

03086  
7  
2ej



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE  
POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES  
CENTRO DE NEUROBIOLOGÍA

**PAPEL DE LA METALOTIONEINA EN UN MODELO  
EXPERIMENTAL DE LA ENFERMEDAD DE  
PARKINSON**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS

**P R E S E N T A :**

**PATRICIA ROJAS CASTAÑEDA**

ASESOR: LUIS CAMILO RÍOS CASTAÑEDA

MEXICO, D. F.:

1995

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## DEDICATORIAS

Este trabajo representa una etapa más de los esfuerzos de mis padres, quienes han sido un ejemplo en todos los aspectos de mi vida y que con su apoyo constante me han transmitido los valores de la vida, que por su educación y ejemplo ha constituido un apoyo constante a lo largo de mi carrera y que seguirá estando presente por siempre. Con respeto, cariño y admiración, Patricia.

A mis hermanos Felipe, Julio, Mónica, Carolina, Aída, Adolfo y Norma quienes han seguido los sabios ejemplos de mis padres y han formado parte importante en mi vida personal y académica.

Con especial cariño a mis sobrinos Iván, Alán, Jocelyn, Luis Daniel y Luis Felipe.

## **SUMMARY**

Active oxygen species are produced continuously in tissues by the action of the mitochondrial electron transport system and of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase. Support for the hypothesis that metallothionein isoforms participate in intracellular defense against reactive oxygen is derived from observations that substances causing oxidative stress, such as ethanol and iron, and agents involved in inflammatory processes, such as interleucine-1 and tumor necrosis factor alpha, induce the synthesis of metallothionein, suggesting that metallothionein may play a role in response to stress stimuli. In this thesis we evaluated metallothionein participation after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) administration, which is used as model of Parkinson's disease and generating oxidative stress in the brain. We found previous administration with metallothionein inducers as MnCl<sub>2</sub> (1 mg/ml), cadmium (1 mg/ml) and dexamethasone (5 mg/Kg) increased dopamine levels in corpus striatum by 40% (1 mg/Kg), 48% (at 5 days) and 43% (at 5 days) respectively as compared versus animals treated with MPTP only. MPTP treatment reduced striatal metallothionein concentration (49% versus control animals). Dexamethasone and cadmium increased metallothionein concentrations in MPTP-treated groups, by 77% and 82% respectively. Results suggest that metallothionein induction provide a significant resistance factor against the deleterious effect of MPTP.

## **AGRADECIMIENTOS**

**Expreso mi agradecimiento y admiración al Dr. Manuchair Ebadi quien por su dedicación, apoyo, experiencia ha estimulado aún más mi interés en la investigación sobre la enfermedad de Parkinson.**

**A mis amigos que me han brindado su apoyo y amistad.**

**Expreso mi agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo que me brindó para obtener el grado de Doctora en Ciencias Fisiológicas en la Universidad Nacional Autónoma de México. (BECA No. 77785-1)**

## **AGRADECIMIENTOS**

**Este trabajo fue realizado en el Departamento de Neuroquímica del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía de la Secretaría de Salud, institución a la que debo mi formación en el área de investigación.**

## **A MI JURADO:**

**Por sus valiosas sugerencias e ideas aportadas a este trabajo:**

**Dra. Sofía Yolanda Díaz Miranda**

**Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda**

**Dr. José Miguel Cervantes Alfaro**

**Dr. Mauricio Muñoz Díaz**

**Dr. Alfonso Carabez Trejo**

**Dr. Fructuoso Ayala Guerrero**

**Dr. Salvador Huitrón Reséndiz**



## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>SUMMARY</b> .....	2
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	3
<b>ANTECEDENTES</b>	
2. Anatomía de los ganglios basales .....	4
3. Enfermedad de Parkinson .....	4
4. Parkinsonismo inducido por la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) .....	6
4.1 Neurotoxicidad aguda de la MPTP .....	7
4.2 Neurotoxicidad crónica de la MPTP.....	9
4.3 Cambios patológicos en animales tratados con la MPTP.....	10
4.4 Metabolismo de la MPTP .....	11
4.5 Mecanismos de neurotoxicidad del ión 1-metil-4-fenilpiridino.....	16
5. Metalotioneína (MT) .....	17
5.1 Bioquímica de la MT.....	17
5.2 Composición de la MT .....	18
5.3 Estructura de la MT .....	19
5.4 Funciones de la MT .....	20
5.5 Descubrimiento de la MT en el cerebro .....	21

5.6 Composición de los aminoácidos de la MT de cerebro inducida por la administración de zinc .....	21
5.7 Localización celular de la MT en el cerebro de mamíferos.....	22
5.8 MT en el cerebro de los mamíferos en desarrollo .....	23
5.9 Expresión de la MT y resistencia a la toxicidad inducida por metales.....	24
5.10 La MT como agente atrapador de radicales libres.....	25
5.11 La MT como agente atrapador de radicales libres en un sistema de defensa antioxidante .....	26
5.12 Evidencias que no demuestran la acción atrapadora de la MT .....	27
5.13 Regulación de la MT del cerebro.....	28
<b>6.HIPOTESIS .....</b>	<b>29</b>
<b>7.OBJETIVOS .....</b>	<b>29</b>
<b>8.MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
<b>Primera parte</b>	
8.1 Pretratamiento con manganeso y administración con la MPTP.....	30
8.2 Pretratamiento con manganeso y administración con MPP+.....	30
8.3 Determinación del contenido de dopamina (DA) y ácido	

homovanílico (HVA) .....	31
8.4   Análisis de manganeso .....	32
8.5   Análisis estadístico .....	32
 <b>Segunda parte</b>	
9.1   Pretratamiento con inductores de la MT y administración de la MPTP .....	33
9.2   Determinación de la DA y el HVA .....	34
9.3   Estimación de la MT en el cuerpo estriado (CE).....	34
9.4   Análisis estadístico .....	35
 <b>10. RESULTADOS</b>	
10.1   Primera parte .....	35
10.2   Segunda parte .....	37
 <b>11. DISCUSION</b> .....	
 <b>12. CONCLUSIONES</b> .....	
 <b>13. REFERENCIAS</b> .....	

## **ANEXO**

### Artículos publicados o en revisión con resultados de la tesis

- 1- Rojas , Patricia and Ríos, Camilo (1995). Short-term manganese pretreatment partially protects against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 tetrahydropyridine neurotoxicity. *Neurochemical Research*. 20: 1217-1223.

- 2- Rojas, Patricia and Ríos, Camilo. Role of metallothionein in MPTP neurotoxicity. *Life Science* (en revisión).
- 3- Ebadi, M., Iversen, P.L., Hao, R., Cerutis, D.R., Rojas, P., Happe, K., Murrin, L.C. and Pfeiffer, R.F. (1995). Expression and regulation of brain metallothionein. *Neurochemistry International*. 26: 1-22.
- 4- Rojas, Patricia y Ríos, Camilo. (1994). Mecanismos de neurotoxicidad de la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina. *Archivos del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía*. (MEX) 9:73-77

## **RESUMEN**

La producción continua de las especies activas del oxígeno en los tejidos ocurre por acción del sistema de transporte de electrones de la mitocondria y de la NADPH entre otras fuentes. La participación de la metalotioneína en la defensa intracelular contra las especies reactivas del oxígeno es apoyada por estudios de la inducción de su síntesis por sustancias que causan la fuerza oxidativa, como el etanol, el fierro, agentes involucrados en los procesos inflamatorios como la interleucina-1 y el factor alfa de necrosis tumoral, sugiriendo que esta proteína puede ser importante en respuesta a un estímulo de estrés oxidativo. En la enfermedad de Parkinson se ha sugerido la participación de un mecanismo de daño celular que relaciona la formación de radicales libres del oxígeno y mecanismos de oxidación y se le ha denominado fuerza oxidativa. En este trabajo de tesis se evaluó la participación de la metalotioneína después de la administración de la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), usada como modelo experimental de la enfermedad de Parkinson y que causa fuerza oxidativa en el cerebro. En el modelo de la MPTP encontramos que la administración previa de inductores de la metalotioneína como el MnCl<sub>2</sub> (1 mg/ml), el cadmio (1 mg/ml) y la dexametasona (5 mg/ml) son capaces de incrementar los niveles de dopamina en el cuerpo estriado (CE) en 40%, 48% y 43%, respectivamente, cuando se compara con animales tratados con la MPTP. Esta neurotoxina redujo la concentración de la MT en el CE (49% comparado con el grupo control), en tanto que la dexametasona y el cadmio incrementaron las concentraciones de la metalotioneína en los grupos tratados con MPTP, en 77% y 82% respectivamente. Esos resultados sugieren que la inducción de la metalotioneína es un factor de resistencia contra el efecto dañino producido por la MPTP.

## **SUMMARY**

Active oxygen species are produced continuously in tissues by the action of the mitochondrial electron transport system and of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase. Support for the hypothesis that metallothionein isoforms participate in intracellular defense against reactive oxygen is derived from observations that substances causing oxidative stress, such as ethanol and iron, and agents involved in inflammatory processes, such as interleucin-1 and tumor necrosis factor alpha, induce the synthesis of metallothionein, suggesting that metallothionein may play a role in response to stress stimuli. In this thesis we evaluated metallothionein participation after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) administration, which is used as model of Parkinson's disease and generating oxidative stress in the brain. We found previous administration with metallothionein inducers as MnCl<sub>2</sub> (1 mg/ml), cadmio (1 mg/ml) and dexamethasone (5 mg/Kg) increased dopamine levels in corpus striatum by 40% (1 mg/Kg), 48% (at 5 days) and 43% (at 5 days) respectively as compared versus animals treated with MPTP only. MPTP treatment reduced striatal metallothionein concentration (49% versus control animals). Dexamethasone and cadmium increased metallothionein concentrations in MPTP-treated groups, by 77% and 82% respectively. Results suggest that metallothionein induction provide a significant resistance factor against the deleterious effect of MPTP.

## **1. INTRODUCCION**

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

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

Se ha propuesto que la deficiencia de dopamina que se presenta en este desorden produce aceleración de la tasa de síntesis de la dopamina en las neuronas que sobreviven, produciendo un exceso de  $H_2O_2$ , que llega a convertirse en radicales hidroxilo, los cuales pueden actuar como neurotoxinas causando estrés oxidativo en las neuronas del cuerpo estriado que sobreviven (Dexter, D.T. et al., 1989).

Aunque los mecanismos de defensa, como el glutatión y la glutatión peroxidasa son antioxidantes importantes en el organismo, se desconoce su mecanismo de acción en el cerebro. También se ha propuesto que la proteína metalotioneína además de ser importante en diferentes funciones fisiológicas actúa como atrapador de radicales libres y como agente antioxidante.

La enfermedad de Parkinson se ha asociado a la fuerza oxidativa que indica la formación de radicales libres del oxígeno y mecanismos de oxidación. Por otro lado, la metalotioneína es capaz de prevenir la formación de radicales libres. Por lo tanto, en este trabajo se evaluó si la alteración en las neuronas dopaminérgicas del cuerpo estriado producida por la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), relacionada con la fuerza oxidativa, puede afectar los niveles de la metalotioneína en este modelo experimental de la enfermedad de Parkinson.

# **A N T E C E D E N T E S**

## **2. ANATOMIA DE LOS GANGLIOS BASALES**

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

La sustantia nigra (constituída por la pars compacta y la pars reticulata) y el núcleo subtalámico localizados en el mesencéfalo están estrechamente asociados con los ganglios basales.

El cuerpo estriado (CE) desempeña diversas funciones que involucran la integración sensorial, la percepción y el aprendizaje (Divac, I and Oberg, R., 1982).

Las alteraciones producidas en el CE producen discinesia, balismo, corea de Huntington y enfermedad de Parkinson (EP), entre otras. En la clínica neurológica el término ganglios basales se restringe a los componentes del CE.

## **3. ENFERMEDAD DE PARKINSON**

La EP fue caracterizada por James Parkinson en 1817 y se describió como un síndrome que se presenta entre la quinta ó sexta década de la vida. Los síntomas y signos predominantes son el temblor en reposo, rigidez muscular y bradicinesia. Este desorden está asociado con la pérdida de las neuronas pigmentadas de la pars compacta de la sustantia nigra. Los axones de estas células nerviosas se conectan con otras neuronas de la materia gris de los dos hemisferios cerebrales, en el llamado CE. Estas células contienen el neurotransmisor dopamina (DA) (Fuxe, K. and Andén, N-E., 1966; Bedard, P., et al., 1969) y su deficiencia produce los síntomas

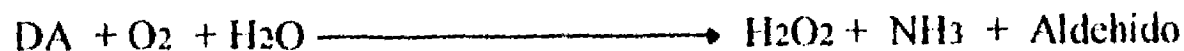


del parkinsonismo. En la EP están lesionados varios núcleos del cerebro que incluyen el locus coeruleus (Mann, D. and Yates, P.O., 1983), el núcleo del rafe dorsal (Jellinger, K. et al., 1983), el núcleo basalis de Meynert (Foix, C. and Nicolesco, J., 1925) y los sistemas dopaminérgicos que incluyen las vías nigroestriatal (Bernheimer, H. et al., 1973), mesocorticolímbica (Scatton, B. et al., 1983) e hipotalámica (Javoy-Agid, F. et al., 1984a). Los datos bioquímicos indican que no todos los sistemas dopaminérgicos del sistema nervioso central están dañados en la EP.

La disminución de DA en los núcleos caudado y putamen en la EP es del 80-90%, en el núcleo acumbens, corteza cerebral e hipotálamo es de 50-60% indicando que la vía nigroestriatal es la más dañada en la enfermedad. Esta lesión producida en la vía nigroestriatal (en particular el caudado es el más afectado comparado con otros sistemas dopaminérgicos), puede explicar la sintomatología que se presenta cuando hay deficiencia de ese neurotransmisor. En esta vía, la lesión más importante es en las neuronas dopaminérgicas de la pars compacta de la sustancia nigra, que degeneran causando una disminución severa de la DA en el CE.

Ha sido reconocido que para que se manifiesten los síntomas del parkinsonismo debe de presentarse una disminución de 70-80% de las neuronas de la sustancia nigra y de la DA en el CE (Birkmayer, W. and Riederer, 1983).

Aunque los factores responsables de la disminución de las neuronas dopaminérgicas de la vía nigroestriatal en la EP no están totalmente entendidos, los estudios neuroquímicos de animales lesionados (Hefti, F. et al., 1980) y los estudios *postmortem* en pacientes con EP (Hornykiewicz, O. and Kish, S., 1987) sugieren que las neuronas dopaminérgicas que sobreviven incrementan su tasa de síntesis de DA generando el peróxido de hidrógeno, que a su vez promueve la formación de radicales libres de acuerdo a la siguiente reacción propuesta (Cohen, G., 1988):



Las reacciones oxidativas pueden contribuir a la patogénesis de la EP (Dexter, D. et al., 1989).

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

Experimentalmente las neuronas de la sustancia nigra pueden deteriorarse por diversas causas como la exposición a ciertos metales (Mena, I. et al., 1967), virus que causan infecciones (Jellinger, K., 1987), entre otros.

Para el estudio de los mecanismos etiológicos de la EP se han desarrollado varios agentes químicos que destruyen selectivamente las neuronas dopaminérgicas. El hallazgo más importante en este campo es el de la neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) porque es el que se asemeja más a lo que ocurre en la EP idiopática.

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

La MPTP produce síntomas clínicos y patología muy similar a la EP (Davis, G.C. et al., 1979; Langston, J. et al., 1983). Esta neurotoxina se produjo y distribuyó como un contaminante intermediario químico de una droga de abuso producida ilícitamente, el 1-metil-4-fenil-propionoxiperidino (MPPP) que se forma por la deshidratación de un precursor de este compuesto. Los adictos a las drogas que se inyectaron esta meperidina sintética que contenía MPTP presentaron un síndrome

parkinsoniano permanente (Davis, G.C., 1979; Langston, J. et al., 1983). Ninguno de esos individuos presentó demencia, pero se observaron cambios intelectuales similares a los que se presentan en los pacientes con la EP (Stern, Y. and Langston, J.W., 1985). En otro grupo expuesto a la MPTP pero asintomático, se observaron cambios neuropsicológicos menores (Stern, Y. et al., 1986), así como disminución en el contenido de DA en el CE (Calne, D.B. et al., 1985), sugiriendo que la fase preclínica puede existir en esos individuos.

En la enfermedad idiopática hay variaciones de paciente a paciente, algunos presentan temblor persistente, acinesia o rigidez predominante. Esta variación individual presenta otro paralelo entre el parkinsonismo inducido con la MPTP y la EP (Langston, J. et al., 1983).

Desde el punto de vista patológico la MPTP produce un daño localizado en el sistema dopaminérgico de la vía nigroestriatal, como el descrito en el Parkinson idiopático.

Los síntomas y signos clínicos de la intoxicación por la MPTP en pacientes es semejante a lo observado en la EP, por lo que es justificable que sea usado como un modelo animal de la enfermedad.

Se ha encontrado que esta neurotoxina produce un modelo similar a la EP cuando se administra al mono (Burns, R.S. et al., 1983; Langston, J.W. et al., 1984a) y al ratón (Heikkila, R.E. et al., 1984).

## **4.1 NEUROTOXICIDAD AGUDA DE LA MPTP.**

### **a) Efectos en el comportamiento**

La administración de la MPTP a las ratas produce cambios agudos en la conducta (Davis, G.C. et al., 1979) incluyendo patrones de comportamiento relacionados con

el sistema serotoninérgico (Chiueh, C.C. et al., 1984), que pueden revertirse con la administración de un antagonista de la serotonina, la metisergida.

Las dosis repetidas de la MPTP a ratones (más de 50 mg/Kg) producen inmovilidad transitoria, sin diferencias en la actividad motora después de la recuperación de los efectos iniciales. En el mono, se presentan temblores agudos, cambios posturales (incluyendo cola erecta), movimiento rotatorio de los ojos y actividad similar a la EP idiopática (Burns, R.S., et al., 1983; Langston, J.W., et al., 1984), que probablemente no incluya el temblor en reposo. En el mono y en el humano, el síndrome parkinsoniano es seguido de una recuperación parcial del comportamiento, sensación de quemadura en el sitio de inyección, sabor medicinal o metálico, visión borrosa, oscura y alucinaciones ocasionales (Davis, G.C. et al., 1979; Ballard, P.A. et al., 1985).

## **b) Efectos bioquímicos**

Los cambios bioquímicos agudos después de la administración de la MPTP están relacionados con el metabolismo periférico y central de las catecolaminas (Chiueh, C.C. et al., 1984), presentándose disminución de las catecolaminas arteriales y cardíacas en ratas y ratones (Fuller, R.W. et al., 1984).

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

El análisis de las catecolaminas en el líquido cefalo-raquídeo del mono Rhesus muestra una reducción en el contenido de ácido homovanílico (HVA), ácido 5-hidroxiindolacético y 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol después del primer día de administración de la MPTP, efecto que permanece durante varias semanas (Burns, R.S. et al., 1983).

## **4.2 NEUROTOXICIDAD CRONICA DE LA MPTP**

### **a) Efectos en el comportamiento**

Los efectos crónicos de la MPTP son similares en varias especies sin embargo, se presentan diferencias en las manifestaciones y en la vulnerabilidad a los efectos tóxicos crónicos. En primates, como el mono Rhesus (Burns, R.S. et al., 1983), el mono ardilla (Langston, J.W. et al., 1984) y el tití (Jenner, P. et al., 1984), el síndrome se desarrolla entre 3 días a 3 semanas, agravándose la bradicinesia, la rigidez, los episodios de inmovilidad y el temblor. La variabilidad en el deterioro motor que se presenta esta relacionado con la disminución del 80% de las neuronas dopaminérgicas, responsable de la producción de los cambios en la conducta.

### **b) Efectos bioquímicos**

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

En el ratón (Heikkila, R.E. et al., 1984; Hallman, H. et al., 1984; Melamed, E. et al., 1985a), se produce disminución severa de la DA cerebral durante un periodo largo de tiempo.

En diferentes cepas de ratón, las lesiones no se limitan al sistema nigroestriatal sino que están disminuídos el contenido de DA en el núcleo accumbens (Jacobowitz, D.M. et al., 1984), NE en el CE y en la corteza frontal (Heikkila, R. et al., 1984). Sin embargo, hay recuperación de las catecolaminas en el cerebro hasta alcanzar los valores normales (Hallman, H. et al., 1984).

### **4.3 CAMBIOS PATOLOGICOS EN ANIMALES TRATADOS CON LA MPTP**

Los humanos que desarrollaron parkinsonismo inducido por la MPTP presentaron destrucción extensa de las neuronas de la sustantia nigra, disminución de la neuromelanina y una sola inclusión eosinófila intracitoplásmica, similar al cuerpo de Lewy, no observándose cambios en las células del locus coeruleus.

El parkinsonismo inducido en el mono Rhesus después de administraciones intravenosas repetidas de la MPTP, produce disminución casi completa de la DA en las neuronas dopaminérgicas de la sustantia nigra en su pars compacta (Jacobowitz, D.M. et al., 1984), degeneración de las fibras terminales dopaminérgicas en el CE. Las células del área ventral tegmental A10, sus proyecciones al núcleo accumbens y el tubérculo olfatorio presentan daños cuatro meses después de la administración de la MPTP.

En el mono ardilla (5-20 años) hay lesiones patológicas adicionales en el locus coeruleus, que parecen cuerpos de Lewy (Forno, L.S. et al., 1988) y se han

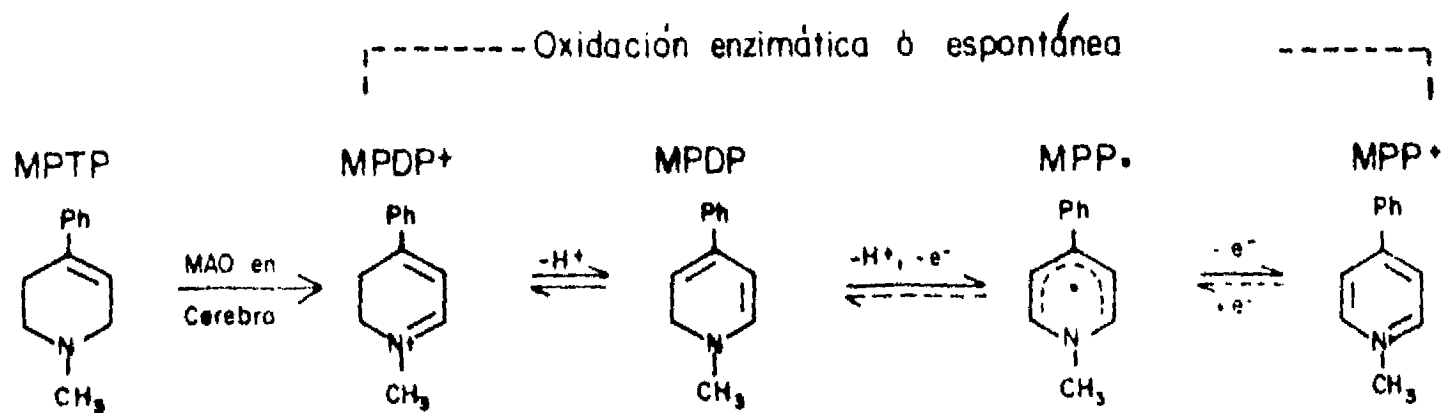
localizado en el bulbo, núcleo basalis de Meynert, sustancia nigra, locus coeruleus y núcleo del rafe dorsal en la EP (Forno, L.S. et al., 1986).

#### **4.4 METABOLISMO DE LA MPTP**

La MPTP es un compuesto soluble en los lípidos que fácilmente penetra las membranas, incluyendo la barrera hematoencefálica de monos y ratones (Markey, S. et al., 1984). Después de su administración, la MPTP es convertida al ión 1-metil-4-fenilpiridino (MPP<sup>+</sup>) (Langston, J. et al., 1984; Johannessen, J. et al., 1985), que se forma en todos los tejidos incluyendo el cerebro. La conversión enzimática de la MPTP a MPP<sup>+</sup> (Chiba, K. et al., 1984; Irwin, J. and Langston, J. 1985) se lleva a cabo por la enzima monoaminoxidasa (MAO) tipo B (Chiba, K. et al., 1984; Arora, P. et al., 1988). El efecto protector de los inhibidores de la MAO-B sobre la toxicidad de la MPTP indica que la biotransformación a MPP<sup>+</sup> es necesaria para que ocurra el daño celular (Langston, J. et al., 1984).

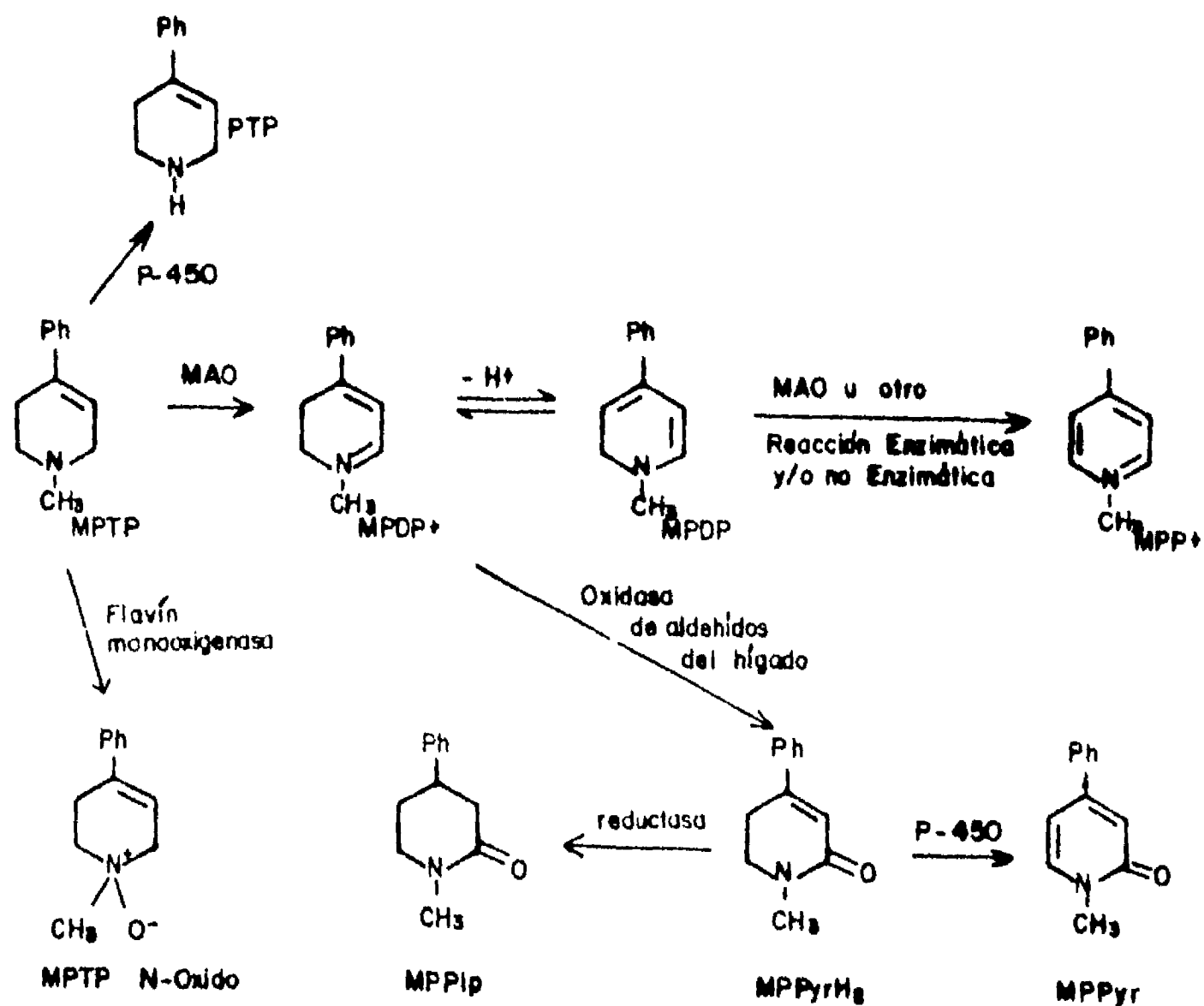
La oxidación de MPTP a MPP<sup>+</sup> ocurre en 2 pasos (figura 1) siendo el 1-metil-4-fenil-3,4-dihidropiridino (MPDP<sup>+</sup>) un intermediario que se transforma de manera espontánea en MPDP y MPP<sup>+</sup> o por la acción subsecuente de la MAO.

