entendida.

XII. REFERENCIAS

Abbott NJ., Adjanie A.K. Patabendige, Diana E.M. Dolman, Siti R. Yusof, David J. Begley (2010). Structure and function of the blood–brain barrier. *Neurobiol of Dis*, 37: 13–25.

Abbott NJ., (2002). Astrocyte–endothelial interactions and blood–brain barrier permeability. *J Anat*, 200: 629–638.

Abbott NJ., (2005). Dynamics of CNS barriers: evolution, differentiation, and modulation. *Cell Mol Neurobiol*, 25: 5–23.

Abbott NJ, Ronnback L and Hansson E., (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci*, 7: 41–53.

Adams RD; Victor M., Rooper AH., (1999). Principios de Neurología, 6a edición., *McGraw-Hill Interamericana*, pgs 60-61.

Adams JD Jr., Chang ML., Klaidman LK, (2001), Parkinson's disease-redox in mechanisms. *Curr Med Chem* (8) 809-814.

Adams JD Jr, Klaidman LK, Odunze IN, Shen HC, Miller CA. (1991) Alzheimer's and Parkinson's disease. Brain levels of glutathione, glutathione disulfide and vitamin E. *Mol Chem Neuropathol*. 14(3): 213-26.

Agid Y., (1991). Parkinson's disease. *Pathophysiology*; 337: 1321-1324.

Alan M. Palmer (2010) The role of the blood in the NCS-Barried in NCS disorders and their treatment. *Neurobiol of Dis* 37: 3-12.

Ali Sajadi, Matthias Bauer, Beat Thöny_ and Patrick Aebischer (2005). Long-term glial cell line-derived neurotrophic factor overexpression in the intact nigrostriatal system in rats leads to a decrease of dopamine and increase of tetrahydrobiopterin production *J of Neurochem*, 93: 1482–1486.

Alves da Costa Cristine, Checler Frédéric (2010), Apoptosis in Parkinson's disease: Is p53 the missing link between genetic andsporadic Parkinsonism? *Cell Signal* doi:10.1016/j.cellsig.2010.10.020).

Amany A. Abdin, and Hala E. Hamouda, (2008). Mechanism of the neuroprotective role of coenzyme Q10 with or without L-dopa in rotenone-induced parkinsonism. *Neuropharmacol*, 55: 1340–1346.

Andrew P. Harris, Roderick Robinson, Raymond C. Koehler, Richard J. Traystman and Christine A. Gleason. (2001). Blood-brain barrier permeability during dopamine-induced hypertension in fetal sheep. *J of Appl Physiol*, 91: 123-129.

Andreas Hald, Johan Van Beek and Julie Lotharius (2007). In Parkinson's disease *causative or epiphenomenal?*, r. e. Harris (ed.), chapter 12, *inflammation in the pathogenesis of chronic diseases*, 249–279.© springer.

Avila, C., M.R., Colín B., L., Fortoul, v, T., Rugeiro V., C., Machado S., J.P., Espinosa V., J., and Rivas, A.S., (1999). Memory deterioration in an oxidative stress model and its correlation with cytological changes in rat hippocampus CA1. *Neurosc Lett*. 270: 107-109.

Bagh Maria B., K. Maiti Arpan, Jana Sirsendu, Banerjee Kalpita, Roy Arun, and Chakrabarti Sasanka., (2008). Quinone and oxyradical scavenging properties of N-acetylcysteine prevent dopamine mediated inhibition of Na-K-ATPase and mitochondrial electron transport chain activity in rat brain: Implications in the neuroprotective therapy of Parkinson's disease. *Free Radical Res*, 42(6): 574-581.

Bailey TL, Rivara CB, Rocher AB, and Hof PR. (2004). The nature and effects of cortical microvascular pathology in aging and Alzheimer's disease. *Neurol Res*, (26: 573–578.

Barja, C. y Herrero, A., (2000). Oxidative damage to mitochondrial DNA is inversely related to maximum life span in the heart and brain of mammals. *FASEB* 14: 312-318.

Bear Mark F., 2002, Neuroscience, exploring the Brain, pg 481, 2^a Ed, 2002).

Beckman, K.B. y Ames, B.N., (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev*; 78, 547-551.

Beckman, J.S., Koppenol, W.H., (1996). Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: the good, the bad and ugly. *Am J Physiol*; 271: C1424-C1437.

Ben-Menachem E, Johansson BB, Svensson TH. (1982). Increased vulnerability of the blood–brain barrier to acute hypertension following depletion of brain noradrenaline. *J Neural Transm*, 53:159–167.

Bernheimer, H., Birkmayer, W., Hornykiewicz, O., Jellinger, K., Seitelberger, F. (1973). Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations *J Neurol Sci*; 20: 415-55.

Ben-Shachar D, Zuk R. and Glinka Y. (1995). Dopamine neurotoxicity: inhibition of mitochondrial respiration. *J Neurochem*, 64: 718–723.

Bisaglia M, Mammi S, Bubacco L., (2007). Kinetic and Structural Analysis of the Early Oxidation Products of Dopamine: Analysis of the interactions with {alpha}-synuclein. *J Biol Chem* ; 282(21): 15597-605.

Bobby Thomas and M. Flint Beal. **(2007)** Human Molecular Genetics *Parkinson's disease* Vol. 16, Review Issue 2.

Braak H, Del Tredici K, Rüb U, de Vos RAI, Jansen Steur ENH, Braak E. **(2003)** Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*; 24: 197-211.

Bradbury, M. W. **(1979)**. The concept of a blood– brain barrier. Chichester: John Wiley & Son.

Britta Engelhardt & Lydia Sorokin. **(2009)** The blood–brain and the blood–cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction. *Semin Immunopathol* 31:497–511.

Burke, S.P., Tylor C.P. **(1992)**. Glutamate, aspartate and GABA release from hippocampal CA1 slices during in vitro ischemia is calcium-independent. In: Dietrich WD, Globus MYT, editors, The role of neurotransmitters in brain injury. *New York, Plenum*; 45-52.

Burdo JR. and Connor JR., **(2003)**. Brain iron uptake and homeostatic mechanism: an overview. *Biometals* 16: 63-75.

Campbell DG, Hardie DG, Vulliet PR. **(1986)** Identification of four phosphorylation sites in the N-terminal region of tyrosine hydroxylase. *J Biol Chem* 261: 10489–92.

Carine Cleren, Lichuan Yang, Beverly Lorenzo, Noel Y. Calingasan, Andrew Schomer, Anthony Sireci, Elizabeth J. Wille and M. Flint Beal. **(2008)** Therapeutic effects of coenzyme Q10 (CoQ10) and reduced CoQ10 in the MPTP model of Parkinsonism. *J. Neurochem.* 104: 1613–1621.

Carney, J.M., Smith C.D., Carney A.M., Butterfield D.A., **(1995)**. Aging and oxygen-induced modifications in brain biochemistry and behavior. In: Chiueh C., Gilbert D. , Colton C. editors . The neurobiology of N=O and OH. *Ann NY Acad Sci.*, 783: 44-53.

Carvey PM, Zhao C, Hendey HB, Lum H, Trachtenberg J, Desai BS, Snyder J, Zhu YG and Ling ZD. **(2005)**. 6-Hydroxydopamine-induced alterations in blood–brain barrier permeability. *E J of Neurosc*, 22: 1158-1168.

Carstam, R., Brinck, C., Hindemith-Augustsson, A. **(1991)**. The neuromelanin of the human substantia nigra. *Biochim Biophys Acta*; 1097: 152-160.

Carsten Buhmann, Sönke Arlt, Anatol Kontush, Tobias Möller-Bertram, Sinje Sperber, Matthias Oechsner, Hans-Joerg Stuerenburg and Ulrike Beisiegel **(2004)** Plasma and CSF markers of oxidative stress are increased in Parkinson's disease and influenced by antiparkinsonian medication *Neurobiol of Dis* 15: 160– 170.

Caudle WM, Richardson JR, Delea KC, Guillot TS, Wang M, Pennell KD, Miller GW.(**2006**) Polychlorinated biphenyl-induced reduction of dopamine transporter expression as a precursor to Parkinson's disease-associated dopamine Toxicity *Toxicol Sci.* 92(2):490-9.

Caudle W. M., Richardson J. R., Wang M. Z., Taylor T. N., Guillot T. S., McCormack A. L., Colebrooke R. E., Di Monte D. A., Emson P. C. and Miller G. W. (**2007**) Reduced vesicular storage of dopamine causes progressive nigrostriatal neurodegeneration. *J Neurosci.* 27: 8138–8148.

Cohen, G., (**1987**). Monoamine oxidase, hydrogen peroxide, and Parkinson's disease. *Adv Neurol*; 45, 119-125.

Cohen RM, Andreason PJ, Doudet DJ, Carson RE, Sunderland T. (**1997**). A Opiate receptor avidity and cerebral blood flow in Alzheimer's disease. *J Neurol Sci*, 148: 171–180.

Cohen Z, Molinatti G, Hamel E. A., (**1997**)b. Astroglial and vascular interactions of noradrenaline terminals in the rat cerebral cortex. *J Cereb Blood Flow Metab*, 17: 894–904.

Colín B., L., Avila C., M.R., Fortoul V., Rugeiro V., C., Machado S., J.P., Espinosa V., J., and Rivas, A.S., (**1999**). Morphologic alteration of the olfactory bulb after acute ozone exposure in rats. *Neurosc Lett*; 274: 1-4.

Christenson, JG., Dairman, W., and Udenfriend, S., (**1970**). Preparation and properties of a homogeneous aromatic L-amino acid decarboxylase from hog kidney *Arch Biochem Biophys*; 141: 356-367.

David Vauzour , Giulia Ravaioli , Katerina Vafeiadou , Ana Rodriguez-Mateos , Cristina Angeloni , Jeremy P.E. Spencer., (**2008**). Peroxynitrite induced formation of the neurotoxins 5-S-cysteinyl-dopamine and DHBT-1: Implications for Parkinson's disease and protection by polyphenols. *Arch of Biochem and Biophys* 476: 145–151.

Dawson T.M., Dawson V.L., (**2003**). Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease, *Science*, 302: 819–822.

Delle Donne A, Klos KJ, Fujishiro H, Ahmed Z, Parisi JE, Josephs KA, Frigerio R, Burnett M, Wszolek ZK, Uiti RJ, Ahlskog JE, Dickson DW (**2008**) Incidental Lewy body disease and preclinical Parkinson disease. *Arch Neurol* 65: 1074–1080.

Dexter DT, Carayon A, Vidailhet M, Ruberg M, Agid F, Agid Y, Lees AJ, Wells FR, Jenner P, Marsden CD. Decreased (**1990**) ferritin levels in brain in Parkinson's disease. *J Neurochem*; 55(1): 16-20.

del Zoppo GJ, Hallenbeck JM. (**2000**). Advances in the vascular pathophysiology of ischemic stroke. *Thromb Res*, 98: 73–81.

Doolittle ND, Abrey LE, Bleyer WA, Brem S, Davis TP, Dore-Duffy P, Drewes LR, Hall WA, Hoffman JM, Korfel A, Martuza R, Muldoon LL, Peereboom D, Peterson DR, Rabkin SD, Smith Q, Stevens GH, Neuwelt EA. (2005). New frontiers in translational research in neuro-oncology and the blood–brain barrier: report of the tenth annual Blood–Brain Barrier Disruption Consortium Meeting. *Clin Cancer Res*, 11: 421–428.

Dorado M., Paredes C., Mascher, D., Borgonio P.G., Rivas, A.S. (2001). Effects of different ozone doses on memory, motor activity and lipid peroxidation levels in rats. *Int J Neurosci*. 108, 149-162.

Dore-Duffy P, Owen C, Balabanov R, Murphy S, Beaumont T, Rafols JA. (2000). Pericyte migration from the vascular wall in response to traumatic brain injury. *Microvasc Res*, 60: 55–69.

Doster, P., Strolin Benedetti, V., Allievi, C., and Dordain, G., (1990). *J Neural Transm*; 81:215-220.

Eaton, MJ., Gudehitlu, KP., Quach, T., Silvia, CP., Hadjiconstantinou, M and Neft, NH., (1993). Distribution of aromatic L-amino acid decarboxylase mRNA in mouse brain by in situ hybridization histology. *J Comp Neurol* 337: 640-654.

Egleton RD, Davis TP. (1997). Bioavailability and transport of peptides and peptide drugs into the brain. *Peptides*, 18: 1431–1439.

Elías Nordberg, Arnér S.J.. (2001), Free Rad Biol & Med, (31) 11:1299-1302.

Engel K and Wang J (2005) Interaction of organic cations with a newly identified plasma membrane monoamine transporter. *Mol Pharmacol* 68:1397-1407.