El metabolismo de la MPTP en otros tejidos, como el hígado, involucra dos vías adicionales (figura 2): 1) Conversión a MPTP N-óxido por la enzima flavin monooxigenasa (Chiba, K. et al., 1988) y en menor grado, 2) N-desmetilación por citocromo P-450 a 4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropirina (PTP) (Weissman, J. et al., 1985). La mayor parte del MPDP<sup>+</sup> generado en el hígado por la MAO es convertido por acción de la enzima aldehído oxidasa a 1-metil-4-fenil-5,6-dihidro-2(1H)-piridinona (MPPyrH<sub>2</sub>) (Arora, P. et al., 1988) que puede oxidarse por citocromo P-450 (Wu, E. et al., 1988) a 1-metil-4-fenil-2(1H) piridinona (MPPyr) (Arora, P. et al., 1988; Wu, E. et al., 1988) y reducirse a 1-metil-4-fenil-2-piperidinona (MPPip) (Arora, P.



**FIGURA 1.** Oxidación de la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) al ión 1-metil-4-fenilpiridino (MPP<sup>+</sup>), formándose como compuestos intermediarios el ión 1-metil-4-fenil-3,4-dihidropiridino (MPDP<sup>+</sup>), MPDP y radical MPP (MPP•) (tomado de Sayre, 1989).





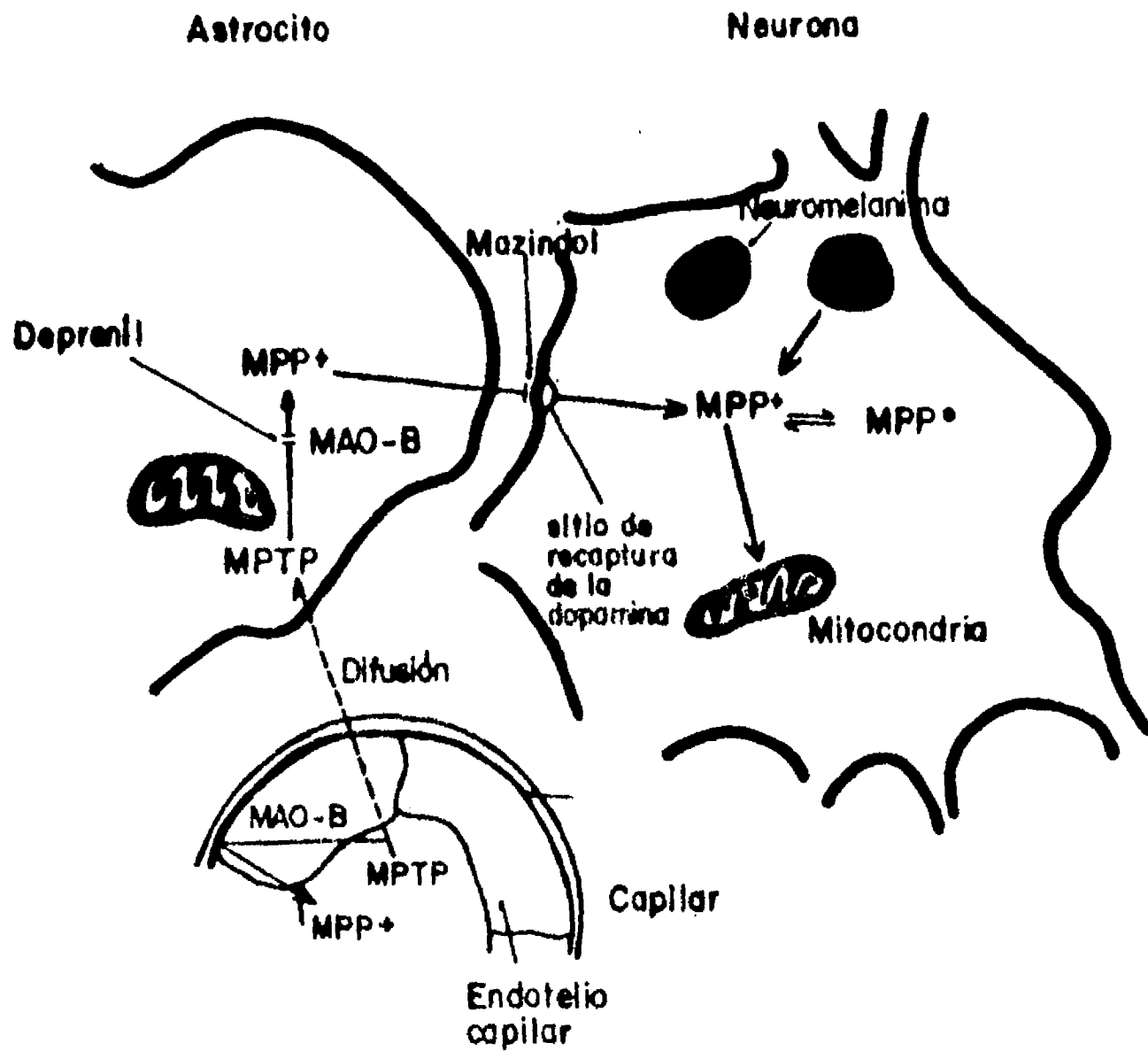
**FIGURA 2.** Metabolismo de la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) en el hígado formándose diferentes metabolitos que incluyen MPTP-N-oxido, 4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (PTP), el ión 1-metil-4-fenil-3,4-dihidropiridina (MPDP+), el ión 1-metil-4-fenilpiridino (MPP+), el 1-metil-4-fenil-5,6-dihidro-2 (1H)-piridinona (MPPyrH<sub>2</sub>), 1-metil-4-fenilpiridinona (MPPyr), el 1-metil-4-fenilpiperidinona (MPPip) (tomado de Sayre 1989).

et al., 1988). Ninguno de esos metabolitos produce toxicidad neurológica o general. A nivel periférico el metabolismo de la MPTP actúa como un mecanismo detoxificante (Chiba, K. et al., 1988).

La localización de la MAO-B puede ser determinante de la toxicidad de la MPTP. Sin embargo, esta enzima no se encuentra en gran proporción en las neuronas dopaminérgicas (figura 3), sino que predomina en las neuronas serotoninérgicas (Westlund, K. et al., 1985; Nakamura, S. and Vincent, S., 1986), en los astrocitos (Javitch, J. et al., 1985; Mytilineou, C. and Friedman, L., 1988) y en las paredes de los vasos sanguíneos de algunas especies.

Si la MAO-B está en altas concentraciones en los capilares o en los vasos sanguíneos, fuera de la barrera hematoencefálica, la conversión de MPTP a MPP+ en este sitio puede limitar la entrada de la toxina al cerebro.

El MPP+ es un compuesto polar que difunde con dificultad a través de las membranas lipídicas, sin embargo, sale de las neuronas serotoninérgicas y de los astrocitos para concentrarse selectivamente a través del sistema de recaptura de la dopamina en las neuronas dopaminérgicas (Chiba, K. et al., 1985; Javitch, J. et al., 1985; Schinelli, S. et al., 1988) donde es secuestrado (Markey, S. et al., 1984; Kopin, Y., 1986), localizándose en las vesículas con la dopamina (Keller, H. and Da Prada, M., 1985), concentrándose en la mitocondria (Ramsay, R. and Singer, T., 1986) o uniéndose con alta afinidad a la neuromelanina que está presente en los cuerpos neuronales de los mamíferos superiores (D'Amato, R. et al., 1987). Los inhibidores del sistema de recaptura de la DA (por ejemplo, el mazindol) evitan el daño a las neuronas dopaminérgicas (Javitch, J. et al., 1985) indicando que este paso es importante para la toxicidad.



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

## **4.5 MECANISMOS DE NEUROTOXICIDAD DEL ION 1-METIL-4-FENILPIRIDINO (MPP+)**

El MPP+ es una toxina potente en células mesencefálicas en cultivo (Mytilineou, C. et al., 1985) y en hepatocitos (DiMonte, D. et al., 1986; Smith, M. et al., 1987; DiMonte, D. et al., 1988). La administración directa del MPP+ en diferentes áreas del cerebro (Heikkilä, R. et al., 1985; Sayre, L. et al., 1986; Harik, S. et al., 1987; Gibb, W. et al., 1988) ejerce efectos neurotóxicos a largo plazo. Estos hallazgos han conducido a que el MPP+ se considere el responsable de la toxicidad de la MPTP. Sin embargo, los mecanismos de toxicidad celular debidos al MPP+ se desconocen, aunque se han propuesto una serie de hipótesis al respecto que a continuación se mencionan.

El MPP+ es tomado in vitro por la mitocondria, conduciendo a altas concentraciones del MPP+ en ese organelo (Ramsay, R. and Singer, T. 1986). Posteriormente, la sustancia tóxica es capaz de inhibir la oxidación de sustratos ligados a las NADH deshidrogenasas por la mitocondria (Nicklas, W. et al., 1985; Ramsay, R. et al., 1987). Esos resultados sugieren que el metabolismo del MPP+ in vivo puede ser atribuido a la inhibición de las funciones mitocondriales y la subsecuente disminución del ATP (Mizuno, et al., 1988). Adams y Odunze (1991) han señalado que esta inhibición reversible de la respiración mitocondrial por el MPP+ puede producir toxicidad limitada. Esta hipótesis es fundamentada con los hallazgos de la disminución transitoria del ATP después de la administración de la MPTP (Mizuno et al., 1988). Esto sugiere la existencia de un segundo mecanismo de daño celular que actúa en adición a la toxicidad mitocondrial y que puede explicar los efectos del MPP+ a largo plazo.

La MPTP es capaz de inducir la generación de radicales libres del oxígeno in vitro (Poirier, J. and Barbeau, A. 1985) quizás por interacción con el citocromo P-450 (Sinha, B. et al., 1986), además reduce las defensas antioxidantes endógenas contra los radicales libres (Ferraro et al., 1986). Esos resultados sugieren que la fuerza oxidativa puede producir daño celular después de la administración de la MPTP (Adams, J. and Odunze, I., 1991).

El MPP+ es capaz de incrementar la peroxidación de lípidos in vitro (Ríos, C. and Tapia, R. 1987) e in vivo (Rojas, P. and Ríos, C., 1993) un proceso que resulta del ataque de los radicales libres a los ácidos grasos poliinsaturados. Recientemente se ha reportado que la deficiencia de la vitamina-E en ratones administrados con la MPTP incrementa los dienos conjugados en el mesencéfalo (Adams, J. et al., 1990). Este resultado sugiere que la peroxidación de lípidos puede ser un mecanismo de neurotoxicidad de la MPTP in vivo.

Por otra parte, la participación de una proteína llamada metalotioneína (MT) es importante para el estudio de la neurotoxicidad de la MPTP, porque esta asociada con la resistencia a varias formas de fuerza oxidativa.

## **5.0 METALOTIONEINA**

### **5.1 BIOQUIMICA DE LA METALOTIONEINA**

La MT fue descubierta en 1957 por Margoshes, M. y Vallee, B. en el riñón del caballo, como una proteína responsable de la acumulación del cadmio (Kägi, J. and Schäffer, A. , 1988; Vallee, B. and Falchuk, K., 1993).

Por otro lado, los organismos han desarrollado mecanismos para utilizar los elementos traza esenciales como el zinc (Zn) y el cobre (Cu), así como disminuir la

citotoxicidad de iones de metales de transición que no son esenciales, como el cadmio (Cd) y el bario (Ba). La capacidad de unir el exceso de metales y limitar la concentración de iones libres es principalmente realizada por polipéptidos ricos en cisteína, como el péptido gama-glutamil (fitoquelatina) encontrado en plantas y las metalotioneínas encontradas en animales (Hamer, D., 1986; Bremner, Y., 1987; Bremner, Y. and Beattie, J., 1990; Vallee, B. and Falchuk, K., 1993).

## **5.2 COMPOSICION DE LA METALOTIONEINA**

Las metalotioneínas no tienen funciones enzimáticas conocidas y se han clasificado de acuerdo a las siguientes características: alto contenido de metales pesados (típicamente de 4-12 átomos/molécula) unidos exclusivamente por grupos tiol; elevado contenido de cisteína (típicamente 23-33 mol); residuos de aminoácidos hidrofóbicos, carencia de aminoácidos aromáticos; bajo peso molecular (típicamente menos de 10,000 Da) (Hamer, D., 1986).

Los vertebrados examinados hasta el momento contienen 2 o más isoformas de la MT, agrupadas en 2 clases denominadas MT-I y MT-II. En muchos casos, cada clase consiste de diferentes isoproteínas que se han designado como MT-IA, MT-IB, MT-IC, etc. La clasificación de la proteína, está en relación a su homología funcional. Recientemente se ha identificado la MT-III, una MT específica del cerebro, que no es expresada en los tejidos periféricos (Uchida, Y., et al., 1991; Palmiter, R., et al., 1992) y la MT-IV, expresada en muchos tejidos que contienen células del epitelio escamoso estratificado (Quaife, C. et al., 1994).

### **5.3 ESTRUCTURA DE LA METALOTIONEINA**

La MT de los mamíferos es un péptido de 61 o 68 aminoácidos que contiene 20 cisteínas, 6-8 lisinas, 7-10 serinas, una sola metionina acetilada en un amino terminal y ausencia de aminoácidos aromáticos.

La mayoría de los residuos de cisteína están presentes en secuencias de Cys-X-Cys y Cys-Cys. El contenido de metales de la MT purificada es muy variable y depende del organismo, tejido e historia de la exposición a los metales pesados. Por ejemplo, la MT aislada de hígado de humano contiene predominantemente zinc (Zn), mientras la MT de riñón tiene niveles sustanciales de Cd y Cu. Esas diferencias probablemente reflejan la exposición natural a los metales y la expresión de diferentes isoformas de la MT.

La MT analizada de organismos que han sido experimentalmente expuestos a determinado metal contendrá predominantemente el metal administrado. Por ejemplo, la MT-II de hígado de ratas tratadas con cadmio contiene 5 átomos de cadmio y 2 de Zn.

Los metales de la MT están unidos a la proteína a través de uniones con el grupo tiol de los 20 residuos de cisteína. Los metales pueden removerse de la MT por la exposición a un pH bajo produciendo una apotioneína que puede reconstituirse con 7 átomos de zinc.

La distribución del Zn en la MT es en 2 grupos polinucleares. El grupo A contiene 11 cisteínas que unen 4 átomos de Zn con un dominio alfa-carboxiterminal extendiéndose desde el aminoácido 31 al 61. El grupo B contiene 9 cisteínas, une 4 átomos de zinc y está contenido en el dominio B del amino terminal extendiéndose desde el aminoácido 1 al 30 (Hamer, D., 1986; Kay, J., et al., 1991).

## **5.4 FUNCIONES DE LA METALOTIONEINA**

El mecanismo exacto de protección de la MT contra la fuerza oxidativa se desconoce. Sin embargo, la MT es capaz de atrapar los radicales hidroxilo in vitro (Thornalley and Vasak, 1985). Esta función puede involucrar las ramas del grupo tiol y del metal sin embargo, el daño molecular a la MT no puede ser reparado por glutatión reducido. Por otro lado, la MT puede disminuir la peroxidación de lípidos (Thomas, J., et al., 1986) así como liberar el cobre y donarlo a las enzimas que protegen contra la fuerza oxidativa (Bremner, Y., 1987).

La MT esta relacionada con la homeostasis de varios metales fisiológicos (Cousins, R., 1983), en la quelación y detoxificación de metales pesados (Goering, P. and Klaassen, C., 1984) así como una función antioxidante (Thomas, J., et al., 1986; Hidalgo, J., et al., 1988).

La MT se ha utilizado como un biomarcador en la formación de tumores fetales (Nartey, N., et al., 1987; Kontozoglou, T., et al., 1989), teratogénesis (Muñoz, B., et al., 1989), disfunción renal y daño tubular (Sugihira, N., et al., 1986; Shaikh, Z., et al., 1990) así como de exposición ambiental a los metales pesados (Shaikh, Z., et al., 1989; Hogstrand, C., et al., 1991).

Las Mts de los mamíferos son inducibles en respuesta a una gran variedad de estímulos que incluyen metales pesados (Karin, et al., 1980), glucocorticoides (Karin, et al., 1981; Karin, et al., 1980a), endotoxinas bacteriales (Durnam, D. et al., 1984; Abe et al., 1987), estrés (Oh, S., et al., 1978) y algunos compuestos químicos (Kotsonis, F. and Klaassen, C.D., 1979). Estos efectos son mediados a través de diferentes promotores y factores de transcripción.



## **5.5 DESCUBRIMIENTO DE LA METALOTIONEINA EN EL CEREBRO**

En 1983 Itoh y colaboradores descubrieron en el cerebro de la rata una proteína de peso molecular bajo que une Zn y su expresión es inducible con la administración intracerebroventricular de sulfato de Zn (Ebadi, M., 1984). Esta proteína fue nombrada metalotioneína (MT).

El descubrimiento de esta se llevó a cabo cuando se estudiaba la asociación entre las sacudidas convulsivas y la enfermedad de Pick, un raro desorden neurológico producido por la acumulación elevada de Zn en el hipocampo.

## **5.6 COMPOSICION DE LOS AMINOACIDOS DE LA METALOTIONEINA DE CEREBRO INDUCIDA POR LA ADMINISTRACION DE ZINC**

La MT en el hígado y cerebro tiene diferentes isoformas, la MT-I y la MT-II con 60 y 61 residuos de aminoácidos respectivamente. Sin embargo, las isoformas de la MT-I y la MT-II de cerebro tienen 17 y 18 residuos de cisteína respectivamente. Estos valores varían ligeramente de 21 residuos de cisteína reportados para la MT-II hepática de humano (Kissling, M. and Kägi, J., 1977) a 21 residuos de cisteína de la MT de riñon de caballo (Kissling, M. and Kägi, J., 1977), 17 y 21 residuos de cisteína de las isoformas de la MT de hígado de rata (Wong, K. and Klaassen, C.D., 1979); de 20 y 21 residuos de cisteína para las isoformas de la MT de hígado de la rata (Winge, D., et al., 1984), 19 y 20 residuos de cisteína para las isoformas de la MT de hígado de feto de bovino (Monger, K., et al., 1985). Sin embargo, se han

reportado 14 residuos de cisteína para la MT-I de crustáceos (Olafson, R., et al., 1979). En adición, las isoformas de la MT de cerebro contienen una cantidad mayor de ácido aspártico y ácido glutámico en comparación con la MT hepática.

La composición de aminoácidos de la MT-II en el cerebro de animales que fueron tratados con Zn es similar pero no idéntica a la composición presente en cerebros de animales a los que no se les indujo la MT (Saijoh, K., et al., 1989), sugiriendo que el metal altera la composición de la MT (Andersen, R., et al., 1989; Saijoh, K., et al., 1994).

## **5.7 LOCALIZACION CELULAR DE LA METALOTIONEINA EN EL CEREBRO DE MAMIFEROS**

La localización celular de la MT se ha descrito en el cerebro de los mamíferos (Nakajima, K., et al., 1989; Young, J. et al., 1991; Nishimura, N., et al., 1992; Blaauwgeers, H., et al., 1993, 1994) de la siguiente manera.

Los estudios inmunohistoquímicos de la MT en el ratón indican su presencia en las células endocelulares, elementos gliales, aracnoides y piamadre (Nishimura, N., et al., 1992). En la rata joven la inmunotinción es mayor en el epéndimo, epitelio de los plexos coroides, piamadre y aracnoides (Nishimura, N., et al., 1992). En la rata adulta la distribución de la MT es principalmente en las células endocelulares, plexos coroides, vasos sanguíneos (Nakajima, K., et al., 1989) y en astrocitos (Young, J., et al., 1991; Young, J., 1994). La inmunoreactividad de la MT en el mono está presente en la piamadre, células endocelulares y en los astrocitos (Suzuki, K., et al., 1992, a). En el humano la distribución es mayor en los astrocitos (Uchida, Y., et al., 1991; Blaauwgeers, H., et al., 1994). La MT también ha sido identificada en el

citoplasma, axones y procesos dendríticos de las neuronas motoras en la médula espinal ventral.

## **5.8 METALOTIONEINA EN EL CEREBRO DE LOS MAMIFEROS EN DESARROLLO**

Existe variación ontogénica en la concentración de la MT en el cerebro de la rata (Ebadi, M., 1986b). Las concentraciones de zinc en el cerebro, hipotálamo y CE son mayores a los 20 días después del nacimiento y disminuyen posteriormente.

La concentración de MT incrementa en el cerebro después del nacimiento de manera continua desde 0.2  $\mu\text{g}$  en un día a 3.60  $\mu\text{g}$  de Zn/mg de proteína 50 días después del nacimiento. El incremento en la concentración de la MT después del nacimiento no está relacionado con una concentración baja de la proteína durante el periodo prenatal (Ebadi, M., 1986b). La MT no se ha detectado en las células gliales del cerebro de fetos, pero sí en las células gliales del cerebro de animales adultos.

Las concentraciones de las proteínas que unen Zn en los tejidos de mamíferos en desarrollo se incrementa, decrece o no se altera. Por ejemplo, la concentración de la MT se incrementa en el cerebro y el nivel de tioneína de Zn se incrementa en los testículos de ratas en desarrollo. Las concentraciones de la MT hepática son altas en el hígado de fetos, neonatos, en tanto que declina en el humano adulto. El nivel elevado de la MT hepática durante los periodos fetal y neonatal puede participar en el almacén, donación y utilización de elementos esenciales, como el Zn y posiblemente el Cu, para el metabolismo de los ácidos nucleicos, síntesis de proteínas y otros procesos metabólicos durante un periodo rápido de diferenciación.

La concentración de la MT de riñón no tiene alteración durante los periodos prenatal y postnatal.

Son muchos y diversos los factores que regulan la síntesis de la MT en los diferentes órganos durante los periodos prenatal y neonatal, entre otros. Durante el periodo neonatal, el requerimiento por el Zn es alto, la síntesis de la MT puede estar sujeta al control hormonal y ser menos dependiente de la influencia del Zn. Sin embargo, en la rata adulta, cuando la demanda por el Zn disminuye, la síntesis de la MT puede estar influenciada por el Zn y así la MT podría funcionar para mantener la homeostasis del Zn (ver Ebadi, M., 1986b y las referencias citadas en ese artículo).

## **5.9 EXPRESION DE LA METALOTIONEINA Y LA RESISTENCIA A LA TOXICIDAD INDUCIDA POR METALES**

Un incremento transitorio en la tolerancia a los metales por las células eucarióticas puede ser inducido por el pretratamiento con concentraciones subletales de ciertos iones de metales. Esta tolerancia coincide con la capacidad de unión de los metales a las células debido a la inducción del gen de la MT (Karin, M. and Richards, R., 1982; Peterson, M. and Mercer, J., 1988; Gupta, A., et al., 1993). Una tolerancia más estable puede ser producida por la exposición de los cultivos celulares a los metales. Esta tolerancia está asociada con un incremento del RNA mensajero de la MT y de la proteína (Palmiter, R., 1987).

La función protectora de la MT contra los efectos tóxicos de los metales, se analiza en sistemas incapaces de sintetizar la MT. Por ejemplo, se ha mostrado (Ebadi, M., et al., 1989b) que las células IMR-32 de neuroblastoma son menos tolerantes a la toxicidad del Cd y el Zn que las células de hígado. Se encontró que

este fenómeno está directamente relacionado a la capacidad inherente de esas células de inducir la MT.

## **5.10 LA METALOTIONEINA COMO AGENTE ATRAPADOR DE RADICALES LIBRES**

El mecanismo de acción de la MT para atrapar los radicales libres del oxígeno no es claro. Thornalley y Vasak (1985) sugirieron que los residuos de la cisteína, particularmente los grupos tiol de la MT, son el blanco primario de la reacción de los radicales hidroxilo con las proteínas, que tiene sitios múltiples para atacar los radicales hidroxilo. Sin embargo, Thomas y col. (1986) argumentan que la determinante primaria de la protección de la MT es la liberación del Zn y su captura posterior por la membrana (Thomas, J.P. et al., 1986), porque se ha descubierto que el zinc protege contra la peroxidación de lípidos y estabiliza las membranas (Chvapil M. et al., 1972). El Zn liberado puede suprimir la peroxidación de lípidos a través de diferentes funciones como la captura del hierro (Fe), inhibición de la NADPH-citocromo c reductasa, inducción de la MT y/o incremento en la actividad de glutatión peroxidasa (Coppen, D.E. et al., 1988). Otra posibilidad es que la MT quele el Fe o medie su conversión en una forma inactiva, evitando su participación en la reacción de Fenton (Mello-Filho, A.C. et al., 1988). La formación de un complejo de Fe-MT ha sido descrita in vitro (Good, M. and Vasak, M., 1986). La MT puede donar un átomo de hidrógeno a un radical presente en el DNA de la célula blanco, almacenándolo sin producir daño (Greenstock, C. et al., 1987). Así como participar en la degradación de oxidantes dañinos (Matsubara, J., 1987).

## **5.11 LA METALOTIONEINA COMO AGENTE ATRAPADOR DE RADICALES EN UN SISTEMA DE DEFENSA ANTIOXIDANTE**

Hay una evidencia fuerte de que la MT puede atrapar radicales libres, pero todavía hay algunas dudas sobre su papel en los sistemas antioxidantes celulares. El glutatión reducido (GSH) es un importante antioxidante pero la MT es más efectiva que el GSH para prevenir la degradación *in vitro* del DNA por los radicales hidroxilo *in vitro* (Adel, J. and Reuiter, N., 1989). Esto sugiere que la capacidad de la MT para atrapar radicales libres puede ser comparable a la producida por el GSH bajo condiciones de fuerza oxidativa, cuando la síntesis de la MT está aumentada y los niveles de GSH están reducidos.