Enochs WS, Sarna T, Zecca L, Riley PA, Swartz HM (1994). The roles of neuromelanin, binding of metal ions, and oxidative cytotoxicity in the pathogenesis of Parkinson's disease: a hypothesis. *J Neural Transm Park Dis Dement*; 7(2): 83-100.

Ernster L, Dallner G. Biochemical (1995)._Physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochim Biophys Acta*. May 24; 1271(1):195-204.

Fahn S, and Cohen G. (1992). The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it. *Ann Neurol*. 32(6):804-812.

Fahn, S (1989). The history of parkinsonism. *Mov Disord*; 4, S 1: 2-10.

Feldman S Robert, Meyer S Jerrold, Quenzer F Linda, (1997) Principles of Neuropsychopharmacology. *Sinarr Associates Inc, Publisher*, Cap 8 “Catecholamines”.

Furkawa, N.K., timblin, C.R., Buder- Hoffman, S., Mossman, B.T., (2000). Strategies for evaluation of signaling pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and management of Parkinson´s disease. *Can Med Assoc J*; 168(3): 293-301.

Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S. (1993). Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol*, 123: 1777–1788.

Gail D. Zeevalk, Roozbeh Razmpour and Laura P. Bernard., (2008). Glutathione and Parkinson's disease: Is this the elephant in the room? *Dossier: Neurological disorders : Clinical challenges and controversies*. doi:10.1016/j.biopha.2008.01.017; Copyright © 2008 Published by Elsevier Masson SAS.

Gal S., Zheng H., Fridkin M., Youdin (2005). Novel multifunctional neuroprotective iron chelator-monoamine oxidase inhibitor drugs for neurodegenerative diseases. In vivo selective brain monoamine oxidase inhibition and prevention of MPTP-induced striatal dopamine depletion. *J Neurochem*; 95: 78-88.

Gerlach, M., Gsell, W., Kornhuber, J., Jellinger, K., Krieger, V., Pantucek, F., Vock, R., and Rieder, P. (1996). *Brain Res*; 741, 142.

Giba, WR, (1992). Neuropathology of Parkinson's disease and related syndromes, *Neurol Clin*, 10: 361-376.

Gerlach, M and Riederer , P (1996). Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. *J Neural Transm*; 103: 987-1041.

Gerlach, M., Trautwein, A.X., Zecca, L., (1995). Mössbauer spectroscopic studies of purified human neuromelanin isolated from the substantia nigra. *J Neurochem*; 65: 923-926.

Gerlach, M., Riederer, P., Youdim, M.B. (1994). Brain iron and other trace metals in neurodegenerative diseases. *J Neurochem*; 63: 793-807.

Goldstein, M., Lieberman, A., (1992) The role of the regulatory enzymes of catecholamine synthesis in Parkinson's disease. *Neurology* 42 (4) :8-10.

Gonul E, Duz B, Kahraman S, Kayali H, Kubar A, Timurkaynak E. (2002). Early pericyte response to brain hypoxia in cats: an ultrastructural study *Microvasc Res*, 64: 116–119.

Good, P., Olanow, C., Perl, D., (1992). Neuromelanin-containing neurons of the substantia nigra accumulate iron and aluminum in Parkinson's disease: A LAMMA study. *Brain Res* 593: 343-346.

Graham, D.G. (1978). Oxydative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones. *Mol. Pharmacol*; 14: 133-643.

Graham DG, Sylvia M. Tiffany, William R. Bell, Jr., and William F. Gutknecht (1978). **Autoxidation versus Covalent Binding of Quinones as the Mechanism of**

Toxicity of Dopamine, 6-Hydroxydopamine, and Related Compounds toward. Neuroblast Cells in Vitro; 14: 644-653.

Graham, DG. (1999). Neurotoxicants and the cytoskeleton. *Curr Opin Neurol* 12(6):733-737.

Greenamyre J.T., Sherer T.B., Betarbet R., Panov A.V., (2001). Complex I and Parkinson's disease, *IUBMB Life*. 52: 135–141.

Grima, B., Lamouroux, A., Boni, C., Julien, J-F., Javoy-Agid, F., & Mallet, J., (1987) A single human gene encoding multiple tyrosine hydroxylases with different predicted functional characteristics, *Nature* 326: 707-711.

Guillot TS, Asress SA, Richardson JR, Glass JD, Miller GW. (2008). Treadmill gait analysis does not detect motor deficits in animal models of Parkinson's disease or amyotrophic lateral sclerosis. *J Mot Behav*. 40(6):568-77.

Haichuan Duan and Joanne Wang (2010) Selective Transport of Monoamine Neurotransmitters by Human Plasma Membrane Monoamine Transporter and Organic Cation Transporter 3 *J Pharmacol Exp Therap*. Published on September 21, as DOI:10.1124/jpet.110.170142

Halliwel B., Gutteridge JM., (1992). Biologically relevant metal ion dependent hydroxyl radical generation. An update. *FEBS Lett*. 307: 108-112.

Halliwel Barry (2006). Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?. *J of Neurochem*. 97: 1634-1658.

Hamilton B.F. y Gould D.H. (1987). Nature and distribution of brain lesions in rats intoxicated with 3-nitropropionic acid: A type of hypoxic (energy deficient) brain damage. *Act Neuropathol*, 72: 286-297.

Hardebo JE, Owman C. (1979). Barrier mechanisms for neuro-transmitter monoamines and their precursors at the blood–brain barrier. *Am Neurol*, 8: 1–31.

Hart. PE., Lodi R., Rajagopalan B., (2005) Antioxidants treatment of patients with Friedreich ataxia: four-year follow-up *Arch Neur*, 62: 621-626.

Hansruedi Büeler (2009) Impaired mitochondrial dynamics and function in the pathogenesis of Parkinson's disease *Exper Neurol* 218: 235–246.

Hastrup H, Karlin A, Javitch JA. (2001) Symmetrical dimer of the human dopamine transporter revealed by cross-linking Cys-306 at the extracellular end of the sixth transmembrane segment. *PNAS, U S A*; 98(18):10055-10060.

Hatasu Kobayashi., Kiyoshi Fukuhara., Saeko TadaOikawa., Yuki Yada., Yusuke Hiraku., Mariko Murata., and Shinji Oikawa., (2009). The mechanisms of oxidative of oxidative DNA damage an apoptosis induced by norsalsolinol, an endogenous tetrahydroisoquinoline derivated associated with Parkinson's disease. *J. Neurochem*, 108: 397–407.

Hawkins BT, Davis TP. (2005). The blood–brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev*, 57: 173–185.

Haycock, JW., and Haycock, DA., (1991). Tyrosine hydroxylase in rat brain dopaminergic nerve terminals. Multiple-site phosphorylation in vivo and in synaptosomes *J Biol Chem*; 266: 5650-5657.

Haycock JW. (1990) Phosphorylation of tyrosine hydroxylase in situ at serine 8, 19, 31, and 40. *J Biol Chem* 265: 11682–91.

Heinz Reichmann Wolfgang Jost. (2008). Parkinson's disease – Many diseases with many faces. *J Neurol*, 255 [Suppl 5]:1.

Heyes MP, Morrison PF. (1997). Quantification of local de novo synthesis versus blood contributions to quinolinic acid concentrations in brain and systemic tissues. *J. Neurochem*, 68: 280 –288.

Hirase T, Kawashima S, Wong E, Uemada T, Rikitake Y, Tsukita S, Yokoyama M, Staddon J. (2001). Regulation of tight junction permeability and occludin phosphorylation by RhoA-p160ROCK-dependent and independent mechanism. *J Biol Chem*, 276: 10423–10431.

Hornykiewicz, (1973). Dopamine in the basal ganglia. Its role and therapeutic implications (including the clinical use of L-DOPA). *Br Med Bull*; 29(2):172-178.

Ikuko Miyazaki and Masato Asanuma (2008). Dopaminergic neuron-specific oxidative stress caused by dopamine itself. *Acta Medica Okayama* 62, (3): 141-150.

Ikuko Miyazaki and Masato Asanuma (2009). Approaches to Prevent Dopamine Quinone-Induced Neurotoxicity *Neurochem Res* 34: 698–706

Irmgard Paris, Sergio Cardenas, Jorge Lozano, Carolina Perez-Pastene, Rebecca Graumann, Alejandra Riveros, Pablo Caviedes and Juan Segura-Aguilar. (2007). Aminochrome as a Preclinical Experimental Model to Study Degeneration of Dopaminergic Neurons in Parkinson's Disease. *Neurotox Res*, 12 (2): 125-134.

Ischiropoulos, H., Beckman, J., (2003). Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: Cause , effect or association?. *J Clin Invest*; 111(2): 163-169.

Isidre Ferrer, Anna Martinez , Rosa Blanco, Ester Dalfo, Margarita Carmona **(2010)** Neuropathology of sporadic Parkinson disease before the appearance of parkinsonism: preclinical Parkinson disease. *J Neural Transm. On line* 23 Sep.

Jana S, Maiti AK, Bagh MB, Banerjee K, Das A, Roy A, Chakrabarti S., **(2007)**. Dopamine but not 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) inhibits brain respiratory chain activity by autoxidation and mitochondria catalyzed oxidation to quinone products: implications in Parkinson's disease. *Brain Res*, 1139:195-200.

Jason D. Huber, Richard D. Egleton and Thomas P. Davis. **(2001)** Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier. *TRENDS in Neurosciences* Vol.24 No.12 December.

Javoy, F., Agid, Y., Bouvet, D., and Glowinski, J., **(1972)**. Feedback control of dopamine synthesis in dopaminergic terminals of the rat striatum. *J Pharm Exp Ther* 82: 454-463.

Jellinger, K., Kienzl, E., Rumpelmair, G., **(1992)**. Iron-melanin complex in substantia nigra of Parkinsonian brains: An X-ray microanalysis. *J Neurochem* 59: 1168-1171.

Jenner, Peter., **(2003)**. Oxidative Stress in Parkinson's Disease *Ann Neurol*;53 (suppl 3):S26-S38.

Jenner, P. y Olanow, C.W., **(1998)**. Understanding cell death in Parkinson's disease. *Annals of Neurology*. 44 (3 Supl 1), S72-84.

Jenner, P. **(1993)**. Altered mitochondrial function, iron metabolism and glutathione levels in Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand Suppl*; 146: 6-13.

Jenner P. **(1991)**. Oxidative stress as a cause of Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand Suppl*; 136: 6-15.

Jezová D, Johansson BB, Olsson Y, Opršalová Z, Kiss A, Jurčovicová J, Graßler J, Westergren I, Vigaš M. Can catecholamines and other neurotransmitters cross the blood-brain barrier and modify neuroendocrine function during stress? In: Van Loon GR, Kvetnansky R, McCarty R, Axelrod J. **(1989)**. Stress: Neurochemical and humoral mechanisms, New York: *Gordon and Breach Science* 1: 325-337.

Jian Liu K, Rosenberg GA. **(2005)**. Matrix metalloproteinases and free radicals in cerebral ischemia. *Free Rad Biol & Med*, 39: 71-80.

Jiménez Jiménez FJ, Quesada Ladero JM. **(1990)**. An experimental model of Parkinson disease caused by a neurotoxin: implications in the clinical aspects and the etiology of Parkinson disease, *Med Clin (Barc)*. Apr 21;94(15):585-95.

Joan Abbot N., Adjanie A.K. Patabendige, Diana E.M. Dolman, Siti R Yusof, David J. Begley. **(2010)** Structure and Function of the blood brain barrier. *Neurobiol of Dis* 37: 13-25

KanKaapâ Aino, Esa Meririnne, Kari Ariniemi, Timo S pala (2001). Oxalic acid stabilizes dopamine, serotonin, and their metabolites in automated liquid chromatography with electrochemical detection *J Chromatography B* 53: 413-419.

Karin E. Sandoval, Ken A. Witt. (2008) Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke. *Neurobiol of Dis* 32: 200–219.

Kedar N. Prasad, William C. Cole, Bipin Kumar, (1999) Multiple Antioxidants in the Prevention and Treatment of Parkinson’s Disease. *J of the Am Coll of Nut*, 18 (5): 413–423.

Kudin A.P., Debska-Vielhaber G. and Kuntz W.S., (2005) Characterization of superoxide production sites in isolated rat brain and skeletal muscle mitochondria. *Biomed Pharmacother*; 59: 163-168.

Kurz CR, Kissner R, Nauser T, Perrin D, Koppenol WH. (2003) Rapid scavenging of peroxynitrous acid by monohydroascorbate. *Free Rad Biol & Med* 35 (12):1529-37.

Lai CH, Kuo KH. (2005). The critical component to establish in vitro BBB model: pericyte. *Brain Res Rev*, 50: 258–265.

Langston, J.W., Langston, E.B., Irwin, I. (1984). MPTP-induced cell death in cerebellar granule cells. *Neuropharmacol*; 32: 1259-1266.