Algunas enzimas en el sistema de defensa antioxidante biológico son inducidas en respuesta a la producción de los radicales libres del oxígeno. Por ejemplo, en el hígado de ratas tratadas con dinitrofenol se encontró (Dryer, S. et al., 1980) un incremento tanto en la generación de radicales libres del oxígeno como de la enzima mitocondrial superóxido dismutasa (SOD) de manganeso. Los niveles elevados de esas enzimas pueden ayudar a proteger los tejidos de la toxicidad inducida por los radicales. Las células resistentes al Cd son más resistentes que las células que no resisten a la fuerza oxidativa sin embargo, no se encontró diferencia en la descomposición del peróxido de hidrógeno o de la actividad dismutante del radical superóxido (Mello-Filho, A.C. et al., 1988). La MT pulmonar puede atrapar los radicales libres producidos por el paraquat y así proteger contra la toxicidad pulmonar. Esos resultados apoyan la participación de la MT para atrapar los radicales libres e indica que las propiedades antioxidantes de las células no se pueden explicar con cambios en otros sistemas antioxidantes.

Sin embargo, en la levadura la SOD de Cu/Zn esta coregulada con la MT a nivel transcripcional, sugiriendo un importante papel de esa enzima como parte de su actividad antioxidante (Carri, M. et al., 1991).

## **5.12 EVIDENCIAS EN CONTRA DE LA ACCION ATRAPADORA DE LA METALOTIONEINA SOBRE LOS RADICALES LIBRES**

La función antioxidante de la MT es muy controvertida. Arthur y col. (1987) mostraron que la MT de Cu/Zn estimuló la peroxidación de lípidos microsomal iniciada por la xantina y xantina oxidasa in vitro. Recientemente Müller y col. (1991) mostraron que el daño puede ser causado por radicales no identificados y formados por la MT de Cd contribuyendo al mecanismo de carcinogénesis relacionado al Cd. La sobreexpresión de la MT no afectó la capacidad oxidativa producida por la bleomicina o la radiación, que produce radicales hidroxilo, pero esto incrementó su resistencia a los agentes alquilantes como la mitomicina (Lohrer, H., and Robson, T., 1989; Karina, B. et al., 1990). La preinducción in vivo de la MT por el Zn no previno el incremento de la peroxidación de lípidos hepática inducida por el estrés (Hidalgo, J. et al., 1988). Esos datos no apoyan la hipótesis de que la MT juega un papel primordial en atrapar radicales libres. Los radicales libres del oxígeno formados en los tejidos pueden disminuir por si mismos, ser degradados por un sistema de defensa biológico como la enzima superóxido dismutasa o reaccionar con moléculas celulares produciendo daño al tejido. La vida media del radical hidroxilo es particularmente corta, la MT y otros atrapadores pueden actuar solo si están localizados cerca del sitio de producción del radical y así interactuar antes de la reacción con otros componentes celulares.

La preinducción de la MT protege a las células de la citotoxicidad producida por el tert-butilhidroperóxido (Ochi, T. and Cerutti, P.A., 1989) en presencia de una disminución de glutatión.

Esos efectos pueden ocurrir por mecanismos independientes (Ochi, T. and Cerutti, P.A., 1989), pero es posible que la reducción de la GSH y la acumulación de la MT son mayores en el citoplasma que en el núcleo. Observándose que la localización de la MT en las células es mayor en el citoplasma, aunque se ha reportado su presencia en el núcleo de células en crecimiento y células regeneradas de ratas sujetas a hepatectomía parcial (Nishimura, H. et al., 1989; Tsujikawa, K. et al., 1991).

## **6.13 REGULACION DE LA METALOTIONEINA DEL CEREBRO**

La inducción de la MT en el cerebro no se produce después de administración aguda (vía intraperitoneal) del Zn (Itoh, M., and Ebadi, M., 1982) o por la administración crónica (vía intraperitoneal) del Zn (Ebadi, 1986a) debido a que este compuesto no atraviesa la barrera hematoencefálica. Posteriormente, se postuló que la regulación de la síntesis de la MT en el cerebro es diferente a la presente en el hígado o riñón (Ebadi, M., 1986b; Ebadi, M., et al., 1989b; Shiraga, H., et al., 1993; Takeda, A., et al., 1994).

El cerebro sintetiza una cantidad mayor de MT que los tejidos periféricos (Ebadi, M., 1986a; Paliwal, Y., et al., 1990). Este órgano es muy complejo y tiene alrededor de 30,000 RNA mensajeros y 1/3 parte del genoma de los mamíferos destinado a las funciones biológicas del cerebro (Sutcliffe, J., 1988). Este órgano importante pudo haber desarrollado procesos únicos para transportar, compartamentalizar, liberar y



utilizar el zinc, cobre, calcio y otros elementos esenciales que participan en las funciones vitales del cerebro en las que la MT desempeña un papel primordial.

## **6. HIPOTESIS**

Con base en los antecedentes expuestos en los que se describe la participación de la metalotioneína como factor que produce la resistencia a varias formas de fuerza oxidativa, se sugiere que esta proteína puede disminuir la neurotoxicidad inducida por la MPTP en el cuerpo estriado del ratón.

## **7.OBJETIVOS**

-Evaluar si los efectos de algunos inductores de la MT del cerebro, manganeso, cadmio y dexametasona pueden disminuir la neurotoxicidad dopaminérgica inducida por la MPTP en el cuerpo estriado del ratón.

-Evaluar el efecto de la administración de la MPTP sobre el contenido de MT en el cuerpo estriado del ratón.

## **8. MATERIALES Y METODOS**

### **PRIMERA PARTE**

#### **8.1 PRETRATAMIENTO CON MANGANESO Y ADMINISTRACION CON LA MPTP (ver artículo No.1 del anexo)**

Todos los experimentos se llevaron a cabo con ratones machos albinos con un peso de 25-30 g y alimentados *ad libitum*. Los ratones fueron tratados con una solución de  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  (0.5 mg/ml o 1.0 mg/ml en el agua de bebida) durante 7 días. Los ratones control recibieron cloruro de sodio en la misma concentración que el cloruro de manganeso durante 7 días. Después del tratamiento, los animales fueron administrados vía intraperitoneal con la MPTP (30 mg/Kg), una dosis diaria durante 3 días. El tratamiento oral con  $MnCl_2$  fue mantenido hasta el término del experimento. Posteriormente, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical 7 días después de la última administración con la MPTP.

#### **8.2 PRETRATAMIENTO CON MANGANESO Y ADMINISTRACION CON MPP+**

Un grupo adicional de ratones fue tratado con una sola dosis de  $MnCl_2$  (0.4 meq/Kg, subcutáneo) y 24 horas más tarde fueron tratados con MPP+, en el ventrículo lateral derecho como describió Haley y McCormick (1957). Todos los animales fueron administrados con una solución de 18  $\mu g$  en 3  $\mu l$  de MPP+. Esta

dosis ha mostrado que produce daño dopaminérgico específico a los ratones (Mihatsch, W. et al., 1988). Todos los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, 48 horas después de la administración de MPP+.

### **8.3 DETERMINACION DEL CONTENIDO DE DOPAMINA (DA) Y ACIDO HOMOVANILICO (HVA) (ver artículo No. 1 del anexo)**

Los cerebros fueron removidos rapidamente y el CE de cada uno fue disecado como describió Glowinski e Iversen (1966). Posteriormente, se adicionó al tejido una alícuota (500 µl) de una solución de metabisulfito de sodio con ácido perclórico (0.1% p/v) y se sonicó con un sistema labsonic Lab-line (Lab-line instruments, Melrose Park, IL). Las muestras fueron centrifugadas a 4,000 X g durante 10 minutos y los sobrenadantes fueron mantenidos a -70°C hasta que se analizaron.

Los contenidos de DA y HVA en el CE fueron analizados usando un sistema de HPLC (LC 250 Perkin-Elmer) con un detector electroquímico (Methrom 656) y un integrador Hewlett-Packard 3396-II como se describió previamente (García, E., et al., 1992). Las curvas de calibración fueron construidas para la DA, HVA y sus concentraciones obtenidas por interpolación en la respectiva curva estandar. Para el análisis cromatográfico se utilizó una columna analítica de catecolaminas (100 X 4.8 mm con un tamaño de partícula de 3 µm). La fase móvil fue preparada con una solución amortiguadora de fosfatos (pH 3.2) que contenía 0.2 mM de octil sulfato de sodio, 0.1 mM de EDTA y metanol 15% (v/v). El potencial del detector se ajustó a 0.8 V contra un electrodo de referencia de Ag/AgCl. Los resultados fueron expresados en µg del compuesto por gramo de tejido.

## **8.4 ANALISIS DE MANGANESO (ver artículo No. 1 del anexo)**

Un grupo adicional de ratones fue tratado con  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (0.5 mg/ml o 1.0 mg/ml de agua) como previamente se describió, durante 17 días. Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical después del tratamiento. Para este grupo, el manganeso fue analizado en el CE como sigue: todo el material de vidrio, tubos de polipropileno y puntas de micropipeta desechables fueron tratadas durante varias horas con una solución concentrada de  $\text{HNO}_3$  al 5% v/v y posteriormente enjuagados en agua desionizada y secadas con gas nitrógeno antes de usarse para evitar cualquier posible contaminación. Los instrumentos para la disección fueron tratados con ácido nítrico al 3% (v/v) y enjuagados con agua desionizada. Las muestras de tejido de CE fueron colocadas en tubos de polipropileno y digeridas en 500  $\mu\text{l}$  de ácido nítrico concentrado (Suprapur, E. Merck) en un baño de agitación a 60°C durante 30 minutos, como describió Bonilla (1978). Después de digerir las muestras se tomó una alícuota de 100  $\mu\text{l}$  de una solución clara y diluida de 1:10 o 1:25 (v/v) con una solución acuosa de 1% (p/v) de fosfato de hidrógeno diamonio y tritón X-100 al 0.1% (p/v). De esta solución diluida, se tomaron alícuotas de 20  $\mu\text{l}$  y se inyectaron en el horno de grafito para el análisis de Mn. La curva de calibración para Mn se construyó agregando cantidades conocidas de la respectiva solución estándar de manganeso, (Titrisol, E. Merck) para el tejido digerido y diluido como se describió, con el propósito de disminuir cualquier posible interferencia.

El análisis de las muestras diluidas se realizó con un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin-Elmer 360 integrado a un horno de grafito HGA-2200. Se utilizó un corrector de fondo para compensar la señal de fondo. Tanto para las muestras como para los estándares se inyectó una alícuota de 20  $\mu\text{l}$  de cada solución

diluida final en el horno. El programa del horno fue optimizado por medir la señal de los estándares a varias temperaturas, tanto para las fases de carbonización y atomización de acuerdo al procedimiento de Welz (1976).

## **8.5 ANALISIS ESTADISTICO**

Los datos fueron analizados estadísticamente usando análisis de varianza, seguido por la prueba de Tukey (Steel, R. and Torrie, J., 1980). Los valores de  $p < 0.05$  y  $p < 0.01$  fueron considerados de significancia estadística.

# **MATERIALES Y METODOS**

## **SEGUNDA PARTE**

### **9.1 PRETRATAMIENTO CON INDUCTORES DE LA METALOTIONEINA (MT) Y ADMINISTRACION DE LA MPTP (ver artículo No. 2 del anexo)**

Los ratones machos albinos fueron administrados (i.p.) con uno de los inductores de la MT, el cadmio (Cd) ó la dexametasona (Dex): Cd (1 mg/Kg) ó Dex (5 mg/Kg) y posteriormente fueron tratados con MPTP (30 mg/Kg). Los animales estuvieron agrupados de la siguiente manera:

Grupo I: animales control tratados con solución salina; Grupo II: animales inyectados con Cd; Grupo III, animales tratados con Dex; Grupo IV: animales tratados con solución salina y 5 horas más tarde con MPTP; Grupo V, animales inyectados con Dex y 5 horas más tarde con MPTP; Grupo VI, animales tratados con

Cd y 5 horas más tarde con MPTP. Los tratamientos se repitieron diariamente durante 3 ó 5 días consecutivos. Todos los animales fueron sacrificados por dislocación cervical 7 días después de la última administración y posteriormente se analizaron los contenidos de DA y HVA en el CE por HPLC.

## **9.2 DETERMINACION DE LA DA Y EL HVA**

Como se describió previamente en la primera parte de materiales y métodos.

## **9.3 ESTIMACION DE LA METALOTIONEINA EN EL CUERPO ESTRIADO**

Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical después del tratamiento con la MPTP durante 5 días consecutivos como se describió previamente. La MT fue analizada en el CE con el método de saturación de plata (Scheuhammer, A. and Cherian, M., 1986) con algunas modificaciones (Scheuhammer, A. and Cherian, M., 1991) como sigue: todo el material de vidrio, tubos de polipropileno y puntas de micropipeta fueron tratados durante varias horas con una solución concentrada de HNO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O al 5% v/v y posteriormente enjuagados en agua desionizada y secados con nitrógeno gaseoso antes de usarse, con la finalidad de evitar cualquier posible contaminación. El material de disección fue tratado con ácido nítrico al 3% v/v y posteriormente enjuagado con agua desionizada antes de usarse. Las muestras fueron homogeneizadas en 500 µl de solución amortiguadora de fosfatos al 0.05 M (pH 7.0) constituida de NaCl (0.015M) y KCl (0.145 M). Posteriormente se adicionó una solución acuosa del ión plata (20 mg/l, 250 µl) al extracto de tejido (500 µl) para unir proteínas citosólicas y otros ligantes incluida la MT. La hemoglobina de la rata (200

μl) fue adicionada y las muestras fueron hervidas durante 2 minutos para precipitar el exceso de la plata. Sólo la plata unida a la MT permanece en el sobrenadante, este último paso se repite 2 veces. La concentración de la MT fue calculada de la concentración de plata en el sobrenadante. Esta plata se analizó por espectrofotometría de absorción atómica usando un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin-Elmer 360 con horno de grafito HGA-2200. Una alícuota de 20 μl de cada muestra diluída fue inyectada en el horno. El programa del horno fue optimizado midiendo la altura de las señales de los estándares a varias temperaturas, para las fases de carbonización y atomización de acuerdo al procedimiento de Welz (1976). El límite de detección de la MT fue de 5 μg de MT/peso de tejido húmedo.

## **9.4 ANALISIS ESTADISTICO**

Los datos de DA y HVA fueron analizados estadísticamente usando análisis de varianza, seguido por la prueba de Tukey (Steel, R. and Torrie, J., 1980). Los datos de MT fueron analizados con una prueba de t de student. Los valores de  $p < 0.05$  y  $p < 0.01$  fueron considerados de significancia estadística.

## **10. RESULTADOS**

### **10.1 PRIMERA PARTE**

**(ver artículo No. 1 del anexo)**

La administración de  $MnCl_2$  a las concentraciones probadas de 0.5 y 1.0 mg/ml no produjo incrementos significativos en las concentraciones de DA en el CE (ver figura 1 del artículo No.1) cuando se compara con el grupo control (sin tratar a los animales con MPTP o con Mn). Por otro lado, la administración de la MPTP (ver

figura 1 del artículo No. 1) disminuye la concentración de DA en el CE (44.3%) de forma estadísticamente significativa ( $p < 0.01$ ) como resultado de la acción neurotóxica del compuesto. En contraste, el efecto dañino de la MPTP producido en las neuronas dopaminérgicas del CE, disminuyó parcialmente con el pretratamiento de Mn a una dosis de 0.5 mg/ml (40%) (ver figura 1 del artículo No. 1), encontrándose ésta protección parcial respecto al grupo tratado con MPTP ( $p < 0.01$ ). Esto significa que el Mn disminuyó el efecto dañino de la MPTP, encontrándose que la disminución de la DA en el CE es menor (30%) respecto al grupo control ( $p < 0.01$ ). Este efecto protector parcial no fue dosis dependiente, porque la dosis oral de MnCl<sub>2</sub> a 1 mg/ml no protegió más que la administración oral de 0.5 mg/ml.

La administración de MPP<sup>+</sup> (ver figura 2 del artículo No. 1 del anexo) produjo una disminución en las concentraciones de DA en el CE (50%) cuando se compara con el grupo control ( $p < 0.01$ ). Los efectos inducidos por este metabolito tóxico de la MPTP, en las neuronas dopaminérgicas del CE fueron disminuidos parcialmente con el pretratamiento de MnCl<sub>2</sub>. Indicando un incremento del 33% en la concentración de DA en esa región del cerebro después del tratamiento mencionado.

El pretratamiento con el MnCl<sub>2</sub> a los animales parkinsonizados con MPTP mostró que el contenido de HVA (principal metabolito de la DA en el cerebro) en el CE alcanza los niveles mostrados en el grupo control (sin tratamiento con MPTP). Esto sugiere que la protección ejercida por el pretratamiento con el MnCl<sub>2</sub> fue completa (ver figura 3 del artículo No.1). Como en el caso del contenido de DA, la dosis dependencia del efecto del Mn en los niveles de HVA no fue observada (ver figura 3 del artículo No.1).

En la figura 4 (ver artículo No.1) se observan los resultados (ver figuras 1 y 3 del artículo No. 1) expresados como la tasa de HVA/DA, un índice o estimación del recambio de la DA, con la finalidad de conocer como el Mn puede ejercer sus



efectos en el sistema dopaminérgico del CE. El Mn incrementó la tasa de HVA/DA en los grupos de ratones tratados con la MPTP y a diferentes dosis de MnCl<sub>2</sub>.

La acumulación de Mn en el CE después del tratamiento oral con MnCl<sub>2</sub> a dos dosis diferentes (0.5 mg/ml y 1 mg/ml) es mostrada en la figura 5 (ver artículo No. 1). A la dosis de 1 mg/ml se encontró un incremento en el contenido de Mn del 42% cuando se compara con los valores control ( $p < 0.01$ ). La dosis baja de 0.5 mg/ml produjo un incremento en la concentración de Mn en el CE del 14%, pero los cambios no fueron estadísticamente significativos.

## **10.2 SEGUNDA PARTE**

### **(ver artículo No. 2 del anexo)**

La administración de Cd ó Dex durante 3 ó 5 días no modificó el contenido de DA en el CE, cuando se compara con sus respectivos valores control (ver tabla 1 del artículo No.2).

Por otro lado, la administración de la MPTP durante 3 días (ver tabla 1 del artículo 2) disminuyó el contenido de DA en el CE (36% comparada con el grupo control) como resultado de la acción neurotóxica del compuesto. El efecto neurotóxico de la MPTP en las neuronas dopaminérgicas del CE producido con 3 días de administración de la toxina fue disminuido parcialmente cuando se preadministra a los animales con Cd durante 3 días (ver tabla 1 del artículo No.2). Esta protección parcial fue de 32% comparado a su respectivo grupo tratado con MPTP; después de realizar un análisis de varianza seguido de una prueba de Tukey. El mismo tratamiento durante 5 días incrementó el contenido de DA en el CE en un 48% comparado con su respectivo grupo tratado con MPTP (ver tabla 1 del artículo No. 2).

El efecto neurotóxico de la MPTP en las neuronas dopaminérgicas del CE producido con 3 y 5 días de administración de la toxina fue disminuído parcialmente con el pretratamiento de Dex (ver tabla 1 del artículo No.2). Esta protección parcial expresada como un incremento en los niveles de DA a 3 y 5 días de tratamiento fue del 28% y 43% respectivamente comparado con los valores de animales tratados sólo con MPTP.

El contenido de HVA en el CE después del tratamiento con MPTP durante 3 días disminuyó 27.5% (ver tabla 1 del artículo No.2) cuando se compara con el grupo control, indicando la acción neurotóxica del compuesto. En los grupos pretratados con Cd, Dex y parkinsonizados posteriormente con MPTP no se encontraron diferencias en el contenido de HVA cuando se comparan con el grupo control. Esto sugiere que el Cd y Dex producen una recuperación total de los niveles del HVA.

El tratamiento con MPTP durante 5 días (ver tabla 1 del artículo No.2) disminuyó el contenido de HVA en el CE (56%) cuando se compara con los valores de animales control. Los grupos tratados con Cd + MPTP y Dex + MPTP mostraron un incremento en el contenido de HVA (85% y 65% respectivamente) cuando se compara con los valores del grupo tratado con MPTP.

Por otro lado, el análisis del contenido de MT en el CE mostró que el Cd incrementó 2 veces la concentración de MT en esa región del cerebro (ver figura 1 del artículo No.2) cuando se compara con el grupo control. Así mismo, los animales expuestos a la Dex mostraron un incremento de 2 veces en las concentraciones de MT en el CE (ver figura 1 del artículo No.2), como se observó con el tratamiento de Cd. En contraste, los animales tratados con MPTP mostraron una disminución del contenido de MT (49% vs los valores control) (ver figura 1 del artículo No. 2).

El contenido de MT incrementó tanto en animales tratados con Cd + MPTP (82% cuando se compara con el grupo tratado con MPTP) y en animales tratados con Dex + MPTP (77% cuando se compara a los valores del grupo tratado solo con MPTP).

## 11. DISCUSION

El origen de la EP se desconoce pero se ha propuesto la influencia de la edad y el medio ambiente en su patogénesis. La edad es un factor que puede acelerar los procesos metabólicos endógenos en las neuronas del CE (McGeer P.L., et al., 1977; Riederer, P. and Wuketich, S., 1976) y el medio ambiente puede actuar en las neuronas del CE a través de neurotoxinas (Calne, D., et al., 1986; Snyder, S. and Amato, R., 1986) como la MPTP o bien por algún otro factor ambiental como es el uso de herbicidas, pesticidas, metales y agua para beber (Barbeau, A. et al., 1986; Aquilonius, S.M. and Hartvig, P., 1986).

La incidencia de la EP se incrementa con la edad produciendo disminución en el número de neuronas de la sustancia nigra y en el contenido de DA de los sujetos que la padecen (McGeer, P. et al., 1977; Hornykiewicz, O., 1982). Después de la degeneración de las neuronas de la sustancia nigra, las neuronas que sobreviven incrementan su actividad produciendo más DA para compensar la disminución del neurotransmisor producida por el daño celular. Esta actividad compensatoria incrementa la desaminación oxidativa de las monoaminas, la formación de peróxido de hidrógeno y otros productos potencialmente tóxicos como los radicales hidroxilo y superóxido (Cohen, G., 1985; Slivka, A. and Cohen, G., 1985).

La disminución de las neuronas de la sustancia nigra y el incremento en el recambio de la DA observada en individuos viejos esta asociada con un incremento en el contenido de la enzima MAO-B, responsable de la biotransformación oxidativa de la DA y otras monoaminas (Cote, L.J. and Krenzner, L.T., 1983). La oxidación de las monoaminas genera radicales libres y otras neurotoxinas potenciales como la

6-hidroxidopamina y quinonas que pueden producir daño celular (Graham, D.G., 1984).

Los estudios *postmortem* realizados en la sustantia nigra de pacientes con EP han dado grandes evidencias para explicar el daño, entre estos se pueden mencionar los siguientes:

1) aumento de la fuerza oxidativa y disminución de enzimas atrapadoras de los radicales libres (Kish, S. et al., 1985; Perry, T. and Yong, V., 1986) 2) niveles elevados de fierro total asociados con la reducción de ferritina y 3) deficiencia del complejo I de la mitocondria.

Uno de estos eventos es probablemente el primario, generando una cascada secundaria de cambios que terminan en la muerte celular de las neuronas de la sustantia nigra. Este evento desafortunadamente se desconoce hasta el momento. Sin embargo, se ha involucrado recientemente a la fuerza oxidativa mediada a través de las especies reactivas del oxígeno como factor primordial.

Las especies reactivas del oxígeno son producidas continuamente en los tejidos por la acción del sistema de transporte de electrones de la mitocondria (Cadenas, E. et al., 1977) y la oxidasa NADPH (Wakeyama, H. et al., 1982). Sin embargo, la fuerza oxidativa no es solo el resultado de la sobreproducción de las especies reactivas del oxígeno, es también la consecuencia de una disminución de los mecanismos de protección de las células (Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C., 1985). Estos sistemas de defensa que previenen el daño a los tejidos debido a los radicales libres del oxígeno incluyen una variedad de antioxidantes específicos como la catalasa para el peróxido de hidrógeno, la superóxido dismutasa para el superóxido y la glutatión peroxidasa para el peróxido de hidrógeno y el peróxido lipídico, así como antioxidantes no específicos como es el glutatión reducido, la ceruloplasmina y la transferrina (Sato, M. and Bremner, Y., 1993). Sin embargo, no hay mecanismos de defensa específicos contra los radicales hidroxilo, que son los

más reactivos. Recientemente, los estudios se han enfocado en el papel de la MT en los mecanismos de protección contra los radicales libres (Sato, M. and Bremner, Y., 1993).

La MT tiene la capacidad de unir cantidades grandes de metales y así funcionar como reserva intracelular de elementos esenciales como el zinc y el cobre. Además, esta proteína puede atrapar iones tóxicos y mantener la homeostásis de los metales (Sato, M. and Bremner, Y., 1993).

La participación de la MT en la defensa intracelular contra el oxígeno reactivo es derivada de observaciones de sustancias que inducen la fuerza oxidativa y la síntesis de la MT (Bauman, J. et al., 1991). Así mismo, la deficiencia de la MT produce susceptibilidad a la fuerza oxidativa, pero la sobreexpresión de la proteína reduce la sensibilidad de las células y los tejidos al daño inducido por los radicales (Lazo, J. et al., 1995).

El interés particular de la MPTP en el estudio de la EP es por su semejanza en la sintomatología, bioquímica y patología con esa enfermedad (Ballard, P. et al., 1985). La toxicidad selectiva de esta neurotoxina para la vía nigroestriatal proporciona un modelo para el estudio de los factores que afectan la susceptibilidad individual.

Las evidencias sugieren que la MPTP es una neurotoxina dependiente de la edad encontrándose más daño por la neurotoxina en los animales más viejos (Langston, J., 1985). Una posible explicación de esta observación se relaciona con la enzima MAO-B, que se incrementa en el cerebro con la edad (Cote, L. and Kremzner, L., 1983). Este proceso puede incrementar, como ocurre con otros compuestos, porque el hígado llega a ser menos eficiente en la biotransformación produciendo que menos MPTP sea convertida periféricamente por el hígado, pasando al sistema nervioso central.

Hallazgos interesantes han revelado que ciertos compuestos del medio ambiente pueden modificar la actividad de la MAO. Una observación relacionada con esto

involucra al hábito de fumar. El cigarro contiene numerosos compuestos que inhiben la actividad de la MAO (Yu, P. and Boulton, A., 1987); uno de esos es el 4-fenilpiridino, análogo de la MPTP, que previene los efectos neurotóxicos de esta neurotoxina (Irwin, I et al., 1987). De esta manera el fumar cigarros representa un factor ambiental que pudiera prevenir la conversión de ciertos compuestos a neurotoxinas a través de inhibir la actividad de la MAO. Esto puede ser de importancia para inhibir la incidencia de la EP porque se ha observado disminución de su frecuencia en fumadores (Irwin, I. et al., 1987).