LaVoie M.J., Hastings, T.G. (1999). Dopamine quinone formation and protein modification associated with the striatal neurotoxicity of methamphetamine: Evidence against a role for extracellular dopamine. *J Neurosc*; 19: 1484-1491.

Lee EJ, Hung YC, Lee MY. (1999) Early alterations in cerebral hemodynamics, brain metabolism, and blood–brain barrier permeability in experimental intracerebral hemorrhage. *J Neurosurg*, 91: 1013–1019.

Lestienne P, Nelson I, Riederer P, Reichmann H, Jellinger K. (1991). Mitochondrial DNA in postmortem brain from patients with Parkinson's disease. *J Neurochem*; 56 (5):1819.

Liochev SI., Fridovich I., (2005). Cross-compartment protection by SOD1. *Free Rad Biol & Med*, 38: 146-147.

Li, XM., Jourio, AV., Paterson, IA., Walz, W., Zhu, MY., and Boulton, AA., (1992). Gene expression of aromatic L-amino acid decarboxylase in cultured rat glial cells *J Neurochem*; 59: 1172-1175.

Lin M.T., Beal M.F., (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases, *Nature* 443, (7113): 787–795.

Lochhead JJ, McCaffrey G, Quigley CE, Finch J, Demarco KM, Nametz N, Davis TP. **(2010)** Oxidative stress increases blood-brain barrier permeability and induces alterations in occludin during hypoxia-reoxygenation. *J Cereb Blood Flow Metab.* 30: 1625-1636.

López Luis C., Quinzii Catarina M., Area Estela, Naini Ali, Rahman Shamima, Schuelke Markus, Salviati Leonardo, DiMauro Salvatore, Hirano Michio. **(2010)** Treatment of CoQ10 Deficient Fibroblasts with Ubiquinone, CoQ Analogs, and Vitamin C: Time- and Compound-Dependent Effects *PLoS ONE* 5(7): e11897. doi:10.1371/journal.pone.0011897.

Loscher W, Potschka H. **(2005)**. Role of drug efflux transporters in the brain for drug disposition and treatment of brain diseases. *Prog Neurobiol*, 76: 22–76.

Luo, I., Roth, G.S., **(2000)** The roles of dopamine oxidative stress and dopamine receptor signaling in aging and age-related neurodegeneration. *Antioxid Redox Signal*; 2: 449-460.

Mann, V.M., Cooper, J.M., Daniel, S.E., Srai, K., Jenner, P., Marsden, C.D., Schapira, A.H., **(1994)**. Complex I, iron, and ferritin in Parkinson's disease substantia nigra. *Ann Neurol* 36: 876–881.

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

Masato Asanuma, Ikuko Miyazaki , Francisco J. Diaz-Corrales, and Norio Ogawa, **(2004)**. Quinone formation as dopaminergic neuron-specific oxidative stress in the pathogenesis of sporadic Parkinson's disease and neurotoxin-induced Parkinsonism. *Acta Med Okayama* 58 (5): 221-230.

Masato Asanuma, Ikuko Miyazaki , Francisco J. Diaz-Corrales, Ko Miyoshi, Norio Ogawa, Miho Murata. **(2008)**. Preventing effects of a novel anti-parkinsonian agent zonisamide on dopamine quinone formation. *Neurosc Res* 60: 106–113.

McCarthy KM, Skare IB, Stankewich MC, Furuse M, Tsukita S, Rogers RA, Lynch RD, Schneeberger EE. **(1996)**. Occludin is a functional component of the tight junction. *J Cell Sci*, 109: 2287–2298.

McGeer, PL., McGeer, EG, Suzuki, JS **(1977)**. Aging and extrapyramidal function, *Arch Neurol*; 34: 33-35.

Miller Rebecca L., James-Kracke Marilyn, Y. Sun Grace and Y. Sun Albert . **(2009)**. Oxidative and Inflammatory Pathways in Parkinson's Disease, *Neurochem Res*, 34: 55–65.

Miller V.M., Lawrence D.A., Mondal T.K., Seegal R.F., (2009). Reduced glutathione is highly expressed in white matter and neurons in the unperturbed mouse brain – Implications for oxidative stress associated with neurodegeneration, *Brain Res*, 1276, (18) 22-30.

Mizuno Y, Saitoh T, Sone N. (1987) Inhibition of mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase activity by 1-methyl-4-phenylpyridinium ion. *Biochem Biophys Res Commun*. 27, 143 (1):294-299.

Nagatsu T. (1995) Tyrosine hydroxylase: human isoforms, structure and regulation in physiology and pathology. *Essays Biochem* 30: 15-35.

Naoui, M., Maruyama, W., Dostert, P., Khoda, K., and Kaiya, (1996). *Neurosci Lett* 212: 183-190.

Navas P., Fernández D.M., Ayala S.F., Martín G., López-Lluch, De Cabo R., Rodríguez J.C., Villalba J.M. (2002). Ceramide-dependent caspase 3 activation is prevented by Coenzyme Q from plasma membrana in serum-deprived cells. *Free Rad Res*. 36(4): 369-374.

Navarro Ana and Boveris Alberto (2010). Brain mitochondrial dysfunction in aging, neurodegeneration, and Parkinson's disease. *Front in Aging Neurosc* 2 (34): 1-11

Nakashima A., Hayashi N., Kaneko Y. S., Mori K., Sabban E. L., Nagatsu Toshiharu., Ota A., (2009) Role of N-terminus of tyrosine hydroxylase in the biosynthesis of catecholamines *J Neural Transm* 116:1355–1362.

Nicolas Weiss, Florence Miller, Sylvie Cazaubon, Pierre-Olivier Couraud. (2009) The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochim et Biophys Acta* (17) 88: 842–857.

Nishino H, Kumazaki M, Fukuda A, Fujimoto I, Shimano Y, Hida H, Sakurai T, Deshpande SB, Shimizu H, Morikawua S, Inobushi T. (1997). Acute 3-nitropropionic acid intoxications induced striatal astrocytic cell death and dysfunction of the blood brain barrier: involvement of dopamine toxicity. *Neurosci Res*, 27: 343-355.

Ogawa N., Asanama M., Kondo Y., (1994). Differential effects of chronic L-dopa treatment on lipid peroxidation in the mouse in the mouse brain with or without pretreatment with 6-hydroxidopamine. *Neurosci Lett*; 171: 55-58.

Olanow, CA., (1993). A radical hypothesis for neurodegeneration. *TINS*; 16:439-444.

Oldendorf WH, Cornford ME, Brown WJ. (1977). The large apparent work capability of the blood–brain barrier: a study of the mitochondrial content of capillary endothelial cells in brain and other tissues of the rat. *Ann Neurol*, 1: 409 – 417.

Öztaş B, Küçük M, Sandalci U. (1985). Effect of insulin-induced hypoglycemia on blood– brain barrier permeability. *Exp Neurol*, 87: 129 –136.

Panov A, Dikalov S, Shalbuyeva N, Taylor G, Sherer T, Greenamyre JT (2005). Rotenone model of Parkinson disease: multiple brain mitochondria dysfunctions after short term systemic rotenone intoxication. *J Biol Chem*, 23 ; 280(51):42026-35.

Parker Jr W.D., Parks J.K, (2005). Mitochondrial ND5 mutations in idiopathic Parkinson's disease, *Biochem Biophys Res Commun*, 326: 667–669.

Petty MA, Wettstein JG. (2001), Elements of cerebral microvascular ischaemia. *Brain Res Rev*, 36: 23–34.

Pardridge WM. (2007). Blood-brain barrier delivery. *Drug Discov Today*, 12: 54–61.

Parker Jr W.D., Parks J.K, (2005). Mitochondrial ND5 mutations in idiopathic Parkinson's disease, *Biochem Biophys Res Commun*, 326: 667–669.

Phil Jeffrey and Scott Summerfield,. (2010) Assessment of the blood–brain barrier in CNS drug discovery. *Neurobiology of Disease* 37: 33–37.

Pilas, B., Sarna, T., Kalyanaraman, B., (1988). The effect of melanin on iron associated decomposition of hydrogen peroxide. *Free Rad Biol & Med*; 4: 285-293.

Poewe W, Antonini A, Zijlmans JC, Burkhard PR, Vingerhoets F. (2010) Levodopa in the treatment of Parkinson's disease: an old drug still going strong. *Clin Interv Aging*. 7 (5): 229-38.

Pryor W.A., Church, D.F. (1991). Aldehydes hydrogen peroxide and organic radicals as mediators of oxygen toxicity. *Free Rad Biol & Med*; 11:41-46.

Qi Xu, Anumantha G. Kanthasamy, Manju B. Reddy., (2008). Neuroprotective effect of the natural iron chelator, phytic acid in a cell culture model of Parkinson's disease *Toxicology*, 245: 101–108.

Radi, R., Beckman, K.M., Bush, B.A. Freeman. (1991). Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide, *Arch Biochem Biophys*; 228: 481-487.

Ramsden DB, Parsons RB, Ho SL, Waring RH. (2001). The etiology of idiopathic Parkinson's disease. *Mol Pathol*. 54 (6): 369-80.

Rascher G, Fischmann A, Kroger S, Duffner F, Grote EH, Wolburg H. (2002) Extracellular matrix and the blood–brain barrier in glioblastoma multiforme: spatial segregation of tenascin and agrin. *Acta Neuropathol (Berl)*, 104: 85–91.

Rashmi U. Pathak, Gavin P. Davey. (2008). Complex I and energy thresholds in the brain. *Biochim et Biophys Acta*, 1777: 777–782.

Rivas, A.S., Dorado M., C., Borgonio P., G., Hiriart U., M., Verdugo D.L., Duran V., Colín B.L. y Avila C. M.R., (2000). Effects of taurine on ozone-induced memory deficits and lipid peroxidation levels in brains of young, mature and old rats, *Environm Res*; 82: 7-17.

Rivas, A.S., Dorado M., Colín B.L., Kendrick, K.M., De la Riva C., and Guevara, G.R., (2003). Effect of acute ozone exposure on locomotor behavior and striatal function. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 6840: 1-10.

Roland G.W. Staal and Patricia K. Sonsalla, (2000). **Inhibition of Brain Vesicular Monoamine Transporter (VMAT2) Enhances 1-Methyl-4-phenylpyridinium Neurotoxicity In Vivo in Rat Striatum.** *J Pharmacol Exp Ther*; 293: 336-342.

Rosengren, E., Linder-Eliasson, E., Carlsson, A., (1985). Detection of 5-S-cysteinyldopamine in human brain. *J Neural Transm*; 63: 247-253.

Sagi Y, Mandel S, Amit T, Youdim MB. (2006). Activation of tyrosine kinase receptor signaling pathway by rasagiline facilitates neurorescue and restoration of nigrostriatal dopamine neurons in post-MPTP-induced parkinsonism. *Eurobiol Dis.* Oct 19.

Sanchez-Cruz Pedro, Garcia Carmelo, E. Antonio. (2010) Alegria Role of quinones in the ascorbate reduction rates of S-nitrosoglutathione *Free Rad Biol & Med* 49: 1387–1394.

Santiago López D, y Rivas Arancibia S., (2008). Estrés oxidativo, metabolitos oxidados de dopamina y enfermedad de Parkinson, *Rev Fac Med UNAM*, 51, (3):104-107.

Sarna, T., Pilas, B., Land, E.J., (1986). Interaction of radicals from water radiolysis with melanin. *Biochim Biophys Acta*; 883: 162-167.

Savettieri G, Di Liegro I, Catania C, Licata L, Pitarresi GL, D'Agostino S, Schiera G, De Caro V, Giandalia G, Giannola LI, Cestelli A. (2000). Neurons and ECM regulate occludin localization in brain endothelial cells. *NeuroReport*, 11: 1081–1084.

Sawada, H., y Shimohama, S., (2000). Neuroprotective effects of estradiol in mesencephalic dopaminergic neurons. *Neuroscience and Biobehavioural Reviews*; 24, 143-147.

Schapira A.H., Cooper J.M., Dexter D., Jenner P., Clark J.B., Marsden C.D., (1989). Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease, *Lancet* 1: 1269-1273.

Sebastián Carballal, Madia Trujillo, Ernesto Cuevasanta, Silvina Bartesaghi, Matías N. Möller, Lisa K. Folkes, Miguel A. García-Bereguiaín, Carlos Gutiérrez-Merino, Peter Wardman, Ana Denicola, Rafael Radi, Beatriz Alvarez (2011) Reactivity of hydrogen

sulfide with peroxyxynitrite and other oxidants of biological interest *Free Rad Biol & Med*: doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.10.705.

Shankar SK. (2010) Biology of aging brain. *Indian J Pathol Microbiol*; 53: 595-604.

Shankar J. Chinta, Julie K. Andersen., (2008). Redox imbalance in Parkinson's disease *Biochim et Biophys Acta* 1780: 1362–1367.