La MPTP es un compuesto que se une a la melanina (Lyden, A., et al., 1983); la melanina cutánea podría actuar como un atrapador periférico, capturando y uniendo dosis tóxicas de la MPTP o sustancias similares que son producidas por la exposición ambiental. Esta sugerencia se ha fundamentado en que la incidencia de la EP disminuye en individuos de raza negra (Lerner, M. and Goldman, R., 1987).

La acumulación de la neuromelanina puede reflejar que los mecanismos de defensa contra los radicales libres están limitados porque este compuesto promueve la oxidación de catecoles a quinonas. Así, la neuromelanina per se puede contribuir a la neurotoxicidad de la MPTP, reaccionar con el MPP+ y generar el radical libre MPP.

Estas observaciones son especulativas y sugieren la participación de la fuerza oxidativa en el daño celular.

La terapia antioxidante contra los radicales libres puede ser una opción para hacer más lenta la degeneración de la sustancia nigra y los síntomas clínicos tanto en la EP como en este modelo de la enfermedad. La atenuación de los efectos de los radicales libres a través de un atrapador natural como la MT, la inhibición de la desaminación oxidativa por un inhibidor de la MAO tipo B como el deprenil, pueden probarse como terapia complementaria para probar si la degeneración de la sustancia

nigra en este modelo esta relacionada con mecanismos mediados por la fuerza oxidativa.

La MT es una proteína importante en la fuerza oxidativa y debido a su naturaleza endógena puede inducirse su síntesis y expresión con diferentes agentes que incluyen los metales, como el Mn, Cd, Zn, Cu, esteroides, etc. (Ebadi, M. and Babin, D., 1989; Palmiter, R., et al., 1992; Choudhuri, J.M. et al., 1993)

Nuestros hallazgos en el presente estudio muestran que el Mn, inductor de la MT, administrado exogenamente en el modelo de Parkinson usando MPTP, es capaz de prevenir parcialmente el efecto neurotóxico de la MPTP/MPP+ en las neuronas dopaminérgicas del CE como resultado de sus efectos a nivel sináptico.

El efecto dañino de la MPTP fue prevenido parcialmente (40%) con el tratamiento de Mn (ver figura 1 del artículo 1). Esto nos indica que el incremento en la cantidad de DA de las neuronas del CE después del tratamiento es por aumento en la cantidad de neurotransmisor liberado.

Por otro lado, el pretratamiento con Mn en animales parkinsonizados con MPTP mostró una recuperación total de los niveles de HVA en el CE (ver figura 3 del artículo 1) indicando un aumento del catabolismo de la DA. La medición de este metabolito sugiere la posibilidad de modificaciones en la liberación o en el recambio de la DA en el cerebro (Weiner, N. and Molinoff, P., 1994).

La relación entre HVA/DA es una forma indirecta de sugerir un aumento o disminución en el recambio de la DA. El incremento de la relación entre HVA/DA en el CE de los ratones pretratados con Mn y parkinsonizados con MPTP (ver figura 4 del artículo 1) encontrados en este estudio, sugiere la posibilidad de un incremento del recambio de la DA producida por el pretratamiento con el metal. Así el Mn puede acelerar el recambio de ese neurotransmisor para compensar su disminución debida a la muerte celular de las neuronas dopaminérgicas producida por la MPTP. Algunas otras drogas como la amantadina (Rojas, P. et al., 1993), producen un



aumento del recambio de la DA en este modelo experimental de la enfermedad de Parkinson..

Para poder probar si el efecto del Mn es por aumento en el recambio de la DA es necesario realizar estudios precisos para su medición. Este mecanismo puede analizarse en el cerebro de acuerdo a la técnica de Diggory and Buckett (1984) que consiste en la administración del probenecid, un fármaco bloqueador del transporte del HVA y otros ácidos orgánicos del líquido cefaloraquídeo a la sangre (Tamarkin et al., 1970). De esta manera el contenido de HVA en el cerebro incrementa proporcionalmente al recambio de la DA.

El incremento inicial en el contenido de DA después de la administración del Mn, observado en este estudio, se ha reportado durante la intoxicación subcrónica en el CE de ratas y ratones (Chandra, S. and Shukla, G., 1981; Bonilla, E., 1980). Sin embargo, este resultado sugiere que esos efectos son mediados por el estado físico del manganeso in vivo, porque el metal puede ser un antioxidante o un poderoso prooxidante dependiendo de su estado de oxidación (Kono, Y. et al., 1976; Donaldson, J., 1981).

El Mn divalente es un atrapador eficiente de los radicales superóxido (Kono, Y. et al., 1976; Archibald, F. and Fridovich, Y., 1981), capaz de inducir la síntesis de la MT y evitar el daño al DNA producido por la radiación ionizante. En este efecto la MT puede estar participando atrapando los radicales hidroxilo. El exceso de Mn divalente puede inhibir la producción de los radicales superóxido e hidroxilo que estimulan la peroxidación de lípidos (George, J.D. et al., 1980). El tratamiento agudo con cloruro de Mn a ratas neonato disminuye la peroxidación de lípidos en varias regiones del cerebro. En el CE se encontró una reducción casi completa del proceso (Donaldson, J. et al., 1982), sugiriendo que el Mn ejerce una actividad antioxidante en esa región. En relación a esto, el efecto protector del Mn en el CE observado en el presente estudio puede atribuirse a la predominancia del Mn

divalente durante la administración aguda y subaguda. Es posible que el Mn divalente atrape los radicales superóxido (Kono, I. et al., 1976; Archibald, F. and Fridovich, Y., 1981; Donaldson, J. et al., 1981) producidos por el tratamiento con MPTP (Ríos, C. et al., 1995) a través de un mecanismo directo o por la inducción de la MT.

El efecto protector parcial del cloruro de Mn observado en este estudio aparentemente no fue dosis dependiente. Este resultado sugiere un proceso de saturación en la acción protectora del Mn. Sin embargo, es necesario estudiar tanto exposiciones altas como bajas de Mn para concluir sobre la dosis dependencia. El contenido de Mn en el CE (ver figura 5 del artículo 1) incrementó ligeramente después del tratamiento oral con MnCl<sub>2</sub> a una dosis de 0.5 mg/ml, pero este no fue estadísticamente significativo, aún así se observó protección contra la MPTP. Esto sugiere que el contenido total de Mn es un índice grueso del estatus del Mn en el cerebro. El Mn es acumulado preferencialmente por la mitocondria (Liccione, J. et al., 1989), quizás el Mn subcelular está aumentado a esta dosis, pero el incremento no se refleja en el contenido total de Mn en el tejido que analizamos. En un estudio in vivo se encontró que el Mn<sup>2+</sup> es captado por la mitocondria del CE (Liccione, J. and Maines, M., 1988), organelo que preferencialmente acumula el metal, actuando como una reserva del mismo (Kandel, E. and Schwartz, J., 1985). Cuando el Mn presente en el cerebro llega a ser elevado, se acumula preferencialmente en la mitocondria de los ganglios basales (Suzuki, J. et al., 1975; Fahn, S., 1976; Autissier, N. et al., 1982), el sitio postulado de la acción tóxica del MPP<sup>+</sup> (Ramsay, R. and Singer, T., 1986).

Es interesante mencionar que el Mn es tomado por los astrocitos del cerebro (Tholey, G. et al., 1988), el sitio de transformación de MPTP a MPP<sup>+</sup> (Gerlach, M., et al., 1991). Así, las acciones protectoras de ese metal pueden atribuirse a una interferencia con la bioactivación de la MPTP en los astrocitos. Los resultados del

presente estudio indican que el Mn también protege contra la neurotoxicidad del MPP+, indicando que este metal está actuando directamente en los procesos neurotóxicos inducidos por el MPP+ más que en la biotransformación del MPTP.

El Mn tiene acción en el sistema dopaminérgico (Daniels, A. et al., 1981) en fases tempranas del desarrollo. Por ejemplo, en ratas gestantes la acumulación del Mn en el CE está asociada con el incremento en la actividad de tirosina hidroxilasa (Bonilla, E., 1980), biosíntesis y recambio de la DA (Chandra, S. and Shukla, G., 1981). Se ha propuesto que la intoxicación por el Mn en los humanos puede ser debido a un incremento en los niveles y/o el recambio de las catecolaminas del cerebro (Chandra, S. and Shukla, G., 1981).

El mecanismo de acción de la MPTP se ha relacionado a la deficiencia de los metales de transición. En un estudio previo, encontramos una disminución en el contenido de cobre y Mn en el CE después del tratamiento con MPTP (Ríos, C. et al., 1995). Así mismo, el dietilditiocarbamato, un agente quelante de algunos metales, incluyendo el Mn, inhibe la superóxido dismutasa y potencia la neurotoxicidad de la MPTP/MPP+ (Miller, D. et al., 1991). Estos hallazgos pueden indicar que el tratamiento con Mn a corto plazo puede atenuar la fuerza oxidativa en el CE. El mecanismo exacto no está todavía entendido y sería muy interesante analizar si la MT está involucrada en este mecanismo de protección.

El uso de otros agentes inductores de la MT, como el Cd y la dexametasona, puede ayudar a proteger de la neurotoxicidad. Como se observó en este estudio, el Cd y la dexametasona protegieron parcialmente de la toxicidad inducida por la MPTP en las neuronas dopaminérgicas del CE (ver figuras 1 y 2 del artículo 2). Esta protección parcial evaluada como aumento en la concentración de la DA en esa región indica un incremento en la liberación del neurotransmisor. Así mismo, se encontró que el contenido de HVA en el grupo de animales parkinsonizados a diferentes tiempos y tratados con los diferentes agentes inductores de la MT (ver figuras 3 y 4 del artículo

2) incrementaron la cantidad de este metabolito, lo que indica un aumento en el metabolismo después de esos tratamientos.

Es interesante mencionar que la administración de Cd o dexametasona en este estudio aumentaron cerca de 2 veces el contenido de MT en CE (ver figura 5 del artículo 2) y esos mismos tratamientos en el modelo de Parkinson inducido con MPTP protegieron de su neurotoxicidad dopaminérgica (ver figura 5 del artículo 2), sugiriendo que acción de esos inductores puede ser mediada por la acción de la MT como atrapador del radical hidroxilo (Sato, M. and Bremner, Y., 1993).

La MPTP está relacionada a la fuerza oxidativa porque su metabolito tóxico, el MPP+, es capaz de incrementar la peroxidación de lípidos (Rojas, P. and Rios, C., 1993) y de disminuir la cantidad de cobre y el manganeso en el CE después de la administración de la MPTP (Ríos, C. et al., 1995). Es posible que la MT, que une metales como el cobre y el manganeso juegue un papel importante en proteger las neuronas dopaminérgicas de los radicales libres inducido por la MPTP.

El análisis del contenido de MT en el CE disminuyó después de la administración de la MPTP, sugiriendo que una disminución de los mecanismos de defensa celular contra los radicales libres relacionados con el grupo tiol, incluyendo la MT. Este efecto ha sido reportado para la 6-hidroxidopamina (Shiraga, H. et al., 1993), neurotoxina que daña la vía nigroestriatal.

La MT puede interactuar con toxinas electrofílicas regulando el potencial redox intracelular o actuando como atrapador de radicales libres (Sato, M. and Bremner, Y., 1993). Apoyando esto se ha encontrado que animales deficientes en los genes de la MT-I y MT-II son más sensibles a la fuerza oxidativa (Lazo, J., et al., 1995). Así se podría esperar que los ratones tratados con MPTP serán incapaces de controlar la sobreproducción de especies reactivas del oxígeno, debido a una deficiencia en MT.

La reducción de los mecanismos de defensa celular relacionados con el grupo tiol entre ellos la disminución en el contenido de MT como resultado de la acción de la

MPTP pueden explicar la disminución observada de cobre y Mn después de la administración de la MPTP (Ríos, C. et al., 1995); porque esos metales se piensa que son regulados por la MT.

Como se ha mencionado, la EP ha sido asociada con la fuerza oxidativa (Halliwell, B., 1989), que incluye disminución de defensas relacionadas al grupo tiol (Perry, T.L. et al., 1982), cambios en las concentraciones de metales traza, especialmente disminución de cobre (Dexter, D.T. et al., 1991) e incremento en la peroxidación de lípidos en la sustancia nigra de pacientes postmortem que presentaron EP (Dexter, D.T. et al., 1989). Todos esos hallazgos sugieren la existencia de mecanismos similares de daño tanto en pacientes con la EP y la neurotoxicidad inducida por la MPTP, los resultados presentados aquí sugieren que una posible alteración en la MT de los pacientes podría ser esperado y así abrir la posibilidad de un papel protector de los inductores de la MT en la EP.

La importancia de este modelo en el estudio de la EP radica en que factores ambientales y endógenos, como ya se mencionó, pueden estar involucrados en los mecanismos de toxicidad. Por eso es relevante el estudio de posibles factores que puedan ayudar a conocer como se lleva a cabo el daño celular y así poder establecer terapias. De ahí la relevancia del estudio de la MT que no solo desempeña funciones relacionadas con la fuerza oxidativa. Además, su síntesis es inducida por diversos factores ambientales a los que estamos expuestos constantemente.

Los resultados presentados en este trabajo son de relevancia para el estudio de la etiología de la EP, aunque sólo se realizó en un modelo de la EP. Así, el uso de agentes inductores de la síntesis y expresión de la MT (Mn, Cd y Dex), sugiere la posible participación de la MT en los mecanismos de protección contra el daño producido a las neuronas dopaminérgicas del CE en animales tratados con MPTP.

Por otro lado, esto ayudará en estudios futuros al conocimiento de la función de la MT endógena, presente en el cerebro, así como su relevancia primordial para

**proteger de los mecanismos de estrés oxidativo que ocurre en las neuronas dopaminérgicas del CE en este modelo de la EP y en la enfermedad idiopática.**

## **12. CONCLUSIONES**

**1- Los inductores de la MT, manganeso, cadmio y dexametasona protegen contra la toxicidad dopaminérgica inducida por la administración de la MPTP.**

**2-La MPTP disminuye los niveles de la MT en el CE lo que sugiere una disminución de los mecanismos de defensa de celular contra la fuerza oxidativa.**

**3-Los inductores de la MT, cadmio y dexametasona incrementaron parcialmente los niveles de la MT en animales tratados con MPTP sugiriendo la participación de la proteína en los mecanismos de defensa celular contra la fuerza oxidativa.**

**4- La MT puede desempeñar un papel importante en proteger a las neuronas dopaminérgicas del daño celular producido por los radicales libres en este modelo experimental de la enfermedad de Parkinson.**

**5-Estos resultados apoyan las evidencias de la participación de la fuerza oxidativa como mecanismo de daño celular en este modelo de Parkinson.**

**6-La MT es una proteína relacionada con la fuerza oxidativa y debido a sus propiedades antioxidantes puede actuar como un mecanismo de defensa celular en esta patología.**

**7-Se requieren de más estudios para explorar la naturaleza antioxidante de la MT y sus implicaciones en la neuroprotección en diferentes enfermedades, entre ellas la enfermedad de Parkinson.**

### **13.REFERENCIAS**

-Abe, S., Matsumi, M., Tsukioki, M., Mizukawa, S., Takahashi, T., Iijima, Y., Itano, Y. and Kosaka, F. Metallothionein and zinc metabolism in endotoxin shock rats. In J.H.R. Kägi and Kojima (Eds.). Metallothionein II, *Experientia Supplementum*, Vol. 52, Birkhäuser, Basel, 1987, pp 587-594.

-Adel, J. and Reuter, N. (1989). Inhibition of Hydroxyl-radical generated DNA degradation by metallothionein. *Toxicol. Lett.* 47: 191-196.

-Adams, J.D., Odunze, I.N. and Sevanian, A. (1990). Induction by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine of lipid peroxidation in vivo in vitamin E deficient mice. *Biochem. Pharmacol.* 39: R5-R8.

-Adams, J.D. and Odunze, I.N. (1991). Biochemical mechanisms of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity. Could oxidative stress be involved in the brain?. *Biochem. Pharmacol.* 41: 1099-1105.

-Aquilonius, S.M., Hartvig, P. (1986). Utilization of antiparkinson drugs in Sweden 1977-1984. *Upsala J. Med. Sci.* 43 (Suppl): 93.

-Andersen, R.A., Daae, H.L., Mikalsen, A. and Alenxander, J. (1989). Occurrence of various forms of metallothionein in the rat after a short-term cadmium injection regimen. *Comp. Biochem. Physiol.* 93C: 367-375.

-Archibald, F.S. and Fridovich, Y. (1981). Manganese superoxide dismutase and oxygen tolerance in some lactic acid bacteria. *J. Bacteriol.* 146: 928-936.



-Arora, P. K., Riachi, N.J., Harik, S.I. and Sayre, L.M. (1988). Chemical oxidation of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and its in vivo metabolism in rat brain and liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 152: 1339-1347.

- Arthur, J.R., Bremner, Y., Morrice, P.C and Mills, C.F. (1987). Stimulation of peroxidation in rat liver microsomes by (copper, zinc)-metallothioneins. *Free Radio. Res. Comm.* 4: 15-20.

-Autissier, N., Rochette, L., Dumas, P., Beley, A., Loireau, A. and Bralet, J. (1982). Dopamine and norepinephrine turnover in various regions of the rat brain after chronic MnCl<sub>2</sub> administration. *Toxicology.* 24: 175-182.

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

-Barbeau, A., Roy, M., Cloutier, T., Plasse, L., Paris, S. (1986). Environment and genetic factors in the etiology of Parkinson's disease. *Adv. Neurol.* 45: 299-306.

-Bauman, J.W., Liu, J., Liu, Y. and Klaassen, C.D. (1991). Increase in metallothionein production by chemicals that induce oxidative stress. *Toxicol. Appl. Pharmac.* 110: 347-354.

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

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

-Blaauwgeers, H.G.T., Sillevis, Smitt, P.A.E., de Jong, J.M.B.V. and Troost, D. (1993). Distribution of metallothionein in the human central nervous system. *Glia*. 8: 62-70.

-Blaauwgeers, H.G.T., Sillevis Smitt, P.A.E., de Jong, J.M.B.V. and Troost, D. (1994). Localization of metallothionein in the mammalian central nervous system. *Biol. Signals*. 3: 181-187.

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

-Bonilla, E. (1980). L-tyrosine hydroxylase activity in the rat brain after chronic oral administration of manganese chloride. *Neurobehav. Toxicol.* 2: 37-41.

-Bremner, Y. (1987). Nutritional and physiological significance of metallothionein. *Experientia (Suppl.)* 52: 81-107.

-Bremner, Y. and Beattie, J.H. (1990). Metallothionein and the trace minerals. *Ann. Rev. Nutr.* 10: 63-83.

- Burns, R.S., Chiueh, C.C., Markey, S.P., Ebert, M.H., Jacobowitz, D.M. and Kopin, I.J. (1983). A primate model of the parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80: 4546-4550.
- Cadenas, E., Boveris, A., Ragan, C.I. and Stoppani, A.O.M. (1977). Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome C reductase from beef-heart mitochondria. *Archs. Biochem. Biophys.* 180: 248-257.
- Calne, D.B. and Langston, J.W. (1983). Etiology of Parkinson's disease. *Lancet.* 2: 1457-1459.
- Calne, D.B., Langston, J.S., Martin, W.R., Stoessl, A.J., Ruth, T.J., Adam, M.J., Pate, B.D. and Schulzer, M. (1985). Positron emission tomography after MPTP: observations relating to the cause of Parkinson's disease. *Nature.* 317: 246-248.
- Calne, D.B., Eisen, A., McGeer, E., Spencer, P. (1986). Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and motoneuron disease: Abiotrophic interactions between aging and environment? *Lancet.* 2: 1067-1070.
- Carpenter, M.B. (1986). Anatomy of the basal ganglia. In: *Handbook of clinical neurology.* Vol. 49. pp. 1-18. Vinken, P.J. et al. (Eds), Elsevier Science Publishers Co.
- Carri, M.T., Galiazgo, F., Ciriolo, M.R., Rotilio, G. (1991). Evidence for co-regulation of Cu, Zn superoxide dismutase and metallothionein gene expression in

yeast through transcriptional control by copper via the ACEI factor. FEBS Lett. 278: 263-266.

-Chandra, S.V. and Shukla, G.S. (1981). Concentrations of striatal catecholamines in rats given manganese chloride through drinking water. J. Neurochem. 36: 683-687.

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

-Chiba, K., Kubota, E., Miyakawa, T., Kato, Y. and Ishizaki, T. (1988). Characterization of hepatic microsomal metabolism as an in vivo detoxication pathway of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mice. J. Pharmacol. Exp. Ther. 246: 1108-1115.

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

-Choudhuri, S., McKim, J.M., and Klaassen, C.D. (1993). Differential expression of the metallothionein gene in liver and brain of mice and rats. Toxicol. Appl. Pharmacol. 119: 1-10.

-Chvapil, M., Ryam, J.N. and Zukoshi, C.F. (1972). Effect of zinc on lipid peroxidation in liver microsomes and mitochondria. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 141: 150-153.

-Cohen, G. (1985). Oxidative stress in the nervous system. In: Sies H, de. Oxidative stress. London: Academic Press. 383-402.

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

-Coppen, D.E., Richardson, D.E. and Cousins, R.J. (1988). Zinc suppression of free radicals induced in cultures of rat hepatocytes by iron. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 189: 100-109.

-Cote, L.J. and Kremzner, L.T. (1983). Biochemical changes in normal aging in human brain. Adv. Neurol. 38: 19-30.

-Cousins, R. (1983). Metallothionein aspects related to copper and zinc metabolism. J. Inherited Metab. Dis. 6:15-21.

-D'Amato, R.J., Benham, D.F. and Snyder, S.H. (1987). Characterization of the binding of N-methyl-4-phenylpyridine, the toxic metabolite of the parkinsonian neurotoxin N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine to neuromelanin. J. Neuroche. 48: 653-658.

-Daniels, A., Lysling, K., and Abarca, J. (1981). Uptake and release of manganese by rat striatal slices. Biochem. Pharmacol. 30: 1833-1837.

-Davis, G.C., Williams, A.C., Markey, S.P., Ebert, M.H., Caine, E.D., Reichert, C.M. and Kopin, I.J. (1979). Chronic parkinsonism secondary intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry Res.* 1: 249-254.

-Dexter, D.T., Carter, C.J., Wells, F.R., Javoy-Agid, F., Agid, Y., Lees, A., Jenner, P. and Marsden, C.D. (1989). Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 52: 381-389.

-Dexter, D.T., Carayon, A., Javoy-Agid, F., Agid, Y., Wells, F.R., Daniels, S.E., Lees, A.J., Jenner, P. and Marsden, C.D. (1991). Alterations in the levels of iron, ferritin and other trace metals in Parkinson's disease and the other neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia. *Brain.* 114: 1953-1975.

-Diggory G.L., and Buckett, W.R. (1994). An automated method to measure monoamines and metabolites using elevated temperature reversed HPLC with electrochemical detection. Application to striatal dopamine and hippocampal serotonin turnover. *J. Pharmacol. Methods.* 11: 207-217.

-Di Monte, D., Sandy, M.S., Ekstrom, G. and Smith, M.T. (1986). Comparative studies on the mechanisms of paraquat and 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP+) cytotoxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 137: 303-309.

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

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

-Donaldson, J.(1981). The pathophysiology of trace metals: neurotransmitter interaction in the CNS. *Trends Pharmacol. Sci.* 2: 75-78.

-Donaldson, J., LaBella, F.S. and Gesser, D. (1981). Enhanced autoxidation of dopamine as possible basis of manganese neurotoxicity. *Neurotoxicology.* 2: 53-64.

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

-Durnam, D.M., Hoffman, J.S., Quaife, C.J., Benditt, E.P., Chen, H.Y., Brinster, R.L. and Palmiter, R.D. (1984). Induction of mouse metallothionein-I mRNA by bacterial endotoxin is independent of metals and glucocorticoid hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 81: 1053-1056.

-Dryer, S.E., Dryer, R.L. and Autor, A.P. (1980). Enhancement of mitochondrial cyanide-resistant superoxide dismutase in the livers of rats treated with 2,4-dinitrophenol. *J. Biol. Chem.* 255: 1054-1057.

-Ebadi, M. (1984). The presence of metallothionein-like protein (MLT) in rat brain. *Fedn. Proc.* 43: 3317.

-Ebadi, M. (1986a). Characterization of a metallothionein-like protein in rat brain. *Biol. Trace. Elem. Res.* 11: 101-116.

-Ebadi, M. (1986b). Biochemical alteration of a metallothionein-like protein in developing rat brain. *Biol. Trace Elem. Res.* 11: 117-128.

-Ebadi, M. and Babin, D. (1989). The amino acid composition of zinc-induced metallothionein isoforms in rat brain. *Neurochem. Res.* 14: 69-73.

-Ebadi, M., Takahashi, T. and Timmins, P. (1989b). The stimulation of metallothionein synthesis in neuroblastoma IMR-32 by zinc and cadmium but not by dexamethasone. *Biol. Trace Elem. Res.* 22: 233-246.

-Fahn, S. (1976). Biochemistry of the basal ganglia. *Adv. Neurol.* 14: 59-89.

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

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

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

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



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

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

-Garcia, E., Rios, C. and Sotelo, J. (1992). Ventricular injection of nerve growth factor increases dopamine content in the striata of MPTP-treated mice. *Neurochem. Res.* 17: 979-982.

-George, J.D., Rosen, G.M. and Rauckman, E.J. (1980). Lipid peroxidation: the role of hepatic FAD-monooxygenase. pages 541-562, in Simic M.G. and Kavel, M. (eds.), *Autoxidation in food and biological systems*. Plenum Publishing Corp., New York.

- Glowinski, J. and Iversen, L.L. (1966). Regional studies of catecholamines in the rat brain. Disposition of 3H-norepinephrine, 3H-dopamine, and 3H-DOPA in various regions of the brain. *J. Neurochem.* 13: 655-669.

-Goering, P.L. and Klaassen, C.B. (1984). Zinc-induced tolerance to cadmium hepatotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 74: 299-307.

- Good, M. and Vasak, M. (1986). Iron (II)-substituted metallothionein: Evidence for the existence of iron-thiolate clusters. *Biochemistry*. 25: 8353-8356.
  
- Graham, D.G. (1984). Catecholamine toxicity: A proposal for the molecular pathogenesis of manganese neurotoxicity and Parkinson's disease. *Neurotoxicology*. 5: 83-96.
  
- Greenstock, C.L., Jinot, C.P., Whitehouse, R.P. and Sargent, M.D. (1987). DNA radiation damage and its modification by metallothionein. *Free. Rad. Res. Comm.* 2: 233-239.
  
- Gupta, A., Morby, A.P., Turner, J.S., Whitton, B.A. and Robinson, N.J. (1993). Deletion within the metallothionein locus of cadmium-tolerant *Synechococcus* PCC 6301 involving a highly iterated palindrome (HHP1). *Molec. Microbiol.* 712: 189-195.
  
- Haley, J.J. and McCormick, W.G. (1957). Pharmacological effects produced by intracerebral injections of drugs in the conscious mouse. *Brit. J. Pharmacol.* 12: 12-15.
  
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. *Free radicals in biology and medicine*, Oxford-Clarendon. (1985).
  
- Hallman, H., Olson, L. and Jonsson, G. (1984). Neurotoxicity of the meperidine analogue N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine on brain catecholamine neurons in the mouse. *Eur. J. Pharmacol.* 97: 133-136.

- Hamer, D.H. (1986). Metallothionein. *Annu. Rev. Biochem.* 55: 913-951.
- Hao, R., Ceruti R., Blaxall, H.S., Rodriguez-Sierra, J.F., Pfeiffer, R.F. and Ebadi, M. (1994). Distribution of zinc metallothionein-I mRNA in rat brain by in situ hybridization. *Neurochem. res.* 19: 761-767.
- Harik, S.I., Schmidley, J.W., Lacofano, L.A., Blue, P., Arora, P.K. and Sayre, L.M. (1987). On the mechanisms underlying 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity: the effect of perinigral infusion of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, its metabolite and their analogs in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 241: 669-676.
- Hefti, F., Melamed, E. and Wurtman, R.J. (1980). Partial lesions of the dopaminergic nigrostriatal system in rat brain: Biochemical characterization *Brain Res.* 195: 123-137.
- Heikkila, R.E., Hess, A. and Duvoisin, R.C. (1984). Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mice. *Science.* 224: 1451-1453.
- Heikkila, R.E., Manzino, L., Cabbat, F.S. and Duvoisin, R.C. (1984a). Protection against the dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine by monoamine oxidase inhibitors. *Nature.* 311: 467-469.
- Heikkila, R.E., Nicklas, W.J. and Duvoisin, R.C. (1985). Dopaminergic toxicity after the stereotaxic administration of the 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+) to rats. *Neurosci. Lett.* 59: 135-140.

-Hidalgo, J., Campany, L., Borrás, M., Garvey, J.S. and Armario, A. (1988). Metallothionein response to stress in rats: Role in free radical scavenging. *Am. J. Physiol.* 255: E518-524.

-Hogstrand, C., Lithner, G. and Huax, C. (1991). The importance of metallothionein for the accumulation of copper, zinc and cadmium in environmentally exposed perch, *Perca fluviatilis*. *Pharmacol. Toxicol.* 68: 492-501.

-Hornykiewicz, O. (1982). Brain neurotransmitter changes in Parkinson's disease. In: Marsden CD, Fahn S, eds. *Movement disorders*, vol. 1. Boston: Butterworths. 41-58.

-Hornykiewicz, O. and Kish, S.J. (1987) in *Advances in Neurology*, vol. 45 (Yahr, M. and Bergman, K., eds), pp 19-34, Raven Press.

-Irwin, Y. and Langston, J.W. (1985). Selective accumulation of MPP<sup>+</sup> in the substantia nigra: A key to neurotoxicity? *Life Sci.* 36: 213-218.

-Irwin, Y., Langston, J.W. and DeLanney, L.E. (1987). 4-phenylpyridine (4PP) and MPTP: The relationship between striatal MPP<sup>+</sup> concentrations and neurotoxicity. *Life Sci.* 40: 731-740.

-Itoh, M. and Ebadi, M. (1982). The selective inhibition of hippocampal glutamic acid decarboxylase in zinc-treated epileptic seizures. *Neurochem. Res.* 7: 1287-1298.

- Jacobowitz, D.M., Burns, R.S., Chiueh, C.C. and Kopin, I.J. (1984). N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine causes destruction of the nigrostriatal but not the mesolimbic dopamine system in the monkey. *Psychopharmacol. Bull.* 20: 416-422.
- Javitch, J.A., D'Amato, R.J., Strittmatter, S.M. and Snyder, S.H. (1985). Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine by dopamine neurons explains selective toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82: 2173-2177.
- Javoy-Agid, F., Ruberg, M., Pique, L., Bertagna, Y., Taquet, H., Studler, J.M., Cesselin, F., Epelbaum, J. and Agid, Y. (1984a). Biochemistry of the hypothalamus in Parkinson's disease. *Neurology.* 34: 672-676.
- Jellinger, K., Grisold, N. and Vollmer, R. (1983). Hirnatrophie bei Morbus Parkinson und (pr) Seniler Demenz. In: *Fortschritte der Klinischen Neurologie*, edited by G. Schneberth and K. Pateisky, pp 151-164. G. Thieme, Stuttgart and New York.
- Jellinger, K. (1987). Overview of morphological changes in Parkinson's disease. In: *Advances in Neurology*. Vol. 45 pp 1-18. Yahr, M.A., and Bergmann, K.J., (Eds.). Raven Press.
- Jenner, P., Rupniak, N.W., Rose, S., Kelly, E., Kilpatrick, G., Lees, A. and Marsden, C.D. (1984). 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonism in the common marmoset. *Neurosci. Lett.* 50: 85-90.

-Johannessen, J.N., Chiueh, C.C., Burns, R.S. and Markey, S.P. (1985). Differences in the metabolism of MPTP in the rodent and primate parallel differences in sensitivity to its neurotoxic effects. *Life Sci.* 36: 219-224.

-Kägi, J.H.R. and Schäffer, A. (1988). Biochemistry of metallothionein. *Biochemistry.* 27: 8509-8515.

-Kandel, E.R. and Schwartz, J.M. (1985) pages 268-269. *Principles of neural science*, Elsevier, New York.

-Karin, M., Herschman, H.R. and Weinstein, D. (1980a). Primary induction of metallothionein by dexamethasone in cultured rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 92:1052-1059.

-Karin, M., Andersen, R.D. and Herschman, H.R. (1981). Induction of metallothionein mRNA in the HeLa cells by dexamethasone and by heavy metals. *Eur. J. Biochem.* 118: 527-531.

-Karin, M. and Richards, R.I. (1982). Human metallothionein genes-primary structure of the metallothionein-II gene and a related processed gene. *Nature.* 299: 797-802.

-Karina, B., Lohrer, H., Karin, M. and Herlich, P. (1990). Overexpressed human metallothionein IIA gene protects chinese hamster ovary cells from killing by alkylating agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 2710-2714.

-Kay, J., Cryer, A., Darke, B.M., Kille, P., Lees, N.E., Norey, C.G. and Sark, J.M. (1991). Naturally occurring and recombinant metallothioneins: Structure, immunoreactivity and metal-binding functions. *Int. J. Biochem.* 23: 1-5.

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

-Kish, S.J., Morito, C. and Hornykiewicz, O. (1985). Glutathione peroxidase activity in Parkinson's disease brain. *Neurosci. Lett.* 58: 343-346.

-Kissling, M.M. and Kägi, J.H.R. (1977). Primary structure of human hepatic metallothionein. *FEBS Lett.* 82: 247-250.

-Kono, Y., Takahashi, M. and Asada, K. (1976). Oxidation of manganous pyrophosphate by superoxide radicals and illuminated spinach chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.* 174: 454-461.

-Kontozoglou, T.E., Banerjee, D. and Cherian, M.G. (1989). Immunohistochemical localization of metallothionein in human testicular embryonal carcinoma cells. *Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.* 415: 545-549.

-Kopin I.J. (1986). Toxins and Parkinson's disease: MPTP parkinsonism in humans and animals. *Adv. Neurol.* 45: 137-144.

-Kotsonis, F.N. and Klaassen, C.D. (1979). Increase in hepatic metallothionein in rats treated with alkylating agent. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 51: 19-27.

-Langston, I.W., Ballard, P., Tetrud, J.W. and Irwin, Y. (1983). Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*. 219: 979-980.

-Langston, I.W., Forno, L.S., Robert, CS. and Irwin, Y. (1984). Selective nigral toxicity after systemic administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the squirrel monkey. *Brain Res*. 292: 390-394.

-Langston, J.W., Irwin, Y., Langston, E.B. and Forno, L.S. (1984a). Pargyline prevents MPTP-induced parkinsonism in primates. *Science*. 225: 1480-1482.

-Langston, J.W. (1985). MPTP and Parkinson's disease. *Trends in Neurosci*. 8: 79-83.

-Lazo, J.S., Kondo, Y., Dellapiazza, D., Michalska, A.E., Chook, H.A. and Pitt, B.R. (1995). Enhanced sensitivity to oxidative stress in cultured embryonic cells from transgenic mice deficient in metallothionein I and II genes. *J. Biol. Chem*. 270: 5506-5510.

-Lerner, M.R. and Goldman, R.S. (1987). Skin colour, MPTP, and Parkinson's disease. *Lancet*. 1: 212.

-Liccione, J. and Maines, M. (1988). Selective vulnerability of glutathione metabolism and cellular defense mechanisms in rat striatum to manganese. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 247: 156-161.



-Liccione, J.J. and Maines, D.M. (1989). Manganese-mediated increase in the rat brain mitochondrial cytochrome P-450 and drug metabolism activity: susceptibility of the striatum. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 248: 222-228.

-Lohrer, H. and Robson, T. (1989). Overexpression of metallothionein in CHO cells and its effect on cell killing by ionizing radiation and alkylating agent. *Carcinogenesis*, 10: 2279- 2284.

-Lyden, A., Bondesson, U., Larsson, B.S. and Lindquist, N.G. (1983). Melanin affinity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, an inducer of chronic parkinsonism in humans. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 53: 429-432.

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

-Margoshes, M. and Vallee, B.L. (1957). A cadmium protein from equine kidney cortex. *J. Am. Chem.Soc.* 79: 4813-4814.

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

-Matsubara, J. (1987). Alteration of radiosensitivity in metallothionein induced mice and a possible role of Zn-Cu thionein in GSH-peroxidase system. *Experientia Suppl.* 52: 603-612.

- McGeer, P. L., McGeer, E.G., Suzuki, J.S. (1977). Aging and extrapyramidal function. *Arch. Neurol.* 34: 33-35.
- Meister, A. (1983). Selective modification of glutathione metabolism. *Science.* 220: 472-477.
- Melamed, E., Youdim, M.B., Rosenthal, J., Spanier, Y., Uzzan, A. and Globus, M. (1985). In vivo effect of MPTP on monoamine oxidase activity in mouse striatum. *Brain Res.* 359: 360-363.
- Melamed, E., Rosenthal, J., Globus, M., Cohen, O., Frucht, Y. and Uzzan, A. (1985a). Mesolimbic dopaminergic neurons not spared by MPTP neurotoxicity in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 114: 97-100.
- Mello-Filho, A.C., Chubatsu, L.S. and Meneghini, R. (1988). V79 chinese hamster cells rendered to high cadmium concentration also become resistant to oxidative stress. *Biochem. J.* 256: 475-479.
- Mena, I., Marin, O., Fuenzalida, S. and Cotzias, G.C. (1967). Chronic manganese poisoning. *Neurology.* 17: 1123-1129.
- Mihatsch, W., Russ, H. and Przuntek, H. (1988). Intracerebroventricular administration of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion in mice: effects of simultaneously administered nomifensine, deprenyl, and 1-t-butyl-4,4-diphenylpiperidine. *J. Neural. Transm.* 71: 177-188.

-Miller, D.B., Reinhard, J.F., Daniels, A.J. and O' Callaghan, J.P. (1991). Diethyldithiocarbamate potentiates the neurotoxicity of in vivo 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and of in vitro 1-methyl-4-phenylpyridinium. *J. Neurochem.* 57: 541-549.

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

-Monger, K., Germann, U.A., Beltramini, M., Niedermann, D., Baitella-Eberle, G., Kägi, J.H.R. and Lerch, K. (1985). (Cu,Zn)-metallothioneins from fetal bovine liver. *J. Biol. Chem.* 260: 10032-10038.

-Müller, T., Schuckelt, R. and Jaenicke, L. (1991). Cadmium/zinc-metallothionein induces DNA strand breaks in vitro. *Arch. Toxicol.* 65: 20-26.

-Muñoz, B., Vormann, J. and Dieter, H.H. (1989). Characterization and development of metallothionein in fetal forelimbs, brain and liver from the mouse. *Toxicol. Lett.* 45: 83-91.

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

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

-Nakajima, K., Adachi, M., Kimura, M., Kobayashi, K. and Suzuki, K. (1989). Immunocytochemical studies of metallothionein -I in brain, retina, peripheral nerve and paraneuron. *J. Trace Elem. Exp. Med.* 2: 104.

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

-Nartey, N., Cherian, M.G. and Banerjee, D. (1987). Immunohistochemical localization of metallothionein in human thyroid tumors. *Am. J. Physiol.* 129: 177-182.

-Nicklas, W.J., Vyas, Y. and Heikkila, R.E. (1985). Inhibition of NAD<sup>+</sup>-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenylpyridine, a metabolite of the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity. *Neurosci. Lett.* 62: 389-394.

-Nishimura, H., Nishimura, N. and Tohyama, C. (1989). Immunohistochemical localization of metallothionein in developing rat tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 37: 715-722.

-Nishimura, N., Nishimura, H., Ghaffar, A. and Tohyama, C. (1992). Localization of metallothionein in the brain of rat and mouse. *J. Histochem. Cytochem.* 40: 309-315.

-Ochi, T. and Cerutti, P.A. (1989). differential effects of glutathione depletion and metallothionein induction on the induction of DNA single-strand breaks and cytotoxicity by tert-butyl hydroperoxide in cultured mammalian cells. *Chem. Biol. Interact.* 72: 335-345.

-Oh, S.H., Deagen, J.T., Whanger, P.D. and Weswig, D.H. (1978). Biological function of metallothionein. *Am. J. Physiol.* 234: E282-E285.

-Olafson, R.W., Sim, R.G. and Boto, K.G. (1979). Isolation and chemical characterization of the heavy metal-binding protein metallothionein from marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.* 62: 407-416.

-Palmiter, R.D. (1987). Molecular biology of metallothionein gene expression. *Experientia (Suppl.)*. 52: 63-60.

-Palmiter, R.D., Fidler, S.D., Whitmore, T.E. and Durnam, D.M. (1992). MT-III, a brain-specific member of the metallothionein gene family. *Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 6333-6337.

-Parkinson, J. (1817). *An essay on the shaking palsy*. London, Wittingham and Rowland.

-Perry, T.L., Godin, Dv., Hansen, S. (1982). Parkinson's disease: A disorder due to nigral glutathione deficiency?. *Neurosci. Lett.* 33: 305-310.

- Perry, T.L. and Yong, V.W. (1986). Idiopathic Parkinson's disease, progressive supranuclear palsy and glutathione metabolism in the substantia nigra of patients. *Neurosci. Lett.* 67: 269-274.
- Peterson, M.G. and Mercer, J.F.B. (1988). Differential expression of four linked sheep metallothionein genes. *Eur. J. Biochem.* 174: 425-429.
- Ploska, A., Taquet, H., Javoy-Agid, F., Gaspar, P., Cesselin, F., Berger, B., Hamon, M., Legrand, J.C. and Agid, Y. (1982). Dopamine and methionine-enkephalin in human brain. *Neurosci. Lett.* 33: 191-196.
- Poirier, J. and Barbeau, A. (1985). A catalyst function for MPTP in superoxide formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 131: 1284-1289.
- Quaife, C.J., Findley, S.D., Erickson, J.C., Forelick, G.J., Kelly, E.J., Zambrowicz, B.P., and Palmiter, R.D. (1994). Induction of a new metallothionein isoform (MT-IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia. *Biochemistry.* 33: 7250-7259.
- Ramsay, R.R. and Singer, T.P. (1986). Energy dependent uptake of N-methyl-4-phenylpyridinium, the neurotoxic metabolite of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine by mitochondria. *J. Biol. Chem.* 261: 7585-7587.
- Ramsay, R.R., McKeown, K.A., Johnson, E.A. Booth, R.G. and Singer, T.P. (1987). Inhibition of NADH oxidation by pyridine derivatives. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 146: 53-60.

- Riederer, P. and Wuketich, S. (1976). Time course of nigrostriatal degeneration in Parkinson's disease. *J. Neural. Transm.* 38: 277-301.
- Ríos, C. and Tapia, R. (1987). Changes in lipid peroxidation induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and 1-methyl-4-phenylpyridinium in mouse brain homogenates. *Neurosci. Lett.* 77: 321-326.
- Ríos, C., Alvarez-Vega, R. and Rojas, P. (1995). Depletion of copper and manganese in brain after MPTP treatment of mice. *Pharmacol. Toxicol.* 76: 348-352.
- Rojas, P., Altagracia, M., Kravzov, J. and Ríos, C. (1993). Amantadine increases striatal dopamine turnover in MPTP-treated mice. *Drug Dev. Res.* 29: 222-226.
- Rojas, P. and Ríos, C. (1993). Increased striatal lipid peroxidation after intracerebroventricular MPP+ administration to mice. *Pharmacol. Toxicol.* 72: 364-368.
- Saijoh, K., Kuno, T., Shuntoh, T., Tanaka, C. and Sumino, K. (1989). Molecular cloning of cDNA for rat brain metallothionein-II and regulation of its gene expression. *Pharmac. Toxic.* 64: 464-468.
- Saijoh, K., Katsuyama, H. and Sumino, K. (1994). Brain metallothionein gene expression and regulation. *Biol. Signals* 3: 150-156.
- Salach, J.I., Singer, T.P., Castagnoli, N. and Trevor, A. (1984). Oxidation of the neurotoxic amine by monoamine oxidases A and B and suicide inactivation of the enzymes by MPTP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 125: 831-835.

-Sato, M. and Bremner, Y. (1993). Oxygen free radicals and metallothionein. *Free Rad. Biol. Med.* 14: 325-337.

-Sayre, L.M., Arora, P.K., Lacofano, L.A. and Harik, S.I. (1986). Comparative toxicity of MPTP, MPP+ and 3,3-dimethyl-MPDP+ to dopaminergic neurons of the rat substantia nigra. *Eur. J. Pharmacol.* 124: 171-174.

-Sayre, L. (1989). Biochemical mechanism of action of the dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Toxicol. Lett.* 48: 121-149.

-Scatton, B., Javoy-Agid, F., Rouquier, L., Dubois, B. and Agid, Y. (1983). Reduction of cortical dopamine, noradrenaline, serotonin and their metabolites in Parkinson's disease. *Brain Res.* 275: 321-328.

-Scheuhammer, A.M. and Cherian, M.G. (1986). Quantification of metallothionein by a silver-saturation method. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 82: 417-425.

-Scheuhammer, A.M. and Cherian, M.G. (1991). Quantification of metallothionein by silver saturation. *Meth. Enzym.* 205: 80-83.

-Schinelli, S., Zuddas, A., Kopin, I.J. Barker, J.L. and Diporzio, U. (1988). 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine metabolism and 1-methyl-4-phenylpyridinium uptake in dissociated cell cultures from the embryonic mesencephalon. *J. Neurochem.* 50: 1900-1907.



- Schmidt, C.J., Matsuda, L.A. and Gibb, J.W. (1984). In vitro release of tritiated monoamines from rat CNS tissue by the neurotoxic compound 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Eur. J. Pharmacol.* 103: 255-260.
- Shaikh, Z.A., Kido, T., Kito, H., Honda, R. and Nogawa, K. (1990). Prevalence of metallothioneinuria among the population living in the kakhashi River basin in Japan- An epidemiological study. *Toxicology.* 64: 59-69.
- Shaikh, Z.A., Harnett, K.M., Perli, S.A: and Huang, P.C. (1989). Chronic cadmium intake results in dose-related excretion of metallothionein in murine. *Experientia.* 45: 146-148.
- Shiraga, H., Pfeiffer, R.F. and Ebadi, M. (1993). The effects of 6-hydroxydopamine and oxidative stress on the level of brain metallothionein. *Neurochem. Int.* 23: 561-566.
- Sinha, B.K., Singh, Y and Krishna, G. (1986). Formation of superoxide and hydroxyl radicals from 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP<sup>+</sup>): Reductive activation by NADPH cytochrome P-450 reductase. *Biochem. Res. Commun.* 583-588.
- Slivka, A. and Cohen, G. (1985). Hydroxyl radical attack on dopamine. *J. Biol. Chem.* 260: 15466-15472.
- Smith, M.T., Ekstrom, G., Sandy, M.S. and Di Monte, D. (1987). Studies on the mechanism of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine cytotoxicity in isolated hepatocytes. *Life Sci.* 40: 741-748.

- Snyder, S.H. and D'Amato, R.J. (1986). MPTP: a neurotoxin relevant to the pathophysiology of Parkinson's disease. *Neurology*. 36: 250-258.
- Steel, R.G.D. and Torrie, J.H. (1980). *Principles and procedures of statistics*. McGraw-Hill Inc., New York.
- Stern, Y. and Langston, J.W. (1985). Intellectual changes in patients with MPTP-induced parkinsonism. *Neurology*. 35: 1506-1509.
- Stern, Y., Tetrud, J., Langston, J.W. (1986). Intellectual changes in asymptomatic MPTP-exposed subject. *Ann. Neurol.* 20 (1): 170.
- Sugihira, N., Tohyama, C., Murakami, M. and Saito, H. (1986). Significance in increase in urinary metallothionein of rats repeatedly exposed to cadmium. *Toxicology* 41: 1-9.
- Sutcliffe, J.F. (1988). mRNA in the mammalian central nervous system. *Ann. Rev. Neurosci.* 11: 157-198.
- Suzuki, J., Mouri, T., Suzuki, Y., Nishiyama, K., Fujii, N. and Yano, H. (1975). Study of subacute toxicity of manganese dioxide in monkeys. *J. Exp. Med.* 22: 5-10.
- Suzuki, K., Nakajima, K., Kawaharada, U., Uehara, K., Hara, F., Otaki, N., Kimura, M. and Tamura, Y. (1992a). Metallothionein in the human brain. *Acta Histochem. Cytochem.* 25: 617-622.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

-Takeda, A., Norris, J.S., Iversen, P.L. and Ebadi, M. (1994). Antisense oligonucleotide of c-myc discriminates between zinc-and dexamethasone-induced synthesis of metallothionein. *Pharmacology*, 48: 119-126.

-Tamarkin, N.R., Goodwin, F.K., Axelrod, J. (1970). rapid elevation of biogenic amine metabolites in human CSF following probenecid administration. *Life Sci*. 9: 1397-1408.

-Tanner, C.M. (1989). The role of environmental toxins in the etiology of Parkinson's disease. *Trends Neurosci*. 12: 49-53.

- Thomas, J.P., Bachowski, G.L., Girotti, A.W. (1986). Inhibition of cell membrane lipid peroxidation by cadmium-and zinc-metallothionein. *Biochem. Biophys. Acta*. 884: 448-461.

- Thornalley, P.J. and Vasak, M. (1985). Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. *Biochim. Biophys. Acta*. 827: 36-44.

-Tsujikawa, K., Imai, T., Katutani, M., Kayamori, Y., Mimura, T., Otaki, N., Kimura, M.,m Fukuyama, R., Shimizu, N. (1991). Localization of metallothionein in nuclei of growing primary cultured adult rat hepatocytes. *FEBS Lett*. 283: 239-242.

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

-Vallee, B.L. and Falchuk, K.H. (1993). The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol. Rev.* 73: 79-118.

-Wakeyama, H., Takeshige, K., Takayanagi, R., Minukami, S. (1982). Superoxide-forming NADPH oxidase preparation of pig polymorphonuclear leukocytes. *Biochem. J.* 205:593-601.

-Weiner, N. and Molinoff, P. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular, and Medical Aspects*, 261-281, 5th Ed., edited by G. J. Siegel et al. published by Raven Press, Ltd., New York (1994).

-Welz, B., *Atomic spectroscopy*, H.F. Ebel (Ed), 44-52, Verlag-Chemie, New York (1976).

-Westlund, K.N., Denney, R.M., Kochersperger, L.M., Rose, R.M. and Abell, C.W. (1985) Distinct monoamine oxidase A and B populations in primate brain. *Science*. 230: 181-183.

-Winge, D.R., Nielson, K.B., Zeikus, R.D. and Gray, W.R. (1984). Structural characterization of the isoforms of neonatal and adult rat liver metallothionein. *J. Biol. Chem.* 259: 11419-11425.

-Wong, K.L. and Klaassen, C.D. (1979). Isolation and characterization of metallothionein which is highly concentrated in newborn rat liver. *J. Biol. Chem.* 254: 12339-12403.

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

-Wu, R., Chiueh, C.C., Pert, A. and Murphy, D.L.(1993). *Eur. J. Pharmacol.* 243: 241-247.

-Young, J.K., Garvey, J.S. and Huang, P.C. (1991). Glial immunoreactivity for metallothionein in the rat brain. *Glia.* 4: 602-610.

-Young, J.K. (1994). Glial Metallothionein. *Biol. Signals.* 3: 169-175.

-Yu, P.H. and Boulton, A.A.(1987). Irreversible inhibition of monoamine oxidase by some components of cigarette smoke. *Life Sci.* 41: 675-682.

**ANEXO 1**

3405

## Short-Term Manganese Pretreatment Partially Protects Against 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine Neurotoxicity

Patricia Rojas<sup>1</sup> and Camilo Rios<sup>1</sup>

(Accepted August 17, 1995)

1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) is a neurotoxin that induces parkinsonism in human and non-human primates. Its mechanism of action is not fully elucidated. Recently, the participation of trace metals, such as manganese, on its neurotoxic action has been postulated. In this work, we studied the effect of manganese administration on the neurochemical consequences of MPTP neurotoxic action. Male Swiss albino mice were treated with manganese chloride (MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O; 0.5 mg/mg or 1.0 mg/ml of drinking water) for 7 days, followed by three MPTP administrations (30 mg/kg, intraperitoneally). Seven days after the last MPTP administration, mice were sacrificed and dopamine and homovanillic acid contents in corpus striatum were analyzed. Striatal concentration of dopamine was found increased by 60% in mice pretreated with 0.5 mg/ml and 52% in the group treated of 1.0 mg/ml as compared versus animals treated with MPTP only. Homovanillic acid content in both groups treated with manganese was the same as those in control animals. The results indicate that manganese may interact with MPTP, producing an enhancement of striatal dopamine turnover, as the protective effect of manganese was more pronounced in the metabolite than in the neurotransmitter.

**KEY WORDS:** MPTP; Parkinson's disease; manganese; corpus striatum; MPP+

### INTRODUCTION

Manganese (Mn) is an essential transition metal (1) that crosses through the blood-brain barrier in both the adult animal and the developing rodent (2,3). Both the adult and the developing brain of the mammals normally contain small amounts of Mn (4). Dietary Mn deficiency results in a variety of structural and metabolic defects of the brain. Some CNS disorders have also been associated with Mn deficiency (5).

In experimental studies of short-term exposure to Mn, increased dopamine (DA), noradrenaline, homovanillic acid (HVA) and tyrosine hydroxylase in corpus

striatum have been reported (6-8). At very high levels of long-term manganese exposure, a significant diminution of these substrates and irreversible brain damage with neurological signs resembling those of Parkinson's disease are observed (9-11).

The biphasic effect of Mn, both stimulating and depressing monoamine metabolism in rats (6,9), may indicate that these effects are mediated by two different physical states of Mn *in vivo*: Mn (II) and Mn (III) (12).