Sharma HS, Nyberg F, Cervos–Navarro J, Dey PK. (1992). Histamine modulates heat stress-induced changes in blood–brain barrier permeability, cerebral blood flow, brain edema and serotonin levels: An experimental study in conscious young rats. *Neurosci*, 50: 445–454.

Shults, C.W., Hass, R.H. and Beal M.F. (1999). A possible role of Coenzyme Q₁₀ –in the etiology and treatment of Parkinson's disease. *Biofactors* 9: 267-272.

Shima, T., Sarna, T., Swartz, H.M., (1997). Binding of iron to neuromelanin of human substantia nigra and synthetic melanin: An electron paramagnetic resonance spectroscopy study. *Free Rad Biol & Med*; 23: 110-119.

Sies, H., (1991). Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med*; 91, 31s-8s.

Sies H. (2007) Memories of a Senior Scientist Biological Redox Systems and Oxidative Stress *Cell Mol Life Sci* 64: 2181 – 2188.

Simonian N. A., Coyle, J.T (1993). Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annu Rev Pharmacol*; 36: 83-106.

Smith W.L., (2005). Cyclooxygenases, peroxide tone and the allure of fish oil. *Curr Opin Cell Biol* 17: 174-78.

Smith, M.A., Nunomura, A., Zhu, X., Takeda, A., Perry, G., (2000). Metabolic, metallic and mitotic sources of oxidative stress in Alzheimer disease. *Antioxid Redox Signal*, 2, 413-420.

Smythies, J. (1996). On the function of neuromelanin. *Proc R Soc Lond B*; 263: 487-489.

Spencer JP., Jenner P., Daniel SE., Lees A.J. and Halliwell B., (1998). Conjugates of catecholamines with cysteine and GSH and Parkinson's possible mechanisms of formation involving reactive oxygen species. *J Neurochem*. 71: 2112-2122.

Staal RGW, Rayport S, Sulzer D. (2007) Amperometric Detection of Dopamine Exocytosis from Synaptic Terminals. In: Michael AC, Borland LM, editors. *Electrochemical Methods for Neuroscience*. Boca Raton (FL): CRC Press; 2007. Chapter 16.

Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*. 4;397 (6718):441-446.

Soto-Otero, R., Riguera-Vega, R., Méndez-Álvarez, E., Sánchez-Sellero, I., and López-Rivadulla, Lamas, M. (1996). *Biochem Biophys Res Commun*; 222: 607-611.

Sofic, E., Paulus, W., Jellinger, K., Riederer P. and Youdin MBH (1991). *J Neurochem*. 56: 978-984.

Strickland, D., y Bertoni JM., (2004), Parkinson's prevalence stimated by a state registry. *Movement Disorders* 19: 318-323.

Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES., (1998). Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization *Mol Cell*; 1(7):949-57.

Stefanis L., Keller J.N. (2006). The proteasome in neurodegeneration. *Springler NY*.

Syed Z., I., John P.C., Glenn, D.N., Fakhrul I., William, S.Jr., Syed F.A.,(1999). Methamphetamine generates peroxynitrite and produces dopaminergic neurotoxicity in mice: protective effects of peroxynitrite decomposition catalyst. *Brain research*; 837: 15-21.

Tamai I, Tsuji A. (2000). Transporter-mediated permeation of drugs across blood-brain barrier. *J Pharm Sci*, 89: 1371-1388.

Tanner CM, Goldman SM. (1996). Epidemiology of Parkinson's disease. *Neurol Clin*; 14: 317-321.

Tansey G Malú and Goldberg S Matthew. (2010) Neuroinflammation in Parkinson's disease: Its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention *Neurobiol of Dis* 37: 510-518.

Tao-Cheng JH, Brightman MW. (1988). Development of membrane interactions between brain endothelial cells and astrocytes in vitro. *Int J Dev Neurosci*, 6: 25-37.

Tayeh, M.A. and Marletta, M.A. (1989) Macrophage oxidation of L-arginine to nitric oxide, nitrite and nitrate: Tetrahydrobiopterin is required as a cofactor. *J Biol Chem*; 264: 19654-19658.

Terasaki T, Hirai K, Sato H, Kang YS, Tsuji A. (1990). Absorptive-mediated endocytosis of a dynorphinlike analgesic peptide, E- into the blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther*, 253: 315-3290.

Thomas Bobby **(2009)**. Parkinson's Disease: From Molecular Pathways in Disease to Therapeutic Approaches. *ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING*. Volume 11, Number 9.

Tilling T, Engelbertz C, Decker S, Korte D, Huwel S, Galla HJ. **(2002)**. Expression and adhesive properties of basement membrane. *J Neuroimmune Pharmacol*, 1: 223–236.

Tong XK, Hamel E. **(1999)**. Regional cholinergic denervation of cortical microvessels and nitric oxide synthase-containing neurons in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 92: 163–175.

Tontsch U, Bauer H. **(1991)**. Glial cells and neurons induce blood–brain barrier enzymes in cerebral endothelial cells. *Brain Res*, 539: 247–253.

Tracey A. Martin and Wen G. Jiang **(2009)** Loss of tight junction barrier function and its role in cancer metastasis. *Bioch et Biophys Acta* 1788: 872–891.

Tretter L., Sipos I., Adam-Vizi V., **(2004)**. Initiation of neuronal damage by complex I deficiency and oxidative stress in Parkinson's disease, *Neurochem. Res.* 569–577.

Tsuyoshi Nishiokua, Atsushi Yamauchia, Fuyuko Takataa,b, Takuya Watanabea, Koki Furushoa, Hideki Shutoa, Shinya Dohgua, Yasufumi Kataokaa **(2010)** Disruption of the blood–brain barrier in collagen-induced arthritic mice. *Neurosc Let* 482: 208–211.

Valko Marian, Leibfritz Dieter, Jan Moncola, Mark T.D. Cronin, Milan Mazura, Joshua Telser **(2007)**. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *IJBCB* 39: 44–84.

Van Laar Victor S., Berman Sarah B. **(2009)** Mitochondrial dynamics in Parkinson's disease *Exp Neurol* 218: 247–256.

van Muiswinkel F.L., de Vos R.A.I., Bol J.G.J.M., Andringa G., Jansen Steur E.N.H, Ross D., Siegel D., Drukarch B., **(2004)** Expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase in the normal and Parkinsonian substantia nigra *Neurobiol of Aging* 25: 1253–1262.

Versteeg, DH., Van der Guten, J., de Jong, W., Palkovits, M. **(1976)**. Regional concentrations of noradrenaline and dopamine in rat brain *Brain Res*; 113: 563-574.

Vergo S., Johansen J. L., Leist M. and Lotharius J. **(2007)**. Vesicular monoamine transporter 2 regulates the sensitivity of rat dopaminergic neurons to disturbed cytosolic dopamine levels. *Brain Res*; 1185: 18–32.

Vyas I, Lowndes HE, Howland RD. **(1985)** Inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in tissues of the rat by acrylamide and related compounds. *Neurotoxicol*; 6(3):123-32.

Waymire JC, Ayling JE, Craviso GL., (1993) Nicotinic cholinergic regulation of tetrahydrobiopterin levels in bovine adrenal chromaffin cells. *Adv Exp Med Biol*; 338: 235-238.

William D. Bush, Jacob Garguilo, Fabio A. Zucca, Alberto Albertini, Luigi Zecca, Glenn S. Edwards, Robert J. Nemanich, and John D. Simon. (2006). The surface oxidation potential of human neuromelanin reveals a spherical architecture with a pheomelanin core and eumelanin surface. *PNAS*; 103: 14785-14789.

William F. Ganong, (2004). Fisiología Médica. 19ava edición en español, *El manual moderno*.

Williams KC, Corey S, Westmoreland SV, Pauley D, Knight H, deBakker C, Alvarez X, Lackner AA. (2001). Perivascular macrophages are the primary cell type productively infected by simian immunodeficiency virus in the brains of macaques: implications for the neuropathogenesis of AIDS. *J Exp Med*, 193: 905 – 915.

William A. Banks and Michelle A. Erickson. (2010) The blood–brain barrier and immune function and dysfunction *Neurobiology of Disease* 37: 26–32.

Wolburg H, Lippoldt A. (2002) Tight junctions of the blood–brain barrier: development, composition and regulation. *Vascul Pharmacol*, 38: 323–337.

Wooten, GF., Currie, LJ., Bovbjerg, VE., Lee, JK., and Patrie, J., (2004). Are men at greater risk for Parkinson's disease than women? *Jl of Neurol, Neurosur, and Psychiatry*, 75: 637-639.

Wu Z, Guo H, Chow N, Sallstrom J, Bell RD, Deane R, Brooks A, Kanagala S, Rubio A, Sagare A. (2005). Role of MEOX2 homeobox gene in neurovascular dysfunction in Alzheimer disease. *Nat Med*, 11: 959–965.

Yahr, MD and Duvoisin, RC., (1972). Drug therapy of parkinsonism *New Engl. J Med*. 287, 20-24.

Yang Song and Garry R. Buettner (2010) Thermodynamic and kinetic considerations for the reaction of semiquinone radicals to form superoxide and hydrogen peroxide *Free Rad Biol & Med* 49: 919–962.

Yoshiro Saito, Keiko Nishio, Yoko Ogawa, Tomoya Kinumi, Yasukazu Yoshida, Yoshinori Masuo, Etsuo Niki. (2007). Molecular mechanisms of 6-hydroxydopamine-induced cytotoxicity in PC12 cells: Involvement of hydrogen peroxide-dependent and -independent action, *Free Rad Biol & Med* 42: 675–685.

Youdim, M.B.H., Ben-Shachar, D., Riederer, P., (1994). The enigma of neuromelanin in Parkinson's disease substantia nigra. *J Neural Transm*; 43(Supl.): 113-122.

Youdim MB, Harshak N, Yoshioka M, Araki H, Mukai Y, Gotto G. (1991). Novel substrates and products of amine oxidase-catalysed reactions *Biochem Soc Trans.* 19 (1):224-228.

Youdim MB, Ben Shachar D, Riederer P. (1989). Is Parkinson's disease a progressive siderosis of substantia nigra resulting in iron and melanin induced neurodegeneration? *Acta Neurol Scand Suppl*; 126:47-54.

Zecca, L., Shima, T., Stroppolo, A. (1996). Interaction of neuromelanin and iron in substantia nigra and other areas of human brain. *Neuroscience*; 73: 407-415.

Zecca, L., Swartz, H.M., (1993). Total and paramagnetic metals in human substantia nigra and its neuromelanin. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect*; 5: 203-213.

Zecca, L., Mecacci, C., Seraglia, R., (1992). The chemical characterization of melanin contained in substantia nigra of human brain. *Biochim Biophys Acta*; 1138: 6-10.

Zecca L, Zucca FA, Albertini A, Rizzio E, Fariello RG (2006). A proposed dual role of neuromelanin in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology*; 67 (7 Suppl 2):S8-11.

Zecca Luigi, I., Casella Luigi., Albertini Alberto., Bellei Chiara., Zucca Fabio A., Engelen Mireille., Zadlo Andrzej., and Zarna Tadeusz., (2008). Neuromelanin can protect against iron mediated- oxidative damage in system modeling iron overload of brain aging and Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 106: 1866-1875.

Zhang, F., Dryhurst, G. (1994). Effects of L-cysteine on the oxidation chemistry of dopamine: New reaction pathways of potential relevance to idiopathic Parkinson's disease. *J Med Chem*; 37: 1084-1098.

Zhenquan Jia, Hong Zhu, Hara P. Misra, Yunbo Li. (2008). Potent induction of total cellular GSH and NQO1 as well as mitochondrial GSH by 3H-1,2-dithiole-3-thione in SH-SY5Y neuroblastoma cells and primary human neurons: Protection against neurocytotoxicity elicited by dopamine, 6-hydroxydopamine, 4-hydroxy-2-nonenal, or hydrogen peroxide *Brain Research.* 1197: 159-169.

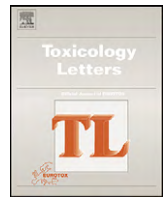
Zhi Dong Zhou and Tit Meng Lim., (2006). Roles of Glutathione (GSH) in Dopamine (DA) Oxidation Studied by Improved Tandem HPLC Plus ESI-MS, *Biomed & Pharmacot*, 62 (4): 236-249.

Zhi Dong Zhou, Tit Meng Lim (2009) Dopamine (DA) induced irreversible proteasome inhibition via DA derived quinines *Free Rad Res*, 43 (4): 417-430.

Zhi Dong Zhou, Yu Hong Lan, Eng King Tan and Tit Meng Lim, (2010) Iron species-mediated dopamine Oxidation, proteasome inhibition, and dopaminergic cell demise: Implications for iron-related dopaminergic, *Free Rad Biol & Med*, doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.010:

Zigmond, RE., Schwarzschild, MA., and Rittenhouse, AR., **(1989)**. Acute regulation of tyrosine hydroxylase by nerve activity and by neurotransmitters via phosphorylation. *Annu Rev Neurosci* 12: 145-161.

Zlokovic BV. **(2005)**. Neurovascular mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration. *Trends Neurosci* 28: 202–208.



Oxidative stress, progressive damage in the substantia nigra and plasma dopamine oxidation, in rats chronically exposed to ozone

D. Santiago-López^a, J.A. Bautista-Martínez^b, C.I. Reyes-Hernandez^b, M. Aguilar-Martínez^{b,*}, S. Rivas-Arancibia^{a,**}

^a Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM. CP, 04510 Mexico City, Mexico

^b Departamento de Físicoquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM. CP, 04510 Mexico City, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 March 2010

Received in revised form 21 May 2010

Accepted 24 May 2010

Available online 10 June 2010

Keywords:

Dopamine quinones

Cyclic voltammetry

Free radicals

Neuronal damage

Ozone

ABSTRACT

The purpose of our work was to determine the effects of oxidative stress on the neurodegeneration process in the substantia nigra, and to evaluate dopamine-oxidation metabolites in the plasma using a cyclic voltammetry (CV) technique. We have also studied the correlation between the increases in oxidized dopamine-species levels with the severity of lipid-peroxidation in the plasma. Sixty-four male Wistar rats were divided into four experimental groups and received air (Group I, control) or ozone (0.25 ppm) daily by inhalation for 4 h for 15 (Group II), 30 (Group III), and 60 (Group IV) days. The brains were processed for immunohistochemical location of dopamine and p53 in the substantia nigra. Plasma collected from these animals was assayed for oxidized dopamine products using CV and lipid-peroxidation levels were measured. Our results indicate that chronic exposure to low O₃ doses causes that the number of dopaminergic neurons decreased, and p53-immunoreactive cells increases until 30 days; which was a function of the time of exposure to ozone. Oxidative stress produces a significant increase in the levels of the dopamine quinones (DAQs) that correlated well ($r=0.962$) with lipid peroxides in the plasma during the study period. These results suggest that DAQ could be a reliable, peripheral oxidative indicator of nigral dopaminergic damage in the brain.

© 2010 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Dopamine (DA) is a catecholamine, which plays an important role in the mammalian central nervous system (CNS) as a neurotransmitter, and it is present in greater amounts than other neurotransmitters. Low levels of striatal DA have been found in patients with Parkinson's disease (Wightman et al., 1988). The normal metabolism of dopamine involves many oxidation reactions, which produce harmful metabolites capable of causing cell damage (Hermida-Ameijeiras et al., 2004). In a balanced redox state, the DA oxidation is part of the normal metabolism. When an oxidation–reduction imbalance exists, oxidation of DA increases giving rise to dopamine quinones (DAQs). They may react with cysteine and produce cysteinyl residues; those are able to inhibit the function of many proteins (Ramsden et al., 2001). There is evidence that an increased blood–brain-barrier permeability occurred in several experimental and pathological conditions, such as in the neuroinflammatory process or neurodegenerative diseases,

which take place accompanied by increases in reactive-oxygen species (ROS) (Schreibelt et al., 2007; Carvey et al., 2005; Zlokovic, 2008). Therefore, oxidized dopamine metabolites can cross the blood–brain barrier (BBB) and circulate in the plasma (Carvey et al., 2005).

Low ozone doses are used as a noninvasive model to cause oxidative stress (Rivas-Arancibia et al., 1998). This oxidative-stress state produces an increase of lipid-peroxidation levels in different brain structures (Rivas-Arancibia et al., 2000). Dopaminergic neuronal death is a fundamental part of this neurodegenerative process when an animal is exposed for 4-h per day during at least 1 month to ozone (Pereyra-Muñoz et al., 2006).

Because the DA is quickly oxidized, electrochemical techniques have been explored for its analysis in buffers and controlled media, but DA oxidation has been researched in biological systems. (Guan-Ping et al., 2004, 2007; Ramesh et al., 2004; Aguilar et al., 2004; Patel et al., 2005). We used a method based on cyclic voltammetry (CV) that allows us to measure the DAQs in plasma and correlate this with the progressive damage in the substantia nigra caused by oxidative stress.

Our aim was to determine if the oxidative-stress state caused by chronic low O₃ exposure, causes progressive neurodegenerative process in the substantia nigra and the increase in the oxidized metabolites of dopamine in plasma.

* Corresponding author. Tel.: +52 55 56223758.

** Corresponding author. Tel.: +52 55 56232500; fax: +52 55 56232500.

E-mail addresses: martha.aguilarmartinez@gmail.com (M. Aguilar-Martínez), srivas@unam.mx (S. Rivas-Arancibia).

2. Materials and methods

2.1. Animals and animal care

Sixty-four male Wistar rats weighing 250–300 g were individually housed in acrylic boxes with food ad libitum (NutriCubo, Purina, USA) and kept in a clear-air room. Both the control and treated rats were maintained in a temperature and humidity controlled environmental bioterium and were killed in accordance with the National Institute of Health Guidelines for Animal Treatment.

2.2. General procedure

Rats were randomly divided into four experimental groups ($n = 16$). Group 1 was composed of animals exposed daily to an air stream free of O_3 for 4 h and groups 2, 3, and 4 were animals exposed for 15, 30, and 60 days to O_3 . The exposure to ozone was made daily for 4 h at a dose of 0.25 ppm (similar to a day of high pollution in Mexico City) (Rivas-Arancibia et al., 2010).

Two hours after the last exposure to clean air or O_3 , plasma of six animals from each group was obtained of blood of heart for lipid-peroxidation levels (LPO). Four animals from each group were deeply anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg ip; Sedalparma, Edo. de México, México) and perfused transcardially with 4% paraformaldehyde (Sigma–Aldrich Chemie, Germany) in 0.1 M phosphate buffer (J.T. Baker, NJ) (PB, Tecsiqum; pH 7.4). The brains were postfixed with 10% formaldehyde (J.T. Baker, USA) for 24 h and embedded in paraffin (Mc Cormick, St. Louis, MO, USA). Sagittal slices of the brain containing the substantia nigra were cut at 5 μ m on a microtome (American Optical) and mounted on slides. From each group sagittal brain slices containing the substantia nigra were processed by immunohistochemistry for DA and p53. Additionally, six animals from each group were deeply anesthetized and a blood sample was obtained, which sample was then centrifuged and 1.5 mL of the plasma was immediately studied by CV.

2.3. O_3 exposure

Animals were kept daily for 4 h in a chamber with a diffuser, connected to a variable flux O_3 generator (5 L/s). Ozone was generated in a tube through which a high-voltage current circulated, which caused the conversion of oxygen into O_3 . Ozone production levels were proportional to the current intensity and to the air flow. A PCI Ozone and Control System Monitor was used to measure the O_3 concentration inside the chamber throughout the experiment.

2.4. Lipid-peroxidation (LPO) assay

LPO levels were quantified using a K-ASSAY LPO kit (Kamiya Biomedical Co). After the last exposure to O_3 , six animals from each group were deeply anesthetized, killed by decapitation, and their plasma was obtained. The enzyme reagents (ascorbic oxidase and lipoprotein lipase) were added. The mixture was incubated for 5 min at 35 °C and the chromogen reagent (10-N-methylcarbamoyl-3,7-dimethylamine-10-H-phenothiazide) was added. The resulting mixture was incubated for 10 min at 30 °C. The absorbance was then measured at 675 nm in a spectrophotometer (Jenway 355). A two-point calibration curve was made using the saline blank (0 nmol/mL) and the 50 nmol/mL cumene hydroperoxidase standard provided with the kit.

The results were calculated using the equation, whose linear range for this assay was between 2.0 nmol/mL and 300 nmol/mL, $LPO [nmol/mL] = [(Es - Eb) \times 50 / (Estd - Eb)]$, where Es is the sample absorbance, Eb is the blank absorbance, and $Estd$ is the cumene absorbance (50 nmol/mL).

2.5. Immunohistochemistry for DA and P53

Sagittal sections of each brain containing the substantia nigra had the paraffin removed, treated with a paraffin-removal and heat-retrieval solution (Biocare Medical), and introduced into an electric pressure cooker (Declocking Chamber, Biocare Medical) for 5 min. After washing with distilled water and treatment with hydrogen peroxide (diluted 1:5; Fisher Scientific) for 5 min, sections were rinsed again with distilled water and treated with a blocking reagent (Background Sniper, 4plus Detection Component, Biocare Medical) for 10 min. They were then washed with 0.1 M phosphate saline buffer (PBS), pH 7.4 (Merck), and incubated for 12 h at 4 °C with anti-DA (purified rabbit polyclonal antibody, diluted 1:500, Chemicon) or p53 (purified rabbit polyclonal antibody, diluted 1:200, Biocare). Sections were rinsed with PBS and treated with biotinylated secondary antibody (Universal Link, Biocare Medical) for 1 h. After washing with PBS, treated with streptavidin-enzyme conjugates (4plus detection component, streptavidin-hrp, Biocare Medical) for 30 min, and washed again with PBS, the bound antibody was visualized using 3,3'-diaminobenzidine (DAB Substrate Kit, ScyTek) as the chromogen. The slices were washed in distilled water and counterstained with hematoxylin-buffer solution. Representative brain sections from each group were processed in parallel after covering them with Permount coverslips and the sections were examined with a BX41 Olympus Microscope and photographed with an Evolution-QImagin Digital Camera Kit (MediaCybernetics).

2.6. Number of neurons in the substantia nigra

Four animals from each experimental group were analyzed. The number of immunoreactive cells in the substantia nigra was counted, using four representative brain sections from each animal from each group and for each antibody. The total number of immunoreactive cells per microscopic field at 40 \times magnification (each microscopic field had an area of 30,000 μ m²) was counted, analyzed for each group, and the mean number of cells was calculated.

2.7. Cyclic voltammetry (CV)

Cyclic voltammetry measurements were made using a PC-controlled BAS Epsilon electrochemical workstation (West Lafayette, Indianapolis, USA), connected to a C-3 cell stand with a three-electrode configuration, which consisted of a glassy carbon (GC) (BAS model MF-2012, $\phi = 3$ mm) as the working electrode, an AgCl–Ag 3 M KCl (BAS model MW-2063) as the reference electrode, and a platinum wire as an auxiliary electrode (BAS model MW-1032), all of them from West Lafayette, Indianapolis, USA. OriginPro 7.0 software was used for the transformation of the initial signal and for obtaining the first derivatives of the voltamperometric signals. All potentials were corrected compared to the normal hydrogen electrode (NHE).

Animals were deeply anesthetized and a blood sample was collected direct from left ventricle. Plasma (1.5 mL) was put into a low volume cell, which was purged with nitrogen (Ultra high purity, Praxair) to eliminate oxygen before the data acquisition. The voltammograms were recorded between -1.3 V and 1.7 V at a 0.1 V s⁻¹ scan rate. The complete plasma electrochemical window was -1.6 V to 1.7 V. All measurements were made at room temperature. The glassy carbon electrode was polished manually with a smooth polishing cloth with alumina ($\phi = 0.05$ μ m; LECO, St. Joseph, MO, USA), sonicated in distilled water for 2–4 min, and then dried with acetone (Buehler, Lake Bluff, IL, USA) before each measurement.

To determine the voltammetric characteristics of the biological system not affected by oxidative stress, the CV of the blood plasma obtained from rats not exposed to O_3 was recorded at room temperature with a glassy carbon as the working electrode. These curves were used as the control and the subsequent comparisons were based on these results.

2.8. Statistical methods

The data of the level of lipid peroxidation and changes in the number of immunoreactive cells within the substantia nigra as a function of the time of exposure to ozone were analyzed by a Kruskal–Wallis test and Mann–Whitney U -test.

Cyclic voltammetry and the data of the level of lipid peroxidation were analyzed by nonparametric statistics. To facilitate the analysis of the data from the cyclic voltammetry, the data were mathematically treated to obtain the first derivative of the cathode peaks. This allows magnifying and defining the waves that cannot otherwise be clearly observed in a typical voltammogram experiment. The values of the first derivative of each group were expressed as medians and analyzed statistically using the nonparametric Kruskal–Wallis and Mann–Whitney U -test according to Siegel (1991). A Spearman correlation was then calculated to obtain the level of correlation of the DA-oxidized species levels vs. LPO levels.