Role of manganese in brain function is related to its effect on enzymes. For instance, it constitutes a part of the active sites of the mitochondrial enzyme superoxide-dismutase, that catalyzes oxygen free radicals metabolism (13). Another manganoprotein is glutamine synthetase which provides glutamine for amino acid neurotransmitter synthesis (14). Other enzymes and pro-

<sup>1</sup> Departamento de Neuroquímica, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, "Manuel Velasco Suárez" SS, Av. Insurgentes Sur No. 1877, México 14269, D.F.

tems in brain containing the metal can change when Mn is altered (13,15,16).

It is also thought that Mn affects striatal dopaminergic system through its action on ion channels:  $Mn^{2+}$  permeates presynaptic  $Ca^{2+}$  channels and induces dopamine release from depolarized nerve endings (17).

On the other hand, it is well known that 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) is a neurotoxin which induces a Parkinson-like syndrome in several animal species, including humans (18,19) non-human primates (20-22) and rodents (23-25). MPTP is a compound which selectively affects the dopaminergic neurons of the nigrostriatal pathway. The neurotoxic mechanism of the drug is not well understood, but its toxicity has been related to oxidative stress (26).

MPTP toxicity depends on its conversion to the toxic metabolite 1-methyl-4-phenylpyridinium ( $MPP^+$ ) by monoamine oxidase-B (27,28).  $MPP^+$  is accumulated into dopaminergic neurons by the high affinity dopamine uptake system (29,30).  $MPP^+$  is able to inhibit the oxidation of NADH-linked substrates in mitochondria (31,32).  $MPP^+$  enhances lipid peroxidation, a process dependent on free radicals overproduction (33,34).

Changes in trace elements such as manganese and other metals have been related to the pathogenesis of Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders (35). In a previous study, we reported a 19.5% decrease of Mn content in corpus striatum as a consequence of MPTP treatment of mice (36). In the present study, we administered Mn (II) as a pretreatment to mice prior to treating them either with MPTP or  $MPP^+$ , in order to assess the possible participation of  $Mn^{2+}$  in MPTP neurotoxicity.

## EXPERIMENTAL PROCEDURE

**Mn Pretreatment and MPTP Administration.** All experiments were conducted on male Swiss albino mice weighing 25-30 g and fed *ad libitum*. Mice were given free access to a drinking solution of  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  (0.5 mg/ml or 1.0 mg/ml of drinking water) for 7 days. Control mice received sodium chloride in the same concentration as manganese chloride for 7 days. After pretreatment, animals were administered intraperitoneally with MPTP (30 mg/Kg) daily for 3 days. The oral treatment with  $MnCl_2$  was maintained until the day of sacrifice. All animals were killed by cervical dislocation 7 days after the last administration of MPTP.

**Mn Pretreatment and  $MPP^+$  Administration.** An additional group of mice was injected with  $MnCl_2$  (0.4 mg/Kg, subcutaneous) and 24 hours later  $MPP^+$  was injected into the right lateral ventricle of animals as described by Haley and McCormick (37). All animals were administered with 1  $\mu$ l of solution containing 18  $\mu$ g of  $MPP^+$ . This amount has been shown to produce specific dopaminergic damage to mice (38). All animals were killed by cervical dislocation 48 hours after the  $MPP^+$  administration.

**Determination of DA and HVA Content.** Mice brains were removed quickly and their corpora striata were dissected out upon ice as described by Givinski and Iversen (39). An aliquot (500  $\mu$ l) of perchloric acid with metabisulfite solution (0.1%, w/v) was added to the tissue and disrupted with a Lab-line ultratip labsonic system (Lab-line instruments, Telrose Park, IL). Samples were then centrifuged at 4,000 g for 10 min and the supernatants were kept at  $-70^\circ C$  until analyzed.

Striatal content of DA and HVA were analyzed using HPLC system (LC 250 Perkin Elmer) with an electrochemical detector (Metrohm 656) and a Hewlett-Packard 3396-II integrator as described previously (40). Calibration curves were constructed for DA and HVA and their concentrations were obtained by interpolation in the respective standard curve. An Alkhn Associates, Inc. (Deerfield, IL) adsorbosphere catecholamine reversed column of (100  $\times$  4.8 mm with 3  $\mu$ m particle diameter) was used. The mobile phase was prepared with phosphate buffer (pH 3.2) containing 0.2 mM sodium octyl sulfate, 0.1 mM EDTA, and 1% (v/v) of methanol. The detector potential was adjusted to 0.8 V versus Ag/AgCl reference electrode. The results were expressed as  $\mu$ g of compound per gram of tissue.

**Analysis of Mn.** An additional group of mice was treated with  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  (0.5 mg/ml or 1.0 mg/ml of water) as previously described for 17 days. Mice were killed by cervical dislocation after treatment. For this group, manganese was analyzed in corpus striatum, as follows: All laboratory glassware, polypropylene tubes and disposable micropipette tips were immersed for several hours in 5% (v/v) concentrated  $HNO_3/H_2O$ , thoroughly rinsed in deionized water and nitrogen gas dried before use, to avoid any possible contamination. Stainless steel dissection instruments were cleaned by rapidly immersing them into 1% (v/v) nitric acid and thoroughly rinsing them with deionized water. Tissue samples (corpus striatum) were placed in the polypropylene tubes and digested in 500  $\mu$ l of concentrated  $HNO_3$  (Suprapur, E. Merck) in a shaking water bath at  $60^\circ C$  for 30 minutes, as described by Honilla (41). After digestion, a 100  $\mu$ l aliquot was taken from the clear solution and diluted 1:10 or 1:25 (v/v) with an aqueous solution containing 1% (w/v) ammonium hydrogen phosphate and 0.1% (w/v) Triton X-100. From this diluted solution, 20  $\mu$ l aliquots were taken to inject into the graphite furnace for Mn analysis. Calibration curve for Mn was constructed by adding known amounts of the respective Trisul (E. Merck) Atomic Absorption Spectrophotometric standard solution to brain tissue digested and diluted as described, in order to minimize any possible interference.

Analysis of the diluted samples was performed using a Perkin-Elmer 460 Atomic Absorption Spectrophotometer with HGA-2200 graphite furnace. A deuterium arc background corrector was used to compensate background signal. For both samples and standards, a 20  $\mu$ l aliquot of each final diluted solution was injected into the furnace. Furnace program was optimized by measuring the standards signal height at several temperature settings, for both char and atomization stages, according to the procedure of Welz (42).

**Statistical Analysis.** Data were statistically analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's test (43). Values of  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$  were considered of statistical significance.

## RESULTS

Mn administration to control mice produced non-significant increases in striatal DA at the different doses tested (Fig. 1) when compared with control animals. As

FALLA DE ORIGEN



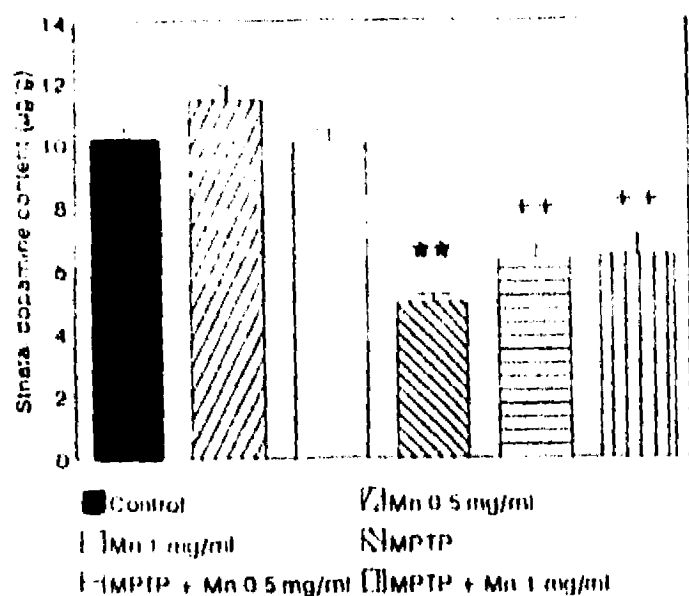


Fig. 1. Striatal dopamine content after MPTP treatment. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM of  $n = 5 - 7$  independent experiments. \*\* Statistically different from control,  $p < 0.01$ , Tukey's test. ++ Statistically different from control and MPTP groups  $p < 0.01$ , Tukey's test. Mn = manganese; MPTP = 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine.

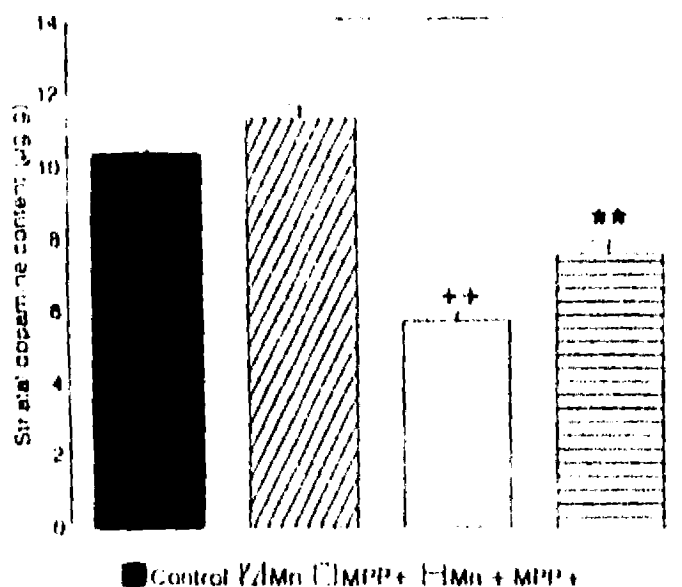


Fig. 2. Striatal dopamine content after MPP<sup>+</sup> treatment. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM of  $n = 5 - 7$  independent experiments. \*\* Statistically different from control,  $p < 0.01$ , Tukey's test. ++ Statistically different from control,  $p < 0.01$ , Tukey's test. Mn = manganese; MPP<sup>+</sup> = 1-methyl-4-phenylpyridinium.

shown in Fig. 1, a statistically significant reduction (41.3%) in DA levels in MPTP-treated mice ( $p < 0.01$ ) was found as a result of the neurotoxic action of the compound. In contrast, administration of Mn to MPTP-treated animals (Figure 1) partially prevented (60%) MPTP-induced DA lowering effect as compared to MPTP-treated group ( $p < 0.01$ ). This protective effect

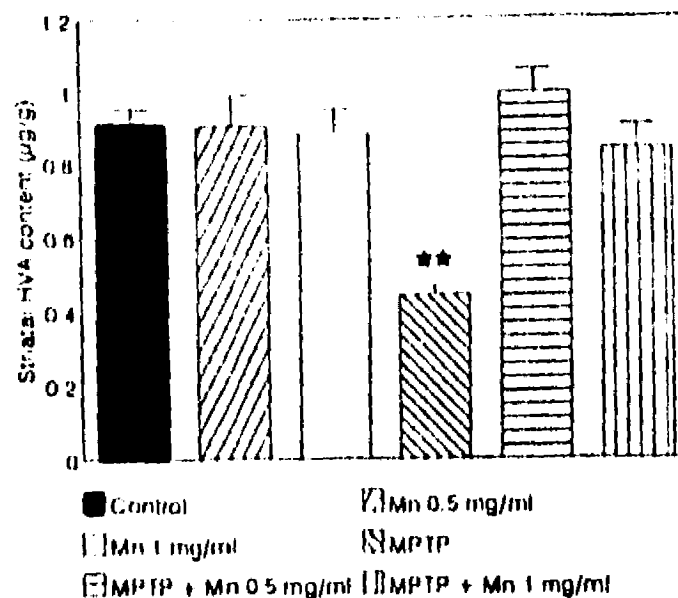


Fig. 3. Striatal homovanillic acid content after MPTP treatment. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM of  $n = 7 - 11$  independent experiments. \*\* Statistically different from control,  $p < 0.01$ , Tukey's test. Mn = manganese; MPTP = 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine.

seems to be not dose-dependent, as the 1 mg/ml dose did not protect more than the 0.5 mg/ml oral administration. Even a higher dose of 2 mg/ml applied as oral pretreatment to animals treated with MPTP was only partially protective against neurotoxicity (62% vs control animals; data not shown).

As seen from Fig. 2, there was a decline in striatal DA content (50%) in mice treated with MPP<sup>+</sup> as compared against control group ( $p < 0.01$ ). Mn pre-treatment antagonized the effect induced by MPP<sup>+</sup> on the DA concentration (33%) in corpus striatum indicating partial protection by Mn treatment.

Protection exerted by manganese pretreatment on striatal HVA content in corpus striatum was complete (Fig. 3), thus returning the HVA levels to the values observed in the groups not treated with MPTP. As in the case of DA content, dose-dependence of the Mn effect on HVA levels was not observed (Fig. 3).

Fig. 4 shows the results (shown in Figs. 1 and 3) expressed as the HVA/DA ratio, an estimation of DA turnover, in order to clarify the effect of Mn on striatal dopaminergic systems. Mn increased the HVA/DA ratio in the groups of mice treated with MPTP and at the different doses of Mn, suggesting that the main effect of Mn in this case was to induce an increment in the DA turnover rate in corpus striatum.

The concentration-related accumulation of Mn in corpus striatum at the two concentrations of Mn in the drinking water (0.5 mg/ml and 1 mg/ml) is shown in Fig. 5. At the highest dose there was an increase (42%)

FALLA DE ORIGEN

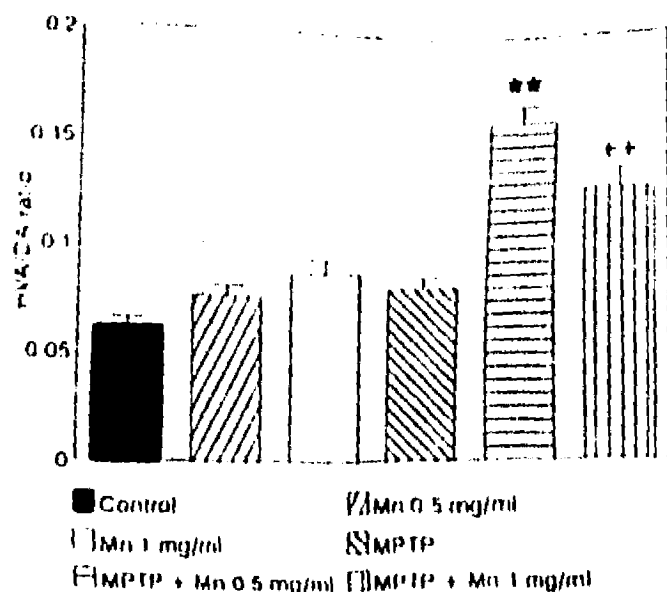


Fig. 4. HVA/DA ratio. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM of  $n = 5 - 7$  independent experiments. \*\* Statistically different from control,  $p < 0.01$ , Tukey's test. \*\* Statistically different from control and MPTP groups,  $p < 0.01$ , Tukey's test. Mn = manganese; MPTP = 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine.

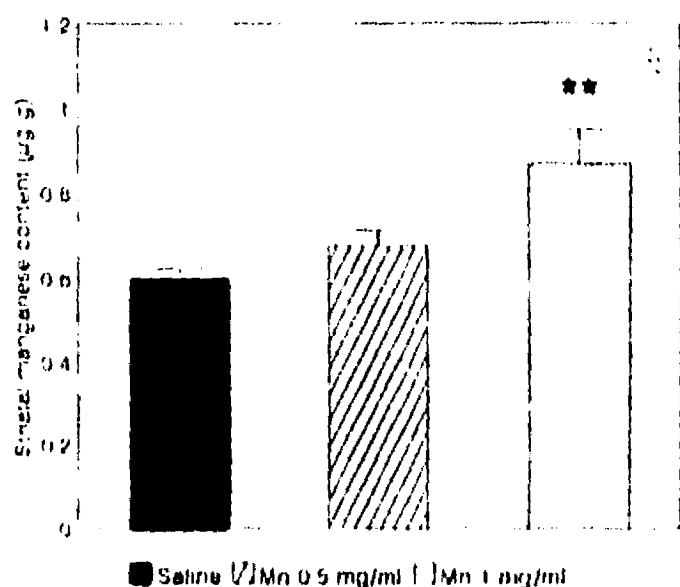


Fig. 5. Striatal manganese content. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM of  $n = 10 - 14$  independent experiments. \*\* Statistically different from control  $p < 0.01$ , Tukey's test. Mn = manganese.

as compared with control values ( $p < 0.01$ ). The lower dose induced an increased striatal Mn concentration by 14%, but the change was not statistically significant.

## DISCUSSION

Our results show that exogenously administered manganese chloride is able to slightly prevent the do-

pamine-lowering effect of both MPTP and MPP<sup>+</sup> administrations in mice. Remarkable increase in HVA content in corpus striatum (Figure 3) attained by Mn pretreatment suggests that Mn can also enhance DA turnover in MPTP-lesioned striatum.

The initial increase in striatal dopamine levels observed after manganese administration has been previously reported during subchronic manganese intoxication in the corpus striatum of rats and mice (6,9), and this result may indicate that these effects are mediated by the physical state of manganese *in vivo*. This metal can be an antioxidant or a powerful prooxidant depending on its oxidation state (44,45).

Divalent manganese is an effective scavenger of superoxide radicals (45,46). Additionally, since superoxide radicals, as well as hydroxyl radicals, stimulate lipid peroxidation (47), excess divalent manganese would likely inhibit the production of radicals that stimulates lipid peroxidation (47). Acute treatment with manganese chloride to neonatal rats decreases lipid peroxidation in various brain regions with almost complete reduction of this process in the corpus striatum (12), indicating the potent antioxidant activity of manganese on this region. In connection with this Mn-induced effect on lipid peroxidation, the protective effect of Mn in the corpus striatum observed in the present study could be attributed to the predominance of divalent manganese during acute and subacute administration. It is possible that divalent manganese effectively scavenges superoxide radicals (45,46,48) produced by MPTP treatment (36).

The partial protective effect of manganese chloride observed in this study was apparently not dose-dependent. This result suggest a saturation process in the protective action of Mn. However, it is necessary to study higher and lower exposures to manganese in order to conclude about dose-dependency. Striatal content of manganese was found slightly but non-significantly augmented after 0.5 mg/ml oral treatment to mice, yet significant protection against MPTP was observed at this dose, suggesting that perhaps total manganese content is a gross index of the manganese status of brain cells. As incoming manganese is accumulated preferentially by mitochondria (49), perhaps subcellular manganese is in fact increased at this dose, but this accumulation is still not reflected by total tissue manganese measured by us. After experimental exposure *in vivo*, Mn<sup>2+</sup> has been found to be taken up into mitochondria of liver (50) and brain corpus striatum (51), which preferentially accumulates Mn, acting as a buffer reservoir of the metal (52). Thus, as brain Mn becomes elevated, it accumulates preferentially in basal ganglia mitochondria (53-55), the postulated site of toxic action of MPP<sup>+</sup> (56).

FALLA DE ORIGEN

It is interesting to note that manganese is taken up by brain astrocytes (57), the putative site for MPTP biotransformation to MPP<sup>+</sup> (58), thus, manganese protective actions could be attributed to an interference with MPTP bioactivation by astrocytes. Nevertheless, results of the present study indicate that manganese also protects against MPP<sup>+</sup> neurotoxicity, indicating that the metal is acting directly on MPP<sup>+</sup>-induced neurotoxic processes rather than in MPTP biotransformation.

Manganese can interact with other transition metals, such as iron, zinc, and copper (59). In the particular case of copper, manganese overload increases its striatal content, and therefore an enhanced participation of copper in free radicals overproduction could be expected (60), that explains manganese protective effect against MPTP and MPP<sup>+</sup> neurotoxicity.

The increase of striatal HVA/DA ratio in MPTP-treated mice and pre-treated with Mn indicates the possibility of an increased turnover of DA produced by the metal pre-treatment. Some other drugs, such as amantadine (61), produces a similar effect on MPTP-treated mice.

Experimental studies have attempted to characterize the action of Mn on the dopaminergic system (62). They suggested that in weaning rats, the early stage (first month) of Mn accumulation in the basal ganglia (globus pallidus, putamen and caudate nucleus) is associated with an increased biosynthesis and turnover of brain dopamine as evidenced by an increased striatal content of DA and HVA (6,63) and a transient stimulatory effect on the activity of brain tyrosine hydroxylase (64). It has been proposed that Mn intoxication in humans might be due to increased levels and/or turnover of brain catecholamines (6).

One mechanism of action of MPTP has been related to transition metals deficiency. In a previous study, we found decreases of copper and manganese in striatum after MPTP treatment of mice (38). Additionally, diethyldithiocarbamate, a chelating agent of some metals, including Mn, inhibits superoxide dismutase, and potentiates MPTP and MPP<sup>+</sup> neurotoxicity (65).

It is interesting to note that, in post-mortem human studies, changes in trace metals such as copper, manganese and iron have been related to the pathogenesis of Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders. In the case of Mn, a slight lowering of the metal has been reported in corpus striatum and substantia nigra, this change was, however, not statistically significant (35). The present findings may indicate that short-term Mn treatment can attenuate oxidative stress in the striatum. The exact mechanism underlying the Mn-mediated effects remains to be elucidated.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank to Norma Rojas for their technical assistance. This study was supported in part by the Programa de Apoyo a las Divisiones de Estudios de Posgrado 030324, Universidad Nacional Autónoma de México. Patricia Rojas is recipient of a Scholarship from the CONACyT-Mexico 77785-1.

## REFERENCES

1. Prohaska, J. R. 1987. Functions of trace elements in brain metabolism. *Physiol. Rev.* 67:858-901.
2. Aschner, M., and Aschner, J. L. 1990. Manganese neurotoxicity: mechanisms of blood brain barrier transport. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 14:169-176.
3. Mena, L., Hornech, K., and López, G. 1974. Factors enhancing entrance of manganese into brain: iron deficiency and age. *J. Nucl. Med.* 15:516.
4. Cotzias, G. C., Hornech, K., Fuenzalida, S., and Mena, L. 1968. Chronic manganese poisoning: clearance of tissue manganese concentrations with persistence of the neurological picture. *Neurology* 18:376-382.
5. Carl, G. F., Keen, C. L., Gallagher, B. D., Legg, M. S., Littleton, W. H., Flannery, D. B., and Hurley, L. S. 1986. Association of low blood manganese concentration with epilepsy. *Neurology* 36:1584-1587.
6. Chandra, S. V., and Shukla, G. S. 1981. Concentrations of striatal catecholamines in rats given manganese chloride through drinking water. *J. Neurochem.* 36:683-687.
7. Donaldson, J., and La Bella, F. S. 1984. The effects of manganese on the cholinergic receptor in vivo and in vitro may be mediated through modulations of free radicals. *Neurotoxicology* 5:105-112.
8. Eriksson, H., Lemgren, S., Hellbronn, E. 1987. Effect of long-term administration of manganese on biogenic amine levels in discrete striatal regions of rat brain. *Arch. Toxicol.* 59:426-431.
9. Bonilla, E. 1980. L-tyrosine hydroxylase activity in the rat brain after chronic oral administration of manganese chloride. *Neurobehav. Toxicol.* 2:37-41.
10. Bonilla, E., and Prasad, A. L. N. 1984. Chronic manganese intake and levels of biogenic amines in rat brain. *Neurobehav. Toxicol.* 6:341-344.
11. Harbean, A. 1984. Manganese and extrapyramidal disorders. *Neurotoxicology* 5:13-36.
12. Donaldson, J., McGregor, D., and LaBella F. 1982. Manganese neurotoxicity: a model for free radical mediated neurodegeneration? *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 60:1398-1405.
13. Keen, C. L., Lommerdal, B., and Hurley, L. S. 1984. Pages 89-132. Manganese, in Frieden, E. (eds.), *Biochemistry of the essential ultratrace elements*, Plenum Press, New York.
14. Wedler, F. C., and Deontau, R. D. 1984. Glutamine synthetase from bovine brain is a manganese (II) enzyme. *Biochemistry* 23: 6389-6396.
15. Gupta, R. C., Khandelwal, R. L., and Sulakhe, P. V. 1984. Intrinsic phosphatase activity of bovine brain calmodulin requires a tightly bound trace metal. *FEBS Lett.* 169:251-255.
16. Qato, M. K., and Manes, M. D. 1985. Regulation of heme and drug metabolism activities in the brain by manganese. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 128:18-24.
17. Drapeau, P., and Nachsen, D. A. 1984. Manganese fluxes and manganese-dependent neurotransmitter release in presynaptic nerve endings isolated from rat brain. *J. Physiol.* 334:493-510.
18. Davis, G. C., Williams, A. C., Markey, S. P., Ebert, M. H., Carne, E. D., Reichert, C. M., and Kopin, I. J. 1979. Chronic parkinson-