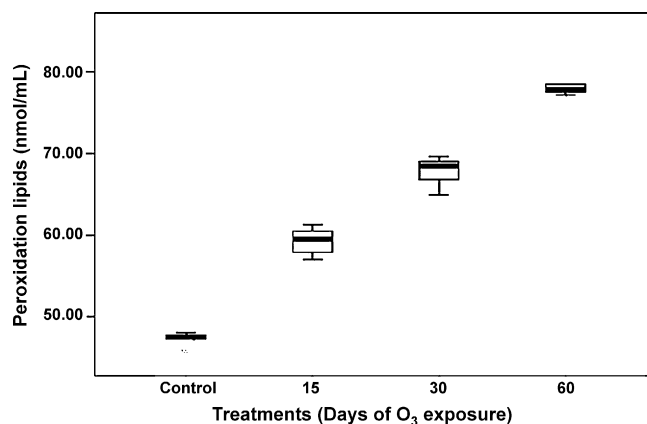


Fig. 1. Effect of ozone treatment on blood lipid-peroxidation levels (LPO). Histograms show mean ($n \pm$ SE). The level of lipid-peroxidation changes after 15, 30, and 60 days, 2 h after the ozone exposure had finished. The lipid-peroxidation levels (nmol/mL) are depicted on the ordinate. The treatment (control group, 15, 30, and 60 days of ozone exposure) is depicted on the abscissa. The boxes represent the mean of the lipid-peroxidation levels (for each group $n = 6$). The standard errors are represented by the line over the box.

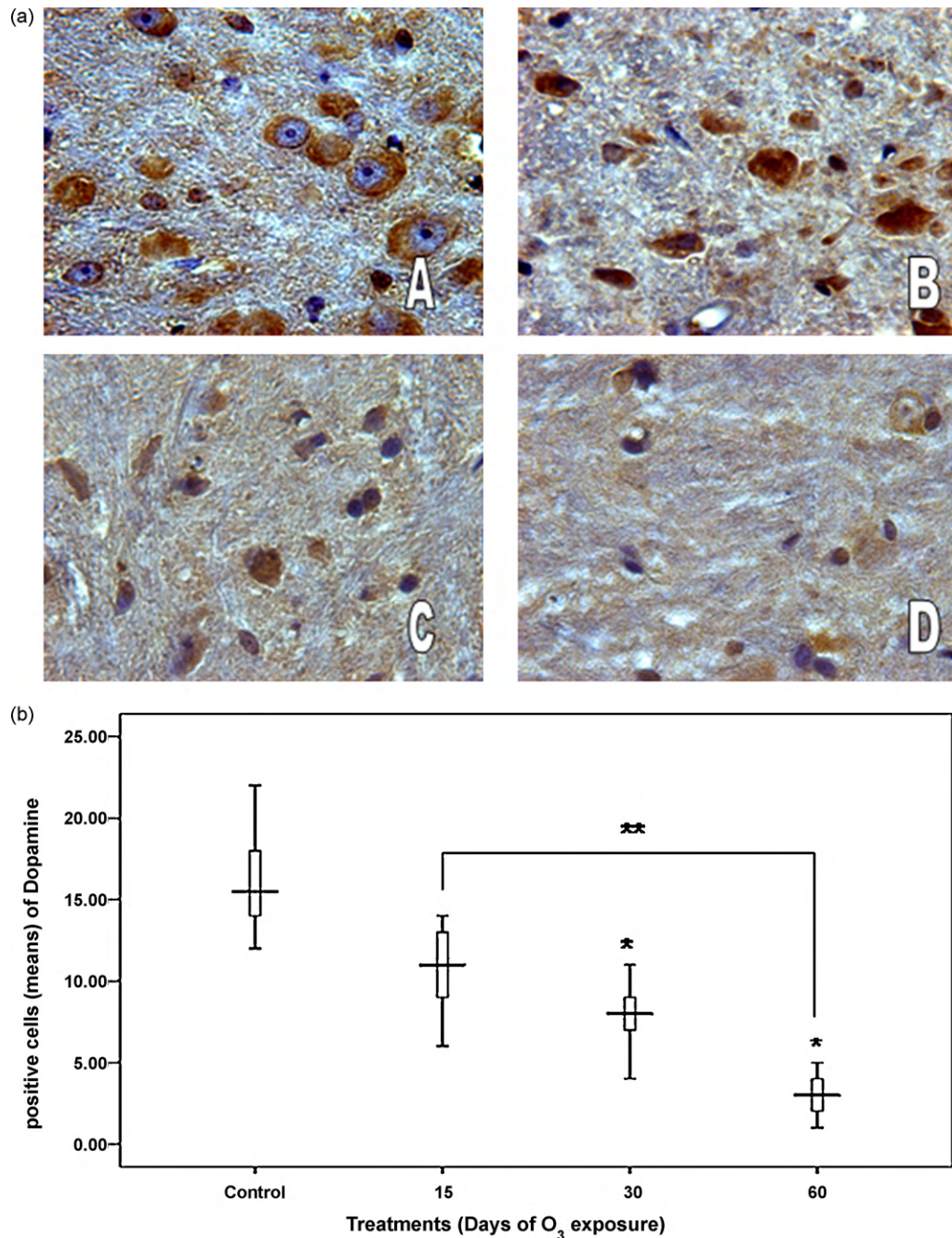


Fig. 2. Effects of ozone exposure on the dopamine immunoreactivity of cells in the substantia nigra. (a) Light photomicrographs demonstrate immunoreactivity in the substantia nigra of rats treated with air only. (A) Ozone treatment for 15 days (B) Ozone treatment for 30 days (C) Ozone treatment for 60 days (D). Note immunoreactivity decreases in the substantia nigra and the changes in the cell morphology and perikaryon. Displaced nucleus and cytoplasmic vacuoles (C). The loss of the dopaminergic cells (C and D). All of the changes in the groups exposed to ozone for 15, 30 and 60 days ($P < 0.05$) when compared to the control group are significantly different. (b) Effects of ozone exposure on the number of reactive dopamine cells in the substantia nigra. Means of the cells positive to dopamine are depicted on the ordinate, treatment on the abscissa. Asterisk shows statistically significant differences ($P < 0.05$) from the control group.

3. Results

3.1. Lipid-peroxidation (LPO) analysis

In the analysis of LPO plasma levels, we found increases of 59.3 ± 1.2 nmol/mL, 69.3 ± 1.5 nmol/mL, and 78.33 ± 0.4 nmol/mL as a function of the exposure time to ozone (15, 30, and 60 days), compared to the control group, which had an LPO level of 47.37 ± 0.63 nmol/mL (Fig. 1).

The Kruskal–Wallis test showed significant differences between the groups in the levels of the plasma LPO ($P < 0.001$).

The Mann–Whitney test showed that the LPO levels in all ozone-exposed groups were significantly ($P < 0.001$) higher compared to the control group.

3.2. Immunohistochemistry

3.2.1. Dopamine immunoreactivity

Normal dopaminergic neurons and a well-defined perikaryon could be seen in the DA immunohistochemistry in the control group. In the groups exposed to ozone the normal morphology of neurons was lost in the substantia nigra. For the 30- and 60-day

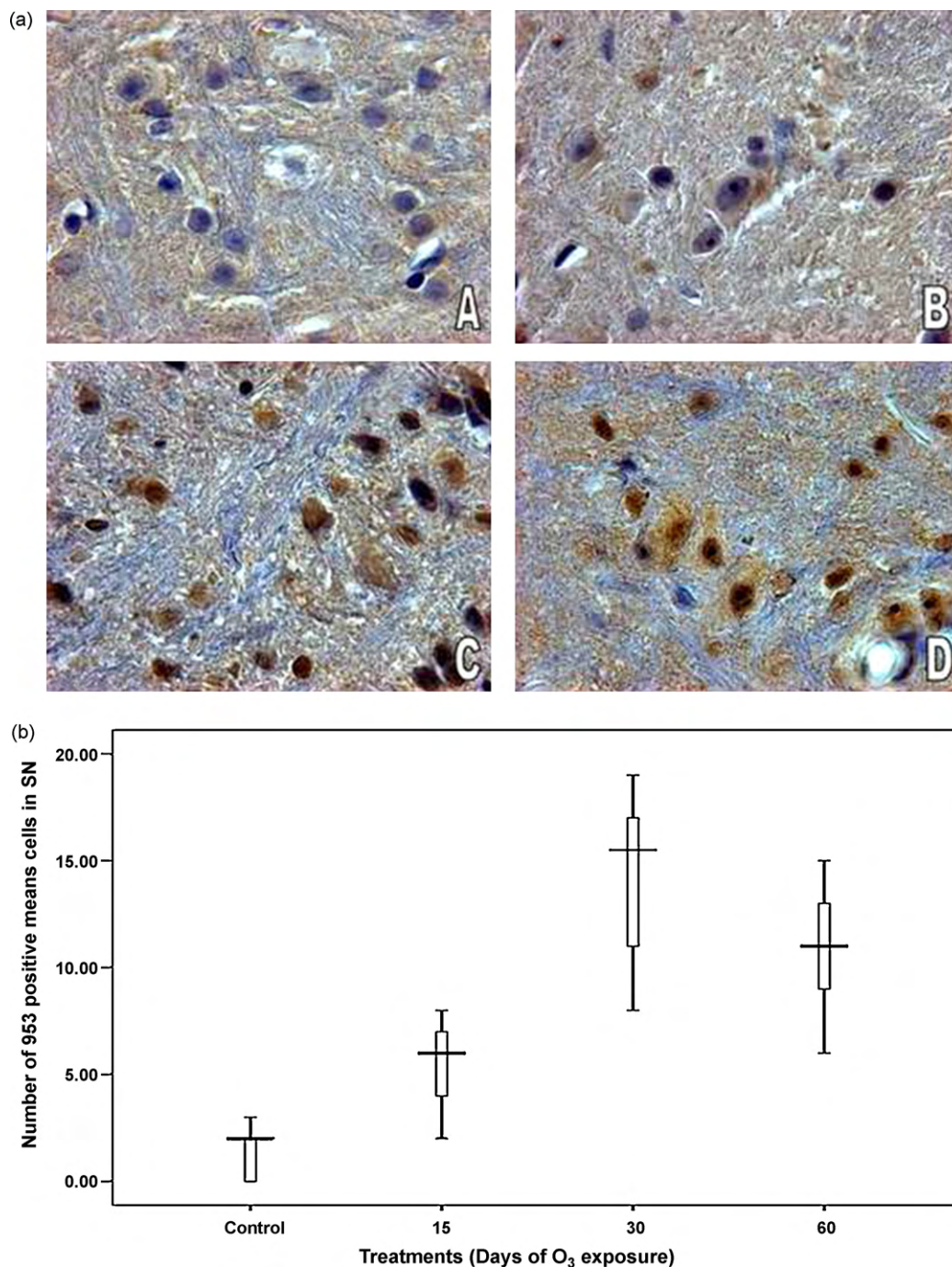


Fig. 3. Effects of ozone exposure on the immunoreactivity of p53 cells in the substantia nigra. (a) Light photomicrographs demonstrate immunoreactivity in the substantia nigra of rats treated with air only. (A) Ozone treatment for 15 days (B) ozone treatment for 30 days (C) ozone treatment for 60 days (D). Note immunoreactivity increases in the substantia nigra and the p53 translocation to the nucleus increases (C and D). (b) Effects of ozone exposure on the number of the reactive p53 cells in the substantia nigra. The means of cells positive to p53 are depicted on the ordinate, treatment on the abscissa. Asterisk shows statistically significant differences ($P < 0.05$) from the control group.

ozone-exposed groups, we found progressive immunoreactivity decreases caused by the upsurge in cellular death. In the substantia nigra of animals exposed to 30 and 60 days of ozone, the nucleus is displaced and the cytoplasmic vacuoles can be seen. Significant differences were measured in the groups exposed to ozone for 15, 30, and 60 days ($P < 0.05$) compared to the control group. The groups exposed to ozone for 30 and 60 days have significantly fewer neurons than the group exposed to ozone for 15 days ($P < 0.05$) (Fig. 2).

3.2.2. p53 immunoreactivity

A minimal immunoreactivity to p53 was measured in the control group in the substantia nigra. Progressive increases in the immunoreactive cells were seen in the 15-day group and we could see nucleus translocation of p53 after 30 days in the substantia nigra. The Kruskal–Wallis test showed significant differences in the counts of immunoreactive cells ($P < 0.03$). The Mann–Whitney *U*-test showed a significant difference between the control and the ozone-treated groups and also showed significant differences

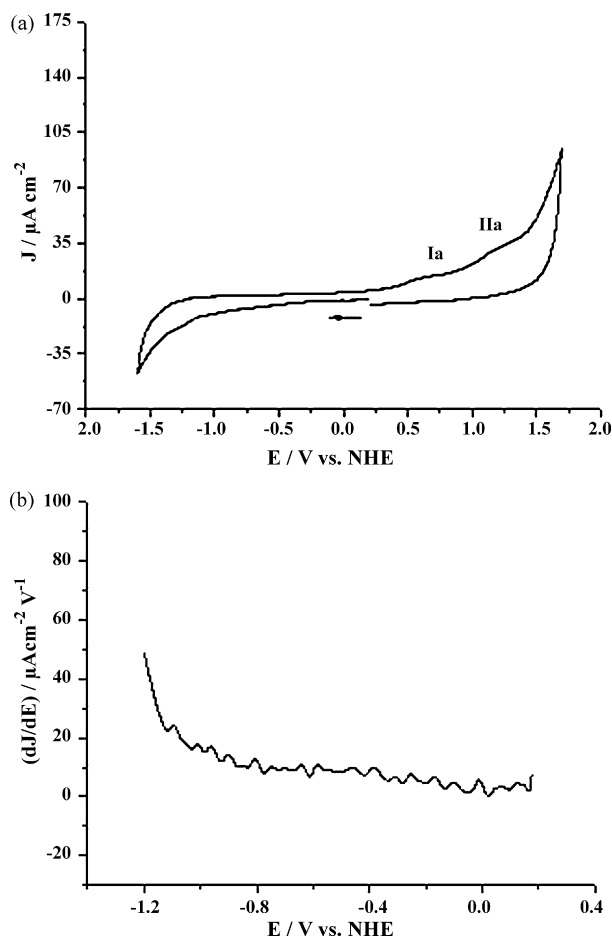


Fig. 4. Cyclic voltammogram obtained from rat plasma of the control group. Glassy carbon was the working electrode (7 mm^2) and AgCl–Ag was the reference electrode. Scan rate (0.1 V s^{-1}) (a) Ia and IIa, waves are at 0.597 V and 1.147 V . The Ia broad wave is caused by the oxidation of plasma DA species and ascorbic acid. The IIa wave is caused by the oxidation of other plasma components. (b) On the corresponding first derivative from the cathodic zone of the voltammogram, in the range from 0.2 V to -1.2 V , we could not see a representative wave because the amount of oxidized molecules recorded was not significant.

among the groups exposed to ozone 15 days ($P < 0.05$), 30 days, and 60 days ($P < 0.03$) (Fig. 3).

3.3. Electrochemical determination of DA-oxidized species

3.3.1. Control group

The typical rat-plasma curve with high conductivity showed electroactivity between -1.6 V and $+1.7 \text{ V}$ vs. the normal hydrogen electrode (NHE), with an average resistance of 200Ω for our electrochemical-cell arrangement. The voltammograms, when scanned from zero to positive potentials, show two small anodic waves, Ia and IIa, at 0.597 V and 1.147 V (Fig. 4). The Ia wave is broad, caused by the oxidation of DA species and ascorbic acid that occur at very close potentials, whereas the IIa wave is caused by the oxidation of other plasma components. When scanning from zero to a negative potential, in a separate experiment, no cathodic peaks were measured (Fig. 4).

3.3.2. Ozone groups

The CVs of plasma obtained from rats exposed for 15, 30, and 60 days (Figs. 5a, 6a, and 7a) showed a peak (Ic) in the cathodic zone, ascribed to an irreversible electroreduction process of DAQs at the glassy carbon electrode without an interference of ascorbic acid (AA).

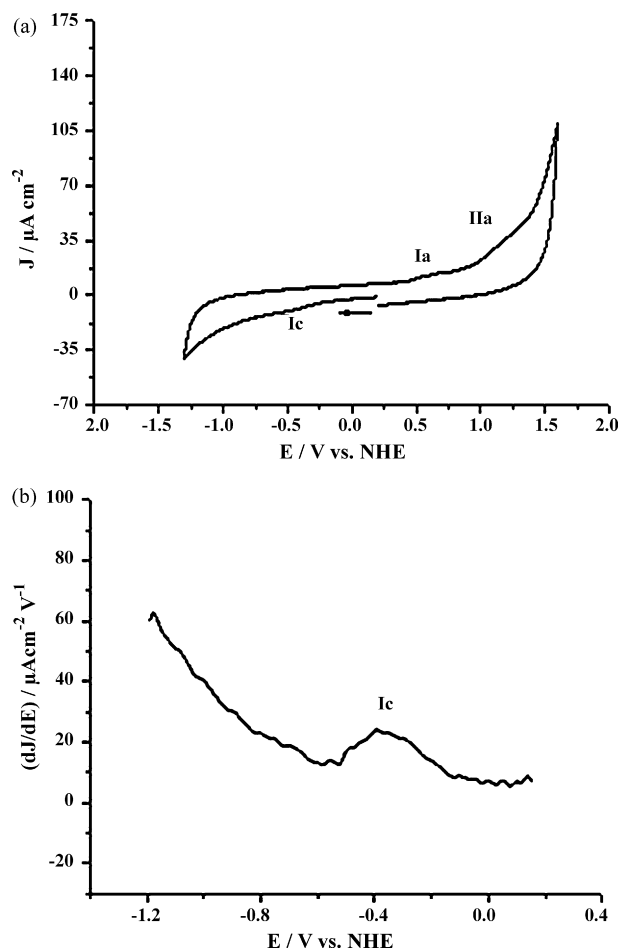


Fig. 5. Cyclic voltammogram obtained from rat plasma of 15-day ozone treatment group. Glassy carbon was the working electrode (7 mm^2) and AgCl–Ag was the reference electrode. Scan rate (0.1 V s^{-1}). (a) The Ic Peak shown in the cathodic zone was ascribed to an irreversible electroreduction process of DAQs at the glassy carbon electrode without interference of ascorbic acid (AA). (b) On the corresponding first derivative from the cathodic zone of the voltammogram, in the range from 0.2 V to -1.2 V , we observed a representative slight wave produced by the oxidized dopamine.

3.3.3. Ozone groups

The current-density values of the Ic peak increased directly as a function of the time of exposure to O_3 , as demonstrated by the first derivative of the cathodic signals (Figs. 4b, 6b, and 7b). The results are the medians of first derivative of the cathodic peaks. The plasma of animals exposed to O_3 for 15, 30, and 60 days showed increased current-density values of the Ic peak of $22 \mu\text{A cm}^{-2}$, $40 \mu\text{A cm}^{-2}$, and $90 \mu\text{A cm}^{-2}$.

The Kruskal–Wallis test showed significant differences among groups in the plasma current-density values of the Ic peak ($P < 0.001$). The Mann–Whitney test showed that the first derivative of the current-density values of the cathodic peaks (Ic peak) in all the ozone-exposed groups had significant differences at 15, 30, and 60 days ($P < 0.05$) compared to the control group (Figs. 5–7).

3.4. Coefficient correlation between the LPO and the DAQs

Our results indicate a correlation between the LPO and the oxidized dopamine metabolites. The data of the increased levels of LPO and that of the DAQs were grouped in a Scatter plot and a Spearman correlation coefficient of 0.940 was obtained (Fig. 8).

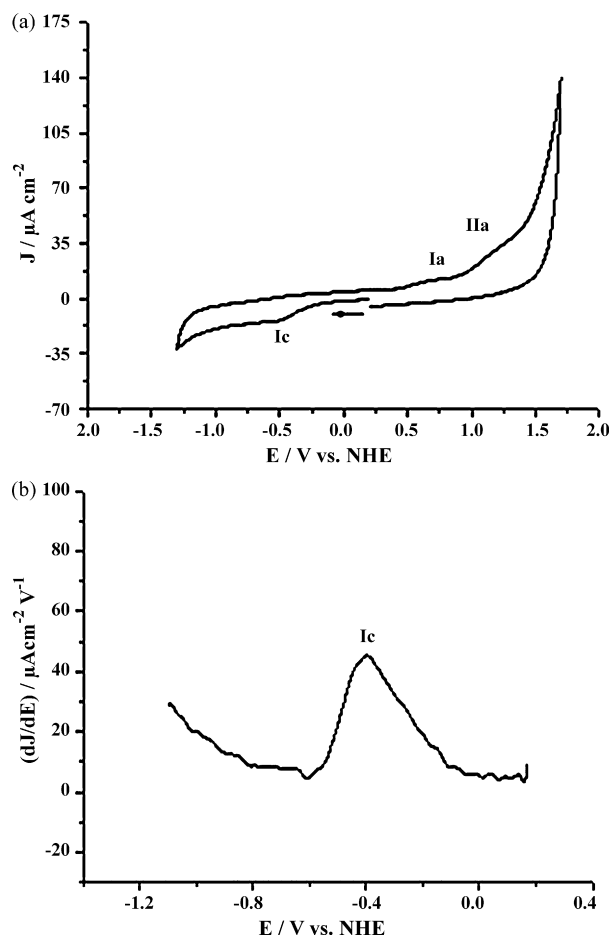


Fig. 6. Cyclic voltammogram obtained from rat plasma of 30-day ozone treatment group. Glassy carbon was the working electrode (7 mm^2) and AgCl–Ag was the reference electrode. Scan rate (0.1 V s^{-1}). (a) The Ic Peak shown in the cathodic zone was ascribed to an irreversible electroreduction process of DAQs at the glassy carbon electrode without interference of ascorbic acid (AA). (b) On the corresponding first derivative from the cathodic zone of the voltammogram, in the range from 0.2 V to -1.2 V , note an increased wave produced by the oxidized dopamine recorded (Ic).

4. Discussion

The exposure of rats to chronic low-ozone doses causes an oxidative-stress state and causes oxidation of dopamine yielding quinone formation. Dopamine is a molecule easily oxidized in a non-enzymatic form, because it is composed of an *o*-dihydroxylated benzene ring (catechol) which forms a series of electrophilic quinoid species. Also, the spontaneous dopamine oxidation under physiological conditions is determined by its low oxidation potential ($+124 \text{ mV}$ vs. the Ag–AgCl electrode), which is lower than the mitochondrial cytochrome oxidation potential (Montine et al., 1997). During this process a high quantity of ROS is formed. All of these are associated with an inflammatory response causing alterations in the BBB function, and allow the oxidized dopamine metabolites to cross the barrier and circulate in the blood leading to quinone formation in the plasma, which can be determined by cyclic voltammetry.

Immunohistochemistry against dopamine in the substantia nigra in the control group showed well-defined cells and a substantial number of dopaminergic neurons. In the 15-day treatment group we observed morphologic alterations and a loss in the number of dopaminergic cells. In the 30-day treatment group we saw decreases in the immunoreactivity against dopamine and an evident morphologic alteration in the remaining cells. For the 60-day group we saw a total lost of morphology in the small

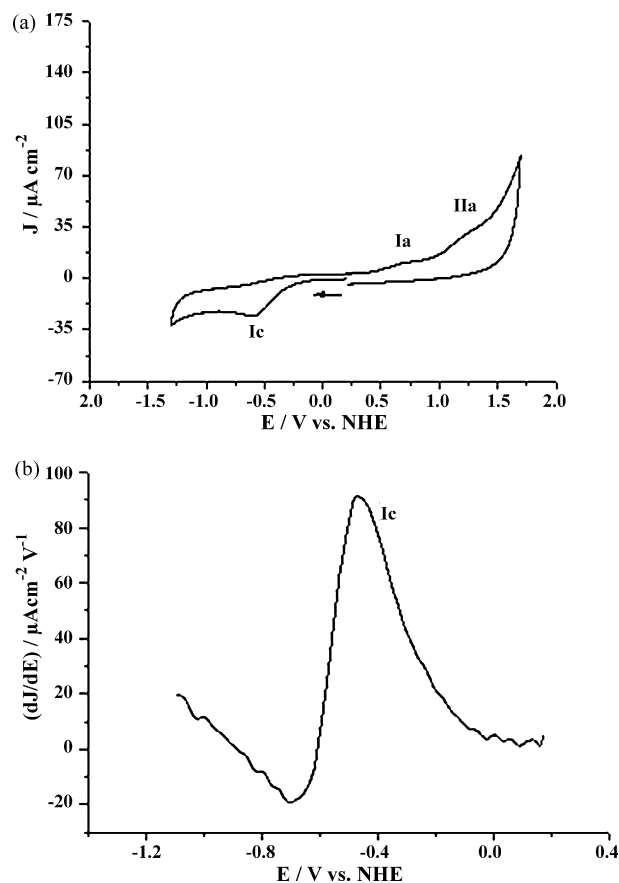


Fig. 7. Cyclic voltammogram obtained from rat plasma of the 60-day ozone treatment group. Glassy carbon was the working electrode (7 mm^2) and AgCl–Ag was the reference electrode. Scan rate (0.1 V s^{-1}). (a) The Ic Peak shown in the cathodic zone was ascribed to an irreversible electroreduction process of DAQs and other molecules at the glassy carbon electrode. (b) On the corresponding first derivative from the cathodic zone of the voltammogram, in the range from 0.2 V to -1.2 V , note the greatly increased wave produced by the oxidized dopamine and other oxidized molecules (Ic).