- ism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatr. Res.* 1:249-251.
19. Langston, J. W., Ballard, P., Tetrud, J. W., and Irwin, I. 1983. Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 219:979-980.
  20. Burns, R. S., Chesse, C. C., Markey, S. P., Ebert, M. H., Jacobowitz, D. M., and Kopin, I. J. 1981. A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:4546-4550.
  21. Jenner, P., Rupniak, N. M. J., Rose, S., Kelly, E., Kilpatrick, G., Lees, A., and Marsden, C. D. 1984. 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonism in the common marmoset. *Neurosci. Lett.* 50:85-90.
  22. Langston, J. W., Form, L. S., Rebert, C. S., and Irwin, I. 1981. Selective nigral toxicity after systemic administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the squirrel monkey. *Brain Res.* 202:390-394.
  23. Hallman, U., Olson, L., and Jonsson, G. 1983. Neurotoxicity of the meperidine analogue N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine on brain catecholamine neurons in the mouse. *Eur. J. Pharmacol.* 97:133-136.
  24. Heikkilä, R. E., Hess, A., and Duvoisin, R. C. 1981. Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mice. *Science* 224:1451-1453.
  25. Jarvis, M. F., and Wagner, G. C. 1985. Age dependent effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Neuropharmacology* 24:581-583.
  26. Adams, J. D. Jr., and Odum, L. N. 1991. Oxygen free radicals and Parkinson's disease. *Free Rad. Biol. Med.* 10:161-169.
  27. Chiba, K., Trevor, A., and Castagnoli, N. 1984. Metabolism of the neurotoxic tertiary amine, MPTP, by brain monoamine oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120:574-578.
  28. Castagnoli, N., Chiba, K., and Trevor, A. J. 1985. Potential biotransformation pathways for the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Life Sci.* 36:225-230.
  29. Jayich, J. A., D'Amato, R. J., Stromwater, S. M., and Snyder, S. H. 1985. Parkinsonism-inducing neurotoxin N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine by dopamine neurons explains selective toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:2173-2177.
  30. Chiba, K., Trevor, A. J., and Castagnoli, N. 1985. Active uptake of MPP<sup>+</sup>, a metabolite of MPTP by brain synaptosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 128:1228-1232.
  31. Nicklas, W. J., Vyas, I., and Heikkilä, R. E. 1985. Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenylpyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Life Sci.* 36:2501-2508.
  32. Ramsay, R. R., Kowal, A. F., Johnson, M. K., Safahi, J. I., and Singer, T. P. 1987. The inhibition site of MPP<sup>+</sup>, the neurotoxic bioactivation product of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine is near the D-binding site of NADH dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* 259:645-649.
  33. Rios, C., and Tapia, R. 1987. Changes in lipid peroxidation induced by 1-methyl-4-phenylpyridinium in mouse brain homogenates. *Neurosci. Lett.* 77:121-126.
  34. Rojas, P., and Rios, C. 1991. Increased striatal lipid peroxidation after intracerebroventricular MPP<sup>+</sup> administration to mice. *Pharmacol. Toxicol.* 72:361-368.
  35. Dexter, D. T., Carayon, A., Javoy-Agid, F., Agid, Y., Wells-Dangels, E. R., Lees, A. J., Jenner, P., and Marsden, C. D. 1991. Alterations in the levels of iron, ferritin and other trace metals in Parkinson's disease and the other neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia. *Brain* 114:1953-1975.
  36. Rios, C., Alvarez-Vega, R., and Rojas, P. 1995. Depletion of copper and manganese in brain after MPP<sup>+</sup> treatment of mice. *Pharmacol. Toxicol.* 76:348-352.
  37. Haley, F. J., and McCormick, W. G. 1957. Pharmacological effects produced by intracerebral injections of drugs in the conscious mouse. *Brit. J. Pharmacol.* 12:12-15.
  38. Mihatsch, W., Ross, H., and Prumek, H. 1988. Intracerebroventricular administration of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion in mice: effects of simultaneously administered nomifensine, deprenyl, and 1-t-butyl-4-(1-diphenylpiperidine). *J. Neural. Transm.* 71:177-188.
  39. Glowinski, J., and Iversen, L. L. 1966. Regional studies of catecholamines in the rat brain. Disposition of 3H-norepinephrine, 3H-dopamine, and 3H-DOPA in various regions of the brain. *J. Neurochem.* 11:655-669.
  40. Garcia, E., Rios, C., and Sotelo, J. 1992. Ventricular injection of nerve growth factor increases dopamine content in the striata of MPTP-treated mice. *Neurochem. Res.* 17:979-982.
  41. Honella, E. 1978. Flameless atomic absorption spectrophotometric determination of manganese in rat brain and other tissues. *Chim. Chem.* 24:471-474.
  42. Welz, B. 1976. Atomic spectroscopy. Verlag-Chemie, Weinheim, New York.
  43. Steel, R. G. D., and Torrie, J. H. 1980. Principles and procedures of statistics. McGraw-Hill Inc., New York.
  44. Donaldson, J. 1981. The pathophysiology of trace metals: neurotransmitter interaction in the CNS. *Trends Pharmacol. Sci.* 2:75-78.
  45. Kono, Y., Takahashi, M., and Asada, K. 1976. Oxidation of manganese pyrophosphate by superoxide radicals and illuminated spinach chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.* 171:454-461.
  46. Archibald, F. S., and Fridovich, I. 1981. Manganese, superoxide dismutase and oxygen tolerance in some lactic acid bacteria. *J. Bacteriol.* 146:928-936.
  47. George, J. D., Rosen, G. M., and Rauckman, E. J. 1980. Lipid peroxidation: the role of hepatic P-450-monoxygenase. Pages 541-562. in Some M. G. and Kavel, M. (eds.), *Autoxidation in food and biological systems*. Plenum Publishing Corp., New York.
  48. Donaldson, J., Lattella, F. S., and Gesser, D. 1981. Enhanced autoxidation of dopamine as possible basis of manganese neurotoxicity. *Neurotoxicology* 2:51-64.
  49. Lacroix, J. J., Mames, D. M. 1989. Manganese-mediated increase in the rat brain mitochondrial cytochrome P-450 and drug metabolism activity: susceptibility of the striatum. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 248:222-228.
  50. Maynard, L. S., and Cotzias, G. C. 1955. Partition of Mn among organs and organelles of the rat. *J. Biol. Chem.* 214:489-495.
  51. Lacroix, J., and Mames, M. 1988. Selective vulnerability of glutathione metabolism and cellular defense mechanisms in rat striatum to manganese. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 247:156-161.
  52. Kandel, E. R., and Schwartz, E. H. 1985. Pages 268-269. Principles of neural science. Elsevier, New York.
  53. Suzuki, J., Mouri, T., Suzuki, Y., Nishiyama, K., Fuji, N., and Yano, H. 1975. Study of subacute toxicity of manganese dioxide in monkeys. *Fukuoka J. Exp. Med.* 22:5-10.
  54. Fahn, S. 1976. Biochemistry of the basal ganglia. *Adv. Neurol.* 11:59-89.
  55. Amstutz, N., Rochette, E., Dimas, P., Beley, A., Loreau, A., and Bralet, J. 1982. Dopamine and norepinephrine turnover in various regions of the rat brain after chronic MnCl<sub>2</sub> administration. *Toxicology* 24:175-182.
  56. Ramsay, R. R., and Singer, T. P. 1986. Energy-dependent uptake of N-methyl-4-phenylpyridinium, the neurotoxic metabolite of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, by mitochondria. *J. Biol. Chem.* 261:7585-7587.
  57. Haley, F. J., Ledig, M., Mandel, P., Sargentini, L., Frivold, A. H., Leroy, M., Giuppo, A. A., and Wedler, F. C. 1988. Concentrations of physiologically important metal ions in glial cells cultured from chick cerebral cortex. *Neurochem. Res.* 13:45-50.
  58. Gerlach, M., Riederer, P., Prumek, H., Youdim, M. B. H. 1991. MPP<sup>+</sup> mechanisms of neurotoxicity and their implications for Par-

FALLA DE ORIGEN

- inson's disease. *Eur. J. Pharmacol. Mol. Pharmacol.* 208:273-286.
59. Scheuhammer, A. M., and Cherian, M. G. 1982. Influence of chronic MnCl<sub>2</sub> and EDTA treatment on tissue levels and urinary excretion of trace metals in rats. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 11 (4):515-520.
60. Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. C. 1985. *Free radicals in biology and medicine.* Oxford:Clarendon.
61. Rojas, P., Allagracia M., Kravtsov J., and Rios C. 1993. Amantadine increases striatal dopamine turnover in MPTP-treated mice. *Drug Dev. Res.* 29:222-226.
62. Daniels, A. J., Lysling, K., and Abarca, J. 1981. Uptake and release of manganese by rat striatal slices. *Biochem. Pharmacol.* 30: 1833-1837.
63. Chandra, S. V., and Shukla, G. S. 1981: Concentrations of striatal catecholamines in rats given manganese chloride through drinking water. *J. Neurochem.* 36:683-687.
64. Bunilla, E. 1980. L-tyrosine hydroxylase activity in the rat brain after chronic oral administration of manganese chloride. *Neurobehav. Toxicol.* 2:37-41.
65. Miller, D. B., Reinhard, J. F., Daniels, A. J., and O'Callaghan J. P. 1991. Dithiolthiocarbamate potentiates the neurotoxicity of in vivo 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and of in vitro 1-methyl-4-phenylpyridinium. *J. Neurochem.* 57:541-549.

FALLA DE ORIGEN

**ANEXO 2**

## ROLE OF METALLOTHIONEIN IN MPTP NEUROTOXICITY

Patricia Rojas and Camilo Ríos

Departamento de Neuroquímica, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, "Manuel Velasco Suárez" , SS, Insurgentes Sur No. 3877, México 14269, D.F., México.

### Summary

MPTP is a drug that induces parkinsonism in human and non-human primates. Free radicals are thought to be involved in its mechanism of action. Recently, the participation of metallothionein as scavenger of free radicals has been proposed. In this work, we studied the effect of metallothionein inducers in MPTP neurotoxic action. Male swiss albino mice were pretreated either with cadmium (1 mg/kg) or dexamethasone (5 mg/kg), two well-known inducers of metallothionein synthesis, and 5 hours later with an MPTP administration (30 mg/Kg). Treatment schedule was repeated daily for either 3 or 5 consecutive days. All animals were killed 7 days after the last administration, and striatal dopamine and homovanillic acid contents were analyzed as an end-point of MPTP neurotoxicity. Striatal dopamine content of cadmium plus MPTP-treated animals (3-days) increased by 32%, and 48% (5-days) vs MPTP-alone animals. Dexamethasone plus MPTP-treated group also showed increased dopamine levels 28% (3-days) and 43% (5-days). MPTP treatment reduced striatal metallothionein concentration (49% vs control animals). Dexamethasone and cadmium increased metallothionein concentrations in MPTP-treated groups, by 77% and 82% respectively. Results suggest that metallothionein induction provide a significant resistance factor against the deleterious effect of MPTP.

**Key words:** 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine; Parkinson's disease; Metallothionein; Cadmium; Dexamethasone; Striatum

Metallothionein (MT) is a low-molecular-weight, sulfur-rich, inducible protein which exhibits high affinity for cadmium, zinc and other heavy metals (1). This protein is thought to be involved in regulating the metabolism of physiologically important trace metals, such as copper and zinc, detoxification of toxic metals, free radical scavenging and antioxidant role (2). The mammalian MT family is grouped in four isoforms: MT-I and MT-II are expressed in many tissues; MT-III isoform is expressed in human and mouse brains (3, 4), and

---

Camilo Ríos, PhD. Departamento de Neuroquímica, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, "Manuel Velasco Suárez", SS, Insurgentes Sur No. 3877, México 14269, D.F., México. Telephone and Fax (5) 606 4040.

MT-IV is expressed in stratified squamous epithelia (5). MT in the rat brain was identified, and characterized its properties (6, 7).

Although liver is the most responsive organ to MT induction, MT is also induced in other organs including brain, by various inducers as heavy metals, glucocorticoid hormones, acute stress, some organic chemicals, physical stress, and infection (4, 8, 9). Only MT-I and MT-II isoforms are induced by such agents.

On the other hand, it is well-known that 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) when administered to non-human primates and mice produces hypokinesia and neuronal damage similar to that observed in idiopathic Parkinson's disease (10).

MPTP also produces depletion of striatal dopamine and cellular degeneration of the nigrostriatal pathway, mimicking that observed in Parkinson's disease (11). The neurotoxic effect of MPTP is assessed by the DA and HVA depletory action of the neurotoxin (10). MPTP is biotransformed to the 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP<sup>+</sup>), its toxic metabolite, by type-B monoamine oxidase (12). MPP<sup>+</sup> is then accumulated into dopaminergic neurons by the high affinity dopamine uptake system (13). The neurotoxic mechanism of the MPTP metabolite is unknown, but its toxicity has been related to MPP<sup>+</sup> inhibition of site I mitochondrial respiration (14, 15) and/or to oxidative stress induction (16).

In previous studies, we found enhanced lipid peroxidation after MPP<sup>+</sup> administration to mice (17, 18), a process dependent of free radicals overproduction, and also a depletion of trace metal content in the MPTP model (19). MT is a protein related both with oxidative stress and trace metals, therefore, the purpose of the present study was to examine if the effects of MT inducers (cadmium and dexamethasone) can modulate MPTP neurotoxicity. Cadmium (Cd) and dexamethasone (Dex) were selected for the present study because they are both good inducers of MT and they are thought to mediate MT synthesis through different mechanisms (20, 21).

### Methods

Adult male swiss albino mice (25-30 g) NIH bred in-house were used in all the experiments. Animals were fed with Purina chow (Purina, México) and drank water freely. MPTP hydrochloride was obtained from Research Biochemicals (Wayland, MA, U.S.A), methanol was purchased from J.T. Baker, México, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, CdCl<sub>2</sub>, and sucrose were purchased from E.Merck, México and all other reagents were from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A).

#### MT inducers pretreatment and MPTP administration

Male swiss albino mice were injected i.p. with one of the MT inducers: Cd (1 mg/kg) or Dex (5 mg/kg) and allocated for MPTP intoxication (30 mg/Kg, i.p) into one of the following groups of mice: group I, control animals treated with saline solution; group II, animals injected with Cd; group III, animals injected with Dex; group IV, animals treated with saline solution and 5 hours later with MPTP; group V, animals injected with Dex and 5 hours later with MPTP; group VI, animals treated with Cd and 5 hours later with MPTP. Treatment schedule was repeated daily for either 3 or 5 consecutive days. All animals were killed by dislocation 7 days after the last administration and the striatal dopamine (DA) and homovanillic acid (HVA) contents were measured by HPLC system.



### Determination of DA and HVA

We analyzed striatal DA and HVA concentrations. Mice brains were removed quickly and their corpora striata were dissected out upon ice as described by Glowinski and Iversen (22). An aliquot (500  $\mu$ l) of antioxidant solution containing 0.1 % w/v Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> in 0.05 M perchloric acid was added to the tissue and sonicated with a Lab-line ultratip Labsonic system (Lab-line instruments, Microse Park, IL). Samples were centrifuged at 4,000 X g for 10 min and the supernatants were stored at -70°C until analyzed.

Striatal contents of DA and HVA were analyzed using HPLC- system (LC 250 Perkin-Elmer) with electrochemical detector (Metrohm 656) and Hewlett-Packard 3396-II integrator as previously described (19).

Calibration curves were constructed for DA and HVA. Sample concentrations were obtained by interpolation in the respective standard curve. An Alltech Associates, Inc. (Deerfield, IL), adsorbosphere catecholamine analytical column of 100 X 4.8 mm with 3  $\mu$ m particle diameter was used. The mobile phase consisted of aqueous phosphate buffer (pH 3.2) which contained 0.2 mM sodium acetyl sulfate, 0.1 mM EDTA, and 15 % v/v of methanol. Water and methanol were HPLC-grade reagents. Flow was 1.6 ml/min. The detector potential was adjusted to 0.8 V vs. Ag/AgCl reference electrode. All samples were analyzed in duplicate.

### Striatal estimation of MT proteins

The MT proteins concentration of each tissue sample was estimated by the silver-saturation method (23). This method measures all MT isoforms (MT I, II, III, and IV). Mice were killed by dislocation after MPTP treatment for 5 consecutive days as described above. MT proteins were analyzed in corpus striatum, as follows: all laboratory glassware, polypropylene tubes and disposable micropipette tips were immersed for several hours in 5% v/v concentrated HNO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O thoroughly rinsed in deionized water and nitrogen gas dried before use, to avoid any possible contamination. Stainless steel dissection material was cleaned with a rapid immersion in 3% v/v nitric acid and thoroughly rinsed with deionized water prior to its use. Tissue samples of corpus striatum were homogenized in 500  $\mu$ l of ice-cold 0.05 M phosphate buffer (pH 7.0) containing 0.015 M NaCl and 0.145 KCl. Silver ion aqueous solution (20 mg/L, 250  $\mu$ l) was added to tissue extract (500  $\mu$ l) to bind cytosolic proteins and other ligands including MT proteins. Rat hemoglobin (200  $\mu$ l) was added and samples boiled for 2 minutes to precipitate silver excess. Only silver bound to MT proteins is left in the supernatant after two repeated hemoglobin-boiling treatments. MT proteins concentration was calculated from silver concentration in the supernatant as determined by atomic absorption analysis using a Perkin-Elmer 360 Atomic Absorption Spectrophotometer with HGA-2200 graphite furnace. A deuterium arc background corrector was used to compensate background signal. For both samples and standards, a 20  $\mu$ l aliquot of each final diluted solution was injected into the furnace. Furnace program was optimized by measuring the standards signal height at several temperature settings, for both char and atomization stages, according to the procedure of Welz (24). MT proteins detection limit was about 5  $\mu$ g MT/g wet tissue.

Statistical analysis. Data of DA and HVA values were statistically analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's test. Results of MT proteins were analyzed

by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnet's test. Values of  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$  were considered of statistical significance.

### Results

We observed no change in either weight gain, water and food consumption in any treatment group.

Neither Cd nor Dex administrations during 3 or 5 days changed dopamine content in striatum as compared to values of respective control mice (Table I).

A significantly decrease in striatal DA was observed in the group of mice with 3 days of MPTP treatment (Table I), as a result of the neurotoxic action of the compound. Administration of Cd plus MPTP to animals for 3 days, partially protected (32% compared to respective MPTP group) animals against the neurotoxic effect of MPTP (Table I). The same treatment for 5 days increased DA content by 48% as compared with the respective MPTP-alone group (Table I).

Dexamethasone-pretreated mice plus MPTP showed significant protection both in the 3 and 5 days of treatment groups, expressed as enhanced DA levels of 28% and 43%, respectively, against MPTP-treated mice values (Table I).

The HVA content in the striatum of mice with 3 days (Table I) of MPTP treatment decreased, no differences were found in the HVA levels of all other groups. The HVA contents in the striata of mice with 5 days of treatment (Table I) was found decreased significantly in MPTP-alone group when compared with values of control animals. Cd + MPTP and Dex + MPTP groups showed increased striatal HVA levels (85% and 65% respectively) as compared with respective MPTP-treated group values.

Mice exposed to cadmium showed a two-fold increase in their striatal MT proteins concentration (figure 1). Mice exposed to Dex had also an approximately two-fold increase in their striatal MT proteins concentration (figure 1). In contrast, the levels of MT proteins were reduced (49% vs control group values) in the striata of MPTP-treated mice (figure 1).

Cd + MPTP treatment resulted in a significant increase in MT proteins content. A marked elevation (77% as compared to MPTP-alone values) of MT proteins concentration was also observed in the striata of mice with Dex + MPTP treatment.

### Discussion

The present study shows for the first time that Dex and Cd, both metallothionein inducers, can protect mice against MPTP neurotoxicity, measured as dopamine depletion. Even when DA depletion after MPTP was not severe, it is interesting to note that the protection of MT inducers was more important (in percentage) at the highest MPTP dose used. The MT-inducers protection to mice observed in the present study could be due to the putative action of metallothionein as hydroxyl radical scavenger (25), as cytotoxic hydroxyl radicals are overproduced in vivo by MPTP administration to rodents (26). It is interesting to remark that both Cd and Dex administrations to mice enhanced MT striatal content by a similar amount, and that these treatments protected almost by the same extent against MPTP neurotoxicity, suggesting that protective effects of Cd and Dex

are mediated by MT.

**TABLE I.**

**Effect of metallothionein inducers on MPTP neurotoxicity after either 3 or 5 days of treatment.**

	DA	% of change	HVA	% of change
Control (3 days)	9.30 +/- 0.30	-	0.83 +/- 0.035	-
Control (5 days)	9.52 +/- 0.51	-	0.90 +/- 0.030	-
Cd (3 days)	9.62 +/- 0.47	-	0.75 +/- 0.057	-
Cd (5 days)	10.02 +/- 0.46	-	0.75 +/- 0.070	-
Dex (3 days)	9.72 +/- 0.35	-	0.78 +/- 0.042	-
Dex (5 days)	8.80 +/- 0.30	-	0.60 +/- 0.060	-
MPTP (3 days)	5.97 +/- 0.55	++ (-36%) vs control	0.60 +/- 0.040	+ (-27.5%) vs control
MPTP (5 days)	4.22 +/- 0.37	++ (-55%) vs control	0.40 +/- 0.020	++ (-56%) vs control
MPTP + Cd (3 days)	7.88 +/- 0.56	* (+32%) vs MPTP	0.72 +/- 0.018	-
MPTP + Cd (5 days)	6.22 +/- 0.53	* (+48%) vs MPTP	0.74 +/- 0.040	** (+85%) vs MPTP
MPTP + Dex (3 days)	7.65 +/- 0.33	* (+28%) vs MPTP	0.79 +/- 0.062	-
MPTP + Dex (5 days)	5.95 +/- 0.37	* (+43%) vs MPTP	0.66 +/- 0.030	** (+65%) vs MPTP

Results are expressed as  $\mu\text{g}$  of DA or HVA/ g of wet weight. Mean +/- one standard error mean of n=5-7 mice per group. \* Different versus MPTP  $p < 0.05$ , \*\* Different versus MPTP  $p < 0.01$ . Different versus control  $p < 0.05$ , ++ Different versus control  $p < 0.01$ ,  $p < 0.01$ , Tukey's test. Cd=cadmium, Dex=dexamethasone.

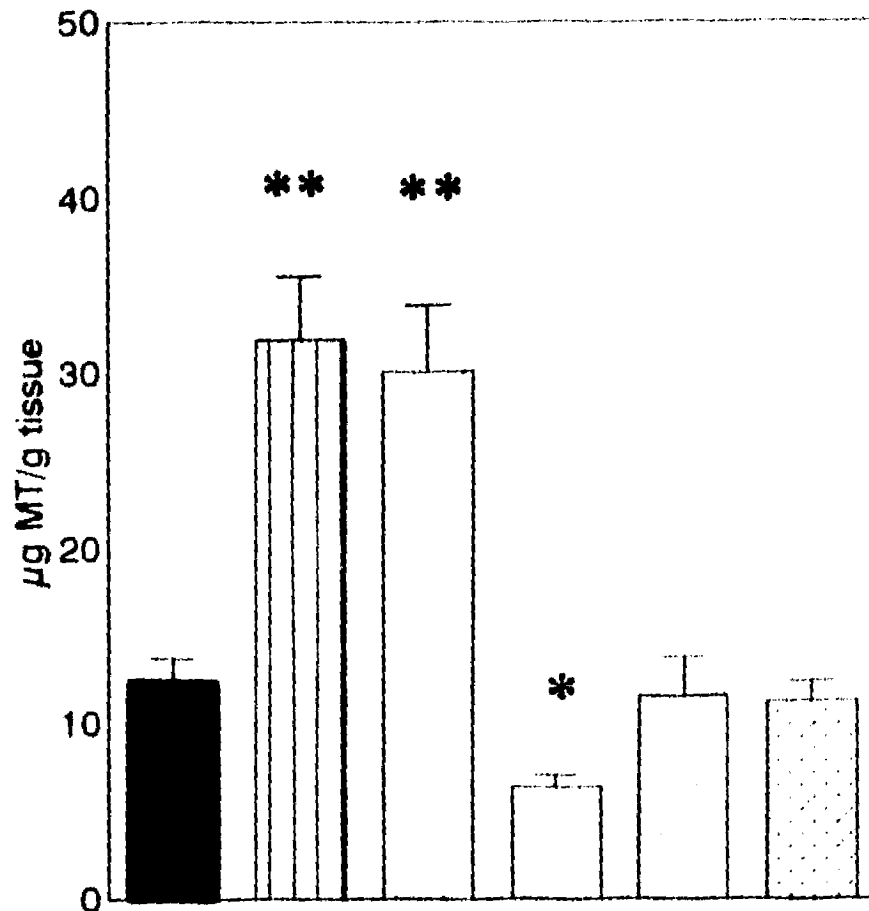


Fig. 1

■ Control      ▨ Cd      □ Dex  
 ▤ MPTP      ▩ MPTP+Cd      ▤ MPTP+Dex

Metallothionein concentrations ( $\mu\text{g MT/g tissue}$ ). Results are mean  $\pm$  S.E.M. of  $n=5-7$  mice. \*\* Different from control  $p<0.01$ , \* Different from control  $p<0.05$ , Dunnet's test. Dex=dexamethasone.

Recent observations suggest that MT might participate in intracellular defenses, as a response against reactive oxygen species overproduction in brain. It has been reported that chemicals that produce oxidative stress can induce the synthesis of MT (27).

MPTP is related to oxidative stress since its toxic metabolite,  $\text{MPP}^+$ , is able to increase lipid peroxidation (17, 18), and to decrease copper and manganese in corpus striatum after MPTP administration (19). It is possible that MT, that binds metals such as copper and zinc, plays an important role in protecting dopaminergic neurons from free radicals induced by MPTP.

Oxidant stress is not only the result of reactive oxygen species overproduction, it is also the consequence of decreased mechanisms of cells' protection (28). A constant finding in the literature is that MPTP neurotoxicity is associated to a decreased brain concentration of reduced glutathione (29), a well-known thiol-dependent cellular mechanism of defense against oxygen reactive species (28). In this regard, it is interesting to note that striatal MT content was also found decreased in the present work, as a result of MPTP treatment to mice, suggesting decreased thiol-related defenses against free radicals, associated to MPTP action. 6-hydroxydopamine also

reduces MT concentration in the striatum (30), the same effect we observed in this study for MPTP.

It has been proposed recently that the nucleophilic sulfhydryl groups in MT can interact with electrophilic toxins and, by regulating the intracellular redox potential, may also act as a scavenger of free radicals (2). A deficiency in MT-I and II genes produces enhanced sensitivity to oxidative stress (31), it is expected a low ability of MPTP-treated mice to control reactive oxygen species overproduction.

In addition to reduce thiol-related defense mechanisms of cells, decreased striatal content of MT as a result of MPTP action can explain in part the observed depletion of copper and manganese striatal contents produced by MPTP in mice (19), as both transition metals are thought to be regulated by MT.

The effect of MPTP on striatal MT content remains to be explained, however, data presented here suggest that MPTP interferes with MT synthesis, as both basal and induced (by Cd and Dex) MT contents were reduced by MPTP treatment to mice.

Parkinson's disease has been associated with oxidative stress (32), reduced thiol-related defenses (33) and also to changes in trace metals concentrations, specially depletion of copper (34). Both increased lipid peroxidation and copper depletion have also been reported in the substantia nigra of Parkinson's disease patients *post mortem* (35). All these findings suggest the existence of similar mechanisms of damage both in idiopathic Parkinson's disease patients and in MPTP-induced neurotoxicity, thus, results presented here suggest that a possible alteration of MT in such patients could be expected.

#### Acknowledgments

We thank to Norma Rojas and Gisela Cahero for their technical assistance. We also thank to Dr. Arnulfo Albores for his technical assistance to analyze MT. This study was supported in part by CONACyT grant 0044P-M9506 and the Programa de Apoyo a las Divisiones de Estudios de Posgrado 030324, Universidad Nacional Autónoma de México.

#### References

1. J.H.R. KÄGI and A. SCHAFFER, *Biochemistry* **27** 8509-8515 (1988).
2. M. SATO and I. BREMNER, *Free Rad. Biol. Med.* **14** 325-337 (1993).
3. Y. UCHIDA, K. TAKIO, K. TITANI, Y. IHARA, and M. TOMONAGA, *Neuron* **7** 337-347 (1991).
4. R.D. PALMITER, S.D. FIDLEY, T.E. WHITMORE and D.M. DURHAM, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89** 6333-6337 (1992).
5. C.J. QUARRE, S.D. FIDLEY, J.C. ERICKSON, G.J. FORELICK, E.J. KELLY, B.P. ZAMBROWICZ and R.D. PALMITER, *Biochemistry* **33** 7250-7259 (1994).
6. M. EBADI, *Biol. Trace Elem. Res.* **11** 101-116 (1986).
7. M. EBADI and D. BABIN, *Neurochem. Res.* **14** 69-73 (1989).
8. J.HIDALGO, M. BORRAS, J.S. GARVEY and A. ARMARIO, *J. Neurochem.* **55** 651-654 (1990).
9. S. CHOUDHURI, J.M. McKIM, Jr., and C. KLAASSEN, *Toxicol. Pharmacol.* **119** : 1-10

(1993).