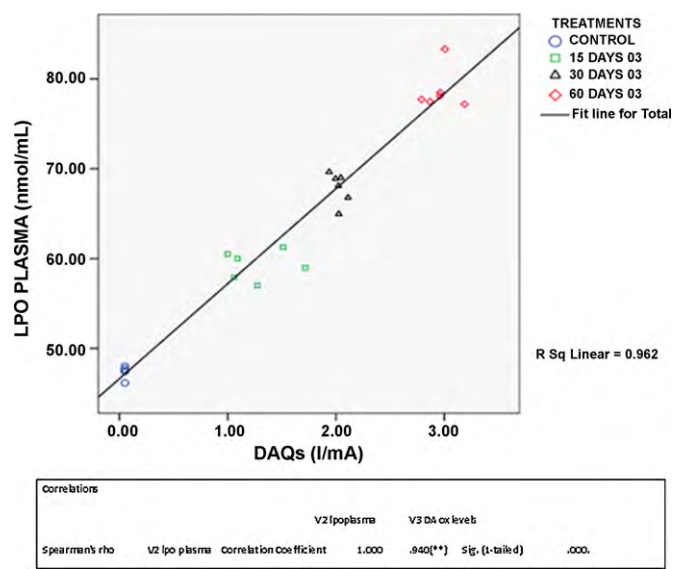


Fig. 8. Effect of ozone treatment on coefficient correlation between LPO levels and DAQ formation. The lipid-peroxidation levels (nmol/mL) are depicted on the ordinate. The dopamine quinone formation is depicted on the abscissa. The data of the increased levels of the LPO and the DAQs were grouped in a Scatter plot and a Spearman correlation coefficient of 0.940 was obtained.

number of remaining cells and almost no dopamine immunoreactivity.

Immunohistochemistry against p53 in the substantia nigra showed an increase of the translocation of p53 to the nucleus as the time of O₃ exposure increased, this indicates that oxidative stress per se causes cell death.

The correlation with the number of dopaminergic cells and the results of the cyclic voltammetry can be explained because after 15 days of ozone exposure we found dopamine oxidation and cellular alterations, but we still have cells that could be producing significant amounts of dopamine. These alterations continue up to 30 days of ozone exposure until these compensation antioxidant systems become insufficient at 60 days of ozone exposure. The damage in the cells results in a lost dopamine production and also in the increase of many more molecules caused by oxidation.

The cyclic voltammetry technique used in this work shows us the dopamine quinone formation in the plasma that occurs secondarily to oxidative stress in animals exposed to ozone. The current densities (peak I_c) are equivalent to the DAQ plasma concentration. The results of the CV analysis of the control group did not show cathodic peaks, which shows that in these plasma samples the DAQs were not present. Unlike the control group, the ozone-treated groups showed increases in the levels of oxidized dopamine metabolites as a direct function of the time of exposure.

The reduced dopamine cannot cross the BBB, so that the I_a peak recorded in the CV is caused by plasma dopamine. Despite that, in an oxidative-stress state the alterations in the BBB allowed oxidized dopamine to get into the blood circulation, and then react with plasma proteins to form quinones, so that we could record them in the I_c peak.

In the redox-balanced state, endogenous antioxidant systems usually can reduce the oxidized dopamine in the brain. Therefore, the oxidized dopamine is not present in the plasma, and as a consequence, the reactions with plasma proteins that produce the DAQs, recorded as I_c peaks, are not present, as shown in the control group. In an oxidative-stress state caused by chronic ozone exposure, the I_c peak appears. As the time of O₃ exposure increased, the I_c peak became wider and its potential shifted toward more cathodic values and the electroactivity window was shortened.

In spite of the I_c peak measured at 60 days and the correlation between the LPO levels and DAQs in blood, we found an apparent contradiction with the findings of the immunohistochemistry in the brain tissue at 60 days, because there was a low immunoreactivity to dopamine and an important increase in the p53, which indicates progressive cellular death. We explain this because the great oxidative stress was affecting many molecules and these overlapped as seen in the resulting I_c peak. This can be considered as a nonspecific recording with this technique at an advanced state of oxidative damage. Nevertheless, at the beginning of the neurodegenerative process and during the cellular death in the substantia nigra the technique yielded clear results and showed that the substance that caused all the reactions was the oxidized dopamine in the brain. This is important for the future consideration for an early diagnosis of Parkinson's disease.

The best known pathways of DAQs causing damage to dopaminergic neurons is cysteinyl residue formation, which has the ability to inhibit several protein functions and to reduce the ATP concentration because of a respiratory chain blocking (Ramsden et al., 2001). Other reports suggest a relation between an inflammatory response and the vulnerability of dopaminergic neurons. All the above compounds referred to are also characterized by their ability to disrupt the blood BBB (Ayata and Ropper, 2002). According to this, also changes in the vascular system have been demonstrated in the ventral mesencephalon of patients with PD (Faucheux et al., 1999). More importantly, changes in BBB permeability in the ventral mesencephalon of Parkinsonian patients have

been demonstrated *in vivo* (Kortekaas et al., 2005). There is then the possibility to relate the formation of the DAQs to the permeability alterations of the BBB. Initially the DAQs would form in the cerebral tissue producing reactive-oxygen species and contributing to the death of dopaminergic neurons of the substantia nigra pars compacta. Important fractions of the DAQs would then cross an altered BBB producing the formation of new quinones from catecholamine found there, so it is possible to measure part of them in the plasma by CV as in our experiment. These oxidized dopamine metabolites in the plasma then contribute to the increase of the LPO plasma levels. The results also show a direct relation, by the Spearman correlation index of 0.963, between the level of oxidative stress measured by LPO levels and the oxidized dopamine species, as we demonstrated in the 30-day treatment group, and for other oxidized species in the 60-day group when the oxidative damage is so great and involves so many more molecules that it stops being specific for our measurement technique. In addition, it is well-known that the detection of dopamine in biological samples is strongly interfered with by the presence of ascorbic acid and other metabolites such as serotonin, adrenalin, noradrenalin, and dopamine precursors (Guan-Ping et al., 2004; Xiang et al., 2007). The main purpose of our work is to demonstrate the increase of the oxidized species as a response of an oxidative-stressed state. This is important because the form of the I_c wave, extremely wide and not well-defined, indicates that there are more than one oxidized species causing this peak. The exact identification of the species involved in the I_a, I_{la}, and I_c peaks may be possible by the use of more specific electrodes. In future work we will try to resolve these peaks to identify all the species involved.

5. Conclusions

Repeated exposure to low doses of ozone produces a chronic-oxidative-stress state in biological systems, which per se is able to develop progressive dopaminergic neuronal death in the substantia nigra without other pathological factors.

The loss of the redox balance causes an increase in the oxidative metabolism of dopamine, which leads to increasing levels of oxidized dopamine contributing to a vicious cycle that increases the reactive species and produces a major formation of dopamine quinones.

Conflicts of interest

The authors report no conflicts of interest. The authors are responsible for the content and writing of the paper.

Funding

Dirección General de Apoyo al Personal Académico (IN2215408 to SR-A) UNAM CONACyT (49796-Q to MA-M). One of us (D.S.L.) thanks CONACyT-México for a doctoral fellowship (186567) and to Biomedical Sciences Doctoral Program. UNAM.

Acknowledgements

The authors thank Erika Jaramillo-Gonzalez and Donaji Rodríguez-Ortiz for their valuable help in the redaction of this paper and Gabino Borgonio-Perez for his technical supports. Thanks to Dr. Ellis Glazier for editing this English-language text.

References

- Aguilar, R., Dávila, M.M., Elizalde, M.P., Mattusch, J., Wennrich, R., 2004. Capability of a carbon-polyvinylchloride composite electrode for the detection of dopamine, ascorbic acid and uric acid. *Electrochim. Acta* 49, 851–859.

- Ayata, C., Ropper, A.H., 2002. Ischaemic brain oedema. *J. Clin. Neurosci.* 9, 113–124.
- Carvey, P.M., Zhao, C.H., Hendey, B., 2005. 6-Hydroxydopamine induced alterations in blood–brain barrier permeability. *Eur. J. Neurosci.* 22, 1158–1168.
- Faucheux, B.A., Bonnet, A.M., Agid, Y., Hirsch, E.C., 1999. Blood vessels change in the mesencephalon of patients with Parkinson's disease. *Lancet* 353, 981–982.
- Guan-Ping, J., Xiang-Qin, L., Jing-Ming, G., 2004. Novel choline and acetylcholine modified glassy carbon electrodes for simultaneous determination of dopamine, serotonin and ascorbic acid. *J. Electroanal. Chem.* 569, 135–142.
- Guan-Ping, J., Qun-Zhi, Ch., Yan-Feng, D., Jian-Bo, H., 2007. Electrochemistry behavior of adrenalin, serotonin and ascorbic acid at novel poly rutin modified paraffin-impregnated graphite electrode. *Electrochim. Acta* 52, 2535–2541.
- Hermida-Ameijeiras, A., Méndez-Alvarez, E., Sánchez-Iglesias, S., Sanmartín-Suárez, C., Soto-Otero, R., 2004. Autooxidation and MAO-mediated metabolism of dopamine as a potential cause of oxidative stress: role of ferrous and ferric ions. *Neurochem. Int.* 45, 103–116.
- Kortekaas, R., Leenders, K.L., van Oostrom, J.C., Vaalburg, W., Bart, J., Willemsen, A.T., Hendrikse, N.H., 2005. Blood–brain barrier dysfunction in parkinsonian midbrain in vivo. *Ann. Neurol.* 57, 176–179.
- Montine, T.J., Picklo, M.J., Amarnath, V., Whetsell Jr., W.O., Graham, D.G., 1997. Neurotoxicity of endogenous cysteinylcatechols. *Exp. Neurol.* 148, 26–33.
- Patel, B.A., Arundell, M., Parker, K.H., Yeoman, M.S., O'Hare, D., 2005. Simple and rapid determination of serotonin and catecholamines in biological tissue using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 818, 269–276.
- Pereyra-Muñoz, N., Rugerio-Vargas, C., Angoa-Pérez, M., Boronio-Pérez, G., Rivas-Arancibia, S., 2006. Oxidative damage in substantia nigra and striatum of rats chronically exposed to ozone. *J. Chem. Neuroanat.* 31, 114–123.
- Ramesh, P., Suresh, G.S., Sampath, S., 2004. Selective determination of dopamine using unmodified, exfoliated graphite electrodes. *J. Electroanal. Chem.* 561, 173–180.
- Ramsden, D.B., Parsons, R.B., Ho, S.L., Waring, R.H., 2001. The aetiology of idiopathic Parkinson's disease. *Mol. Pathol.* 54, 369–380.
- Rivas-Arancibia, S., Vazquez-Sandoval, R., Gonzalez-Kladiano, D., 1998. Effects of ozone exposure in rats on memory and levels of brain and pulmonary superoxide dismutase. *Environ. Res.* 76 (1), 33–39.
- Rivas-Arancibia, S., Guevara-Guzmán, R., López-Vidal, Y., Rodríguez-Martínez, E., Zanardo-Gomes, M., Angoa-Pérez, M., Raisman-Vozari, R., 2010. Oxidative stress caused by ozone exposure induces loss of brain repair in the hippocampus of adult rats. *Toxicol. Sci.* 113 (1), 187–197.
- Rivas-Arancibia, S., Dorado-Martínez, C., Boronio-Pérez, G., Hiriart-Urdanivia, M., Verdugo-Díaz, L., Duran-Vázquez, A., Colin-Baranque, L., Avila-Costa, M.R., 2000. Effects of taurine on ozone-induced memory deficits and lipid peroxidation levels in brains of young, mature, and old rats. *Environ. Res.* 82, 7–17.
- Schreibelt, G., Kooij, G., Reijkerk, A., van Doorn, R., Gringhuis, S.I., van der Pol, S., Weksler, B.B., Romero, I.A., Couraud, P.O., Piontek, J., Blasig, I.E., Dijkstra, C.D., Ronken, E., de Vries, H.E., 2007. Reactive oxygen species alter brain endothelial tight junction dynamics via RhoA, PI3 kinase, and PKB signaling. *FASEB J.* 21, 3666–3676.
- Siegel, S., 1991. Non-parametric statistics for the behavioral sciences. McGraw-Book, New York.
- Wightman, R.M., May, L.J., Michael, A.C., 1988. Detection of dopamine dynamics in the brain. *Anal. Chem.* 60, 769A–779A.
- Xiang, L., Lin, Y.L., Ping, Y., Su, L., Mao, L., 2007. Laccase-catalyzed oxidation and intramolecular cyclization of dopamine: a new method for selective determination of dopamine with laccase/carbon nanotube-based electrochemical biosensors. *Electrochim. Acta* 52, 4144–4152.
- Zlokovic, B.V., 2008. The blood–brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* 57, 178–201.