10. R.E. HEIKKILA, F.S. CABBAT, L. MANZINO, and R.C. DUVOISIN, *Neuropharmacology* 23 711-713 (1984).
11. M. GERLACH, P. RIEDERER, H. PRZUNTEK, and M.B.H. YODIM, *Eur. J. Pharmacol. Mol. Pharmacol.* 208 273-286 (1991).
12. K. CHIBA, A. TREVOR and N. Jr CASTAGNOLI, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120 574-578 (1984).
13. K. CHIBA, A.J. TREVOR and N. Jr. CASTAGNOLI, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 128 1228-1232 (1985).
14. N.J. NICKLAS, I. VYAS and R.E. HEIKKILA, *Life Sci.* 36 2503-2508 (1985).
15. R.R. RAMSAY, A.T. KOWAL, M.K. JOHNSON, J.I. SALACH and T.P. SINGER, *Arch. Biochem. Biophys.* 259 645-649 (1987).
16. J.D. ADAMS and I.N. ODUNZE, *Biochem. Pharmacol.* 41 1099-1105 (1991).
17. C. RIOS and R. TAPIA, *Neurosci. Lett.* 77 321-326 (1987).
18. P. ROJAS and C. RIOS, *Pharmacol. Toxicol.* 72 364-368 (1993).
19. C. RIOS, R. ALVAREZ-VEGA and P. ROJAS, *Pharmacol. Toxicol.* 76 348-352 (1995).
20. G.K. ANDREWS, *Prog. Food Nutr. Sci.* 14 193-258 (1990).
21. J. LIU, Y.P. LIU, L.E. SENDELBACH and C.D. KLAASSEN, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 109 235-240 (1991).
22. J. GLOWINSKI and L.L. IVERSEN, *J. Neurochem.* 13 655-669 (1966).
23. A.M. SCHEUHAMMER and M.G. CHERIAN, *Meth. Enzym.* 205 80-83 (1991).
24. B. WELZ, *Atomic spectroscopy*, H.F. Ebel (Ed), 44-52, Verlag-Chemie, New York (1976).
25. P.J. THORNALLEY and K. VASAK, *Biochim. Biophys. Acta.* 827 36-47 (1985).
26. R. WU, C.C. CHUEH, A. PERT and D.L. MURPHY, *Eur. J. Pharmacol.* 243 241-247 (1993).
27. J.W. BAUMAN, J. LIU, P. LIU and C.D. KLAASSEN, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 110 347-354 (1991).
28. B. HALLIWELL and J.M.C. GUTTERIDGE, *Free radicals in biology and medicine*, Oxford-Clarendon (1985).
29. T.N. FERRARO, G.T. GOLDEN, M. DEMATTEI, T.A. HARE and R.G. FARIELLO, *Neuropharmacology.* 25 1071-1074 (1986).
30. H. SHIRAGA, R.F. PFEIFFER and M. EBADI, *Neurochem. Int.* 23 561-566 (1993).
31. J.S. LAZO, Y. KONDO, D. DELLAPIAZZA, A.E. MICHALSKA, H.A. CHOOK and B.R. PITT, *J. Biol. Chem.* 270 5506-5510 (1995).
32. B. HALLIWELL, *Acta Neurol. Scand.* 126 23-33 (1989).
33. T.L. PERRY, D.V. GODIN and S. HASAN, *Neurosci. Lett.* 33 305-310 (1982).
34. D.T. DEXTER, A. CARAYON, F. JAVOY-AGID, Y. AGID, F.R. WELLS, S.E. DANIELS, A.J. LEES, P. JENNER and C.D. MARSDEN, *Brain* 114 1953-1975 (1991).
35. D.T. DEXTER, C.J. CARTER and F.R. WELLS, *J. Neurochem.* 52 381-389 (1989).

**ANEXO 3**



## EXPRESSION AND REGULATION OF BRAIN METALLOTHIONEIN\*

M. EBADI<sup>1,2†</sup>, P. L. IVERSEN<sup>1</sup>, R. HAO<sup>1‡</sup>, D. R. CERUTIS<sup>1</sup>, P. ROJAS<sup>1</sup>,  
 H. K. HAPPE<sup>1</sup>, L. C. MURRIN<sup>1,2</sup> and R. F. PFEIFFER<sup>1,2‡</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacology and <sup>2</sup>Section of Neurology, University of Nebraska College of Medicine, 600 South 42nd Street, Omaha, NE 68198-6260, U.S.A.

(Received 1 August 1994; accepted 20 November 1994)

**Abstract**—Many, but not all, zinc-containing neurons in the brain are a subclass of the glutamatergic neurons, and they are found predominantly in the telencephalon. These neurons store zinc in their presynaptic terminals and release it by a calcium-dependent mechanism. These “vesicular” pools of zinc are viewed as endogenous modulators of ligand- and voltage-gated ion channels. Metallothioneins (MTs) are low molecular weight zinc-binding proteins consisting of 25–30% cysteine, with no aromatic amino acids or disulfide bonds. The areas of the brain containing high contents of zinc such as the retina, the pineal gland, and the hippocampus synthesize unique isoforms of MT on a continuous basis. The four MT isoforms are thought to provide the neurons and glial elements with mechanisms to distribute, donate, and sequester zinc at presynaptic terminals; or buffer the excess zinc at synaptic junctions. In this cause, glutathione disulfide may participate in releasing zinc from MT. A similar nucleotide and amino acid sequence has made it difficult to obtain cDNA probes and antibodies capable of distinguishing indisputably among MT isoforms. MT-I and MT-II isoforms are found in the brain and in the peripheral tissues; MT-III isoform, possessing an additional seven amino acids, is expressed mostly in the brain and to a very minute extent in the intestine and pancreas; whereas MT-IV isoform is found in tissues containing stratified squamous epithelial cells. Since MTs are expressed in neurons that sequester zinc in their synaptic vesicles, the regulation of the expression of MT isoforms is extremely important in terms of maintaining the steady-state level of zinc and controlling redox potentials. The concentration of zinc has been shown to be altered in an extensive number of disorders of the central nervous system, including alcoholism, Alzheimer-type dementia, amyotrophic lateral sclerosis, Down’s syndrome, epilepsy, Friedreich’s ataxia, Guillaine-Barré syndrome, hepatic encephalopathy, multiple sclerosis, Parkinson’s disease, Pick’s disease, retinitis pigmentosa, retinal dystrophy, schizophrenia, and Wernicke-Korsakoff syndrome. The status of MT isoforms and other low molecular weight zinc-binding proteins in these conditions, diseases, disorders, or syndromes is being delineated at this time. Since several of these disorders, such as amyotrophic lateral sclerosis, are associated with oxidative stress, and since MT is able to prevent the formation of free radicals, it is believed that cytokine-induced induction of MT provides a long-lasting protection to avert oxidative damage.

### NEUROANATOMY OF ZINC-CONTAINING NEURONS

With the exception of calcium and magnesium, zinc is the most abundant cation in the brain. In addition to protein-bound zinc designated as the “structural pool of zinc” and enzyme-bound zinc designated as the “metabolic pool of zinc”, the brain contains a

unique synaptosomal pool of zinc designated the “vesicular pool of zinc”. This latter and restricted pool of zinc is found in zinc-containing neurons of the limbic, cerebrocortical, and corticofugal systems. These zinc-containing neurons are able to concentrate zinc in their terminals and release it in a calcium- and impulse-dependent manner (Perez-Clausell and Danscher, 1986). The denervation of these neurons reduces the concentrations of zinc in the distal boutons (Haug *et al.*, 1971). The high affinity uptake of zinc takes place in the axonal boutons (Howell and Fredrickson, 1984). The preponderance of the zinc-containing axonal boutons are found in the caudate-putamen, cerebral cortex, and associated limbic nuclei

\* This is one of ten original manuscripts on the subject of “metallothionein”. Professor M. Ebadi (University of Nebraska Medical School) acted as organizer and executive editor in the refereeing of these articles.

† Author to whom all correspondence should be addressed.

‡ Present address: Department of Neurology, University of Tennessee College of Medicine, 855 Monroe Avenue, Room 415, Memphis, TN 38163, U.S.A.



of the telencephalon (Frederickson, 1990; Frederickson *et al.*, 1992; Frederickson and Moncrieff, 1994).

#### ASSOCIATION OF ZINC-CONTAINING NEURONS AND GLUTAMATE-CONTAINING NEURONS

No zinc-containing somata are found among cholinergic pathways (Howell and Frederickson, 1989; Slomianka *et al.*, 1990; Howell *et al.*, 1991; Christensen *et al.*, 1992; Mandava *et al.*, 1993). In contrast, glutamatergic pathways are zinc-containing pathways and zinc and glutamate are co-localized in the same boutons (Frederickson and Danscher, 1988, 1990; Howell and Frederickson, 1989; Frederickson, 1990; Slomianka *et al.*, 1990; Howell *et al.*, 1991; Beaulieu *et al.*, 1992; Christensen *et al.*, 1992; Mandava *et al.*, 1993; Moos, 1993). Moreover, zinc is an endogenous modulator of ligand- and voltage-gated ion channels. The AMPA receptor-mediated EPSC is unaffected by 300  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$ , whereas the NMDA receptor is completely blocked by  $\text{Zn}^{2+}$ . The  $\text{GABA}_A$  receptor-mediated IPSC is unaltered by  $\text{Zn}^{2+}$ , whereas the IPSC of  $\text{GABA}_B$  receptor is enhanced by 300  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  (for a review and references see Harrison and Gibbons, 1994).

#### NEUROCHEMISTRY OF ZINC

Zinc is an integral component of numerous proteins, influencing all aspects of molecular and cellular biology, and regulating events over a wide range of physiological parameters (Vallee, 1988). This development owes much to advances in the instrumental analysis of zinc, that have generated extraordinarily low detection limits, and to the advent of high-resolution methods for the isolation, purification, and characterization of macromolecules such as zinc fingers, and other transcription factors. Moreover, a large and diverse number of zinc-containing enzymes and proteins have been recognized to participate in the metabolism of proteins, nucleic acids, carbohydrates, and lipids. Identification of these zinc molecules and the elucidation of their biochemistry, together with information generated in the areas of nutrition, physiology, medicine, and pathology, have converged to establish a consolidated body of knowledge on the importance of zinc metabolism (Vallee and Falchuk, 1993; Ebadi *et al.*, 1994; Walsh *et al.*, 1994).

#### ZINC AND METALLOENZYMES

Zinc is required for the optimum function of as many as 300 enzymes (Vallee and Auld, 1990). The

role of zinc in these metalloenzymes includes participation in catalytic functions, maintenance of structural stability, and regulatory functions (Vallee, 1988). Zinc metalloenzymes are involved in the formation or hydrolysis of each of the major classes of endogenous compounds (proteins, lipids, carbohydrates, etc.) and includes representatives from each of the six categories of enzymes of the International Union of Biochemistry.

#### ZINC AND NUCLEIC ACID METABOLISM

The interaction of zinc with proteins helps explain another critical function of zinc in biological systems, the regulation of DNA and RNA synthesis (Wu and Wu, 1987; Evans and Hollenberg, 1988; Berg, 1990; South and Summers, 1990). By coordination with cysteine and histidine residues in certain proteins, zinc confers on the complex a tertiary structure which has an affinity for unique stretches of DNA in promoter gene regions. The configurations include zinc fingers, the most common zinc motif, and the more recently characterized zinc thiolate cluster, seen in GAL4 (two zinc, six cysteine). A model of the three dimensional interaction of a zinc finger-binding protein with DNA, based on X-ray crystallographic analysis, has been published (Pavletich and Pabo, 1991). The  $\alpha$ -helix of the finger loops was found to sit in the major groove of  $\beta$ -DNA (one loop per groove) with the primary contact at a three base-pair subsite. Binding at these sites enhances DNA transcription and increases synthesis of the protein product of that messenger RNA sequence. Quantitative analysis for zinc content has definitively established the presence of zinc in the DNA-binding proteins, TFIIA, the glucocorticoid receptor, GAL4, and g32P. The amino acid sequences of many other DNA-binding proteins (estimated at more than 150) contain homologous cysteine- and/or histidine-containing sites, suggestive of a critical structural role for zinc (Walsh *et al.*, 1994 for a review).

#### ZINC AND SYNAPTIC EVENTS

Recent evidence indicates that zinc plays a modulating role in synaptic transmission by interacting with specific sites on ionotropic neurotransmitter receptor proteins. For example, Celentano *et al.* (1991) have demonstrated in spinal cord neurons that extracellular zinc inhibits  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) receptor function by an allosteric mechanism. Zinc has also been shown to interact with the *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor at a unique extracellular site distinct from other modulators like

magnesium or glycine. In cultured hippocampal neurons, zinc, in micromolar concentrations, acts as a noncompetitive antagonist of NMDA-induced increased membrane conductance (Westbrook and Mayer, 1987). Zinc, in normal physiological conditions, is believed to affect synaptic transmission in certain areas of the central nervous system, such as the hippocampus where it is concentrated in pre-synaptic vesicles, and on release inhibits GABA<sub>B</sub> receptor activation (Xie and Smart, 1991). Therefore, the normal role of zinc in the brain is clearly complex, since it acts as an inhibitory modulator at receptors for both inhibitory (GABA) and excitatory (glutamate/NMDA) neurotransmitters.

#### ZINC AND PROTEIN KINASE C

Protein kinase C (PKC), a phospholipid- and calcium-dependent protein kinase, plays crucial roles in transmitting biochemical signals from the surface and transducing them to the interior of cells. PKC participates in a wide spectrum of neuronal processes including neuronal development, modulation of ion channel activity and signal transduction system, neurotransmitter synthesis and release, and synaptic plasticity. The PKC family consists of the originally described  $\alpha$ - $\beta$ <sub>1</sub>,  $\beta$ <sub>11</sub>,  $\gamma$  PKC (Group A enzymes) and the recently identified, but less characterized  $\delta$ ,  $\xi$ ,  $\zeta$ , and  $\eta$ (L) PKC (Group B enzymes). PKC possesses a regulatory domain with one or more zinc finger-like structures and a basic pseudo substrate prototype. Various growth factors, neurotransmitters and hormones elicit the breakdown of inositol 1,4,5-triphosphate to produce diacylglycerol and inositol 1,4,5-triphosphate, which results in mobilization of calcium from intracellular stores. Group A enzymes are activated by calcium, phospholipid, and diacylglycerol, whereas the Group B enzymes are calcium-independent. Zinc enhances the activity of PKC and activation of PKC leads to induction of MT messenger RNA (Ebadi *et al.*, 1993 for a review).

#### ZINC AND OXIDATIVE REACTIONS

Active oxygen radicals are continually produced in tissues by the action of the mitochondrial electron transport system and of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase. Several antioxidant defense systems prevent damage to the tissues by oxygen radicals. These systems include a range of specific antioxidants such as catalase for hydrogen peroxide, superoxide dismutase for superoxide, and glutathione peroxidases for hydrogen per-

oxide and lipid peroxide, and nonspecific antioxidants such as reduced glutathione, ceruloplasmin and transferrin (Sato and Bremner, 1993).

By using electron spin resonance spectrometry (ESR) and mouse brain mitochondria, Hiramatsu *et al.* (1994) have shown that 6-hydroxydopamine, a neurotoxic substance which destroys dopaminergic neurons, produces oxygen free radicals. Since MT is able to regulate the intracellular redox potential, we have undertaken a group of experiments to see whether or not 6-hydroxydopamine could alter the level of zinc and MT. 6-Hydroxydopamine (8  $\mu$ g in 4  $\mu$ l 0.02% ascorbic acid) reduced the level of zinc and MT in the striatum, but not in other brain regions tested. Dopamine plus selegiline increased the synthesis of MT in Chang cells as judged by enhanced incorporation of [<sup>35</sup>S]cysteine into MT. The effect of 6-hydroxydopamine in stimulating the synthesis of MT was similar to that of zinc, known to enhance the synthesis of MT, and to that of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and FeSO<sub>4</sub>, known to generate free radicals. The results of these experiments prove additional evidence that zinc or zinc MT are altered in conditions where oxidative stress has taken place (Shiraga *et al.*, 1993). Moreover, areas of brain, such as striatum containing high concentrations of iron, but low levels of MT are particularly vulnerable to oxidative stress (Rojas-Castaneda *et al.*, 1994).

#### BIOCHEMISTRY OF METALLOTHIONEIN

Metallothionein (MT) was discovered in 1957, when Margoshes and Vallee identified, in equine kidney, a protein responsible for accumulation of cadmium (for a historical review and references, see Kāgi and Schäffer, 1988; Vallee and Falchuk, 1993). Since then, it has been learned that all living organisms have developed efficient mechanisms to utilize essential trace elements such as zinc and copper in expressing their biological functions, and to minimize the cytotoxicity of nonessential post-transition metal ions such as cadmium and barium. The ability to bind excess metals and to limit concentration of "free" ions is achieved mostly by cysteine-rich polypeptides such as  $\gamma$ -glutamyl peptide (phytochelatin) found in plants, and MTs found in animals (Cousins, 1985; Harner, 1986; Bremner, 1987; Kāgi and Kojima, 1987; Kāgi and Hunziker, 1989; Bremner and Beattie, 1990; Vallee and Falchuk, 1993).

#### COMPOSITION OF METALLOTHIONEIN

Since MTs have no enzymatic functions, they have been traditionally classified according to their struc-

tural features, including possessing the following characteristics: high content of heavy metals (typically 4–12 atoms/molecule) bound exclusively by clusters of thiolate bonds; high content of cysteine (typically 23–33 mol%) and paucity of aromatic and hydrophobic amino acid residues; low molecular weight (typically less than 10,000 Da); and demonstrated structural or functional homology to mammalian metallothionein (Hamer, 1986).

All vertebrates examined contain two or more distinct metallothionein isoforms, which are grouped into two classes designated MT-I and MT-II depending on the elution position from DEAE-cellulose. In many cases, each class actually consists of several different isoproteins which are designated MT-I<sub>A</sub>, MT-I<sub>B</sub>, MT-I<sub>C</sub>, etc. Classification of proteins as members of the MT-I or MT-II class is based upon structural or functional homology, especially when comparing proteins from divergent species, such as rodents versus primates (Hamer, 1986). MT-III, a brain-specific MT, is not expressed in the peripheral tissues (Uchida *et al.*, 1991; Palmiter *et al.*, 1992). MT-IV is expressed in tissues containing stratified squamous epithelial cells (Quaife *et al.*, 1994).

#### POLYMORPHISM OF METALLOTHIONEIN

MT is defined as a metal-binding protein containing several specific features, such as a low molecular weight, a high metal content, a high cysteine content, no aromatic amino acid, and the spectroscopic features of metal thiolates. This broad definition provides three classifications for MTs as phenotypically-related metal thiolate polypeptides. These are:

- Class I Polypeptides with locations of cysteine closely related to those in equine renal MTs;
- Class II Polypeptides with locations of cysteine only distantly related to those in equine renal MT, such as yeast MT; and
- Class III Atypical, non-translationally, synthesized metal thiolate polypeptides, such as cadystin, phytometallothionein, or phytochelatin.

All Class I and Class II MTs characterized thus far are single chain proteins with chain lengths weighing approximately 6000 Da. The metal composition of MT is high, usually a total of six or seven equivalents, and varies from tissue to tissue (Kägi and Kojima, 1987).

#### AMINO ACID SEQUENCES OF METALLOTHIONEIN

All Class I and II MTs characterized thus far are single chain proteins. Mammalian forms contain 61–62 amino acid residues; chicken and sea urchin MTs contain 63 and 64 residues, respectively. Shorter chains are found in invertebrates and in certain fungi. The shortest one, with 25 residues, has been detected in *Neurospora crassa*. Class III MTs are often oligomeric structures made up of two or more polypeptide chains of variable length. Amino acid sequences are now known for at least 36 Class I metallothioneins, for 4 Class II metallothioneins, and for 2 homologous sets of Class III metallothioneins (Kägi and Kojima, 1987).

#### STRUCTURE OF METALLOTHIONEIN

The structure of MT has been studied by a variety of biophysical and biochemical techniques including UV, CD, ESR, and NMR spectroscopy, amino acid sequencing and partial proteolysis and, most recently, by X-ray crystallography (see Hamer, 1986, for a review and references). Mammalian MT is a 61- or 68-amino acid peptide containing 20 cysteines, 6–8 lysines, 7–10 serines, a single acetylated methionine at the amino terminus, and no aromatic amino acids or histidine residues. The majority of cysteine residues are present in Cys-X-Cys and Cys-Cys sequences. The metal content of purified MT is highly variable and depends on organism, tissue, and history of heavy metal exposure. For example, MT isolated from human liver autopsy samples contains zinc almost exclusively, whereas MT from kidney contains substantial levels of cadmium and copper. These differences probably reflect both the natural heavy metal exposure of the organs and the expression of different MT isoforms. MT isolated from cells or organisms that have been experimentally exposed to inducing levels of heavy metals contain predominantly, but not exclusively, the administered metal. For example, MT-II isolated from the liver of cadmium-treated rats contains 5 atoms of cadmium and 2 of zinc.

Metals are associated with MT exclusively through thiolate bonds to all 20 cysteine residues. The metals can be removed by exposure to low pH and the resulting apothionein can be reconstituted with 7 atoms of zinc.

The zinc in MT are contained in two distinct, polynuclear clusters whose existence was initially inferred from <sup>113</sup>Cd-NMR studies. The A cluster contains 11 cysteines, binds 4 atoms of zinc, and is contained within the carboxy-terminal  $\alpha$  domain extending from

amino acid 31 to 61. The B cluster contains 9 cysteines, binds 4 atoms of zinc, and is contained in the amino-terminal  $\beta$  domain extending from amino acid 1 to 30 (Hamer, 1986; Kay *et al.*, 1991).

#### MOLECULAR BIOLOGY OF METALLOTHIONEIN GENE EXPRESSION

The MT genes have been isolated from a number of organisms and the molecular analysis of their expression has been completed. MT genes are expressed in most tissues of most organisms studied (Karin *et al.*, 1984; Taplitz *et al.*, 1986; Andrews *et al.*, 1987; Mokdad *et al.*, 1987; Palmiter, 1987; Wilkinson and Nemer, 1987; Blaylock *et al.*, 1988; Peterson *et al.*, 1988; Peterson and Mercer, 1988; Sadhu and Gedamu, 1988; Huibregtse *et al.*, 1989; Schroeder and Cousins, 1990; Kille *et al.*, 1991; Huckle *et al.*, 1993; Turner *et al.*, 1993).

In some cells they are transcriptionally inactive, apparently as a consequence of DNA methylation. In those cells that can express MT genes, they are transcriptionally regulated by metals, glucocorticoids, and/or several polypeptide hormones. However, MT-III and MT-IV are less responsive to inducing agents and have a more restricted pattern of expression (Palmiter *et al.*, 1992; Kobayashi *et al.*, 1993; Quaipe *et al.*, 1994). Moreover, in certain tissues the induction of MT is a highly specific phenomenon. For example, in the bone marrow, the expression of MT is dependent on dietary zinc but not on interleukin-1 or interleukin-6 (Huber and Cousins, 1993). Some of the DNA sequences that allow a response of these stimuli have been identified in the 5' flanking region of the MT genes. Because the MT promoter can direct a high level of metal-inducible expression in a variety of cell types, it has been linked to many different structural genes and these fusion genes have been introduced into tissue culture cells and into the germline of animals. "The analysis of metallothionein gene regulation and its applications to genetic engineering have introduced this fascinating system to a much wider scientific community" (Palmiter, 1987). For example, MT-III is expressed in neurons that sequester zinc in their synaptic vesicles (Masters *et al.*, 1994). MT-III, a brain-specific member of the metallothionein gene family, binds zinc and may facilitate the storage of zinc in neurons. The distribution of MT-III mRNA within the adult brain was determined by solution and *in situ* hybridization and compared to that of MT-I mRNA. MT-III mRNA is particularly abundant within the cerebral cortex, hippocampus, amygdala, and nuclei at base of the cerebellum. Transgenic mice

generated using 11.5 kb of the mouse MT-III 5' flanking region fused to the *E. coli lacZ* gene express  $\beta$ -galactosidase in many of the same regions identified by *in situ* hybridization. MT-III mRNA was present in readily identifiable neurons within the olfactory bulb, hippocampus, and cerebellum, and  $\beta$ -galactosidase activity was localized in neurons throughout the brain, but not to glia, as determined by costaining with X-Gal and neural- and glia-specific antibodies. There is marked correspondence between the neurons that are rich in MT-III mRNA and those neurons that store zinc in their terminal vesicles. MT-III is found complexed with zinc *in vivo* and its expression in cultured cells leads to the intracellular accumulation of zinc and enhanced histochemical detection of zinc (Masters *et al.*, 1994).

#### GLUTATHIONE AND METALLOTHIONEIN

Glutathione and other  $\gamma$ -glutamyl compounds function in a number of important cellular processes, which include maintaining the activities of important enzymes such as  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase,  $\gamma$ -glutamylcyclotransferase, 5-oxoprolinase,  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase, glutathione synthetase, dipeptidase, glutathione S-transferase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, and transhydrogenases. In addition, glutathione participates in amino acid transport, in protection from harmful oxidative species; and in detoxification of xenobiotics (Meister, 1983).

Maret (1994) has provided evidence that glutathione disulfide releases zinc from MT. To what extent glutathione and MT coparticipate in zinc-related synaptic events remains to be delineated.

#### DISCOVERY OF METALLOTHIONEIN IN BRAIN

The discovery of a low molecular weight zinc-binding- and zinc-inducible protein in the rat brain in our laboratory (Itoh *et al.*, 1983) and its designation as a metallothionein-like protein (Ebadi, 1984) was a fortuitous observation that took place while attempting to comprehend the mechanism of convulsive seizures associated with Pick's disease, a rare neurological disorder, which allegedly results in higher than normal accumulation of zinc in the hippocampus, causing inhibition of GABA transmission. In one study, Itoh and Ebadi (1982) showed that the intracerebroventricular (i.c.v.) administration of zinc sulfate (0.3  $\mu$ mol/10  $\mu$ l) caused seizures that were prevented by GABA, but not by other putative transmitters. During the course of our investigation, some

interesting observations were made. The administration of substantially larger doses of zinc sulfate (up to 100 mg/kg), given either intravenously (i.v.) or intraperitoneally (i.p.), did not cause convulsive seizures in rats. Since the convulsive dose of 0.3  $\mu\text{m}/10 \mu\text{l}$  of zinc sulfate was considerably lower than the concentrations of zinc found in 14 regions of rat brain (Ebadi *et al.*, 1981), we postulated that most of the zinc in the brain was bound and did not exist in "free" form. Based on these observations and conclusions, we searched for and identified metallothionein in the rat brain and characterized its properties (Ebadi and Pfeiffer, 1984; Ebadi *et al.*, 1984, 1989a, 1994a,b; Ebadi, 1986a,b, 1991; Ebadi and Hama, 1986; Ebadi and Swanson, 1987; Ebadi and Babin, 1989).

#### INDUCTION OF RAT BRAIN METALLOTHIONEIN USING SURGICALLY IMPLANTED MINIPUMP

The i.p. administration of zinc sulfate (7.5 mg/kg) given either in a single dose (Itoh *et al.*, 1983) or daily for 10 days (Ebadi, 1986a) does not stimulate the synthesis of brain MT. On the other hand, the i.c.v. administration of zinc sulfate (0.20  $\mu\text{mol}/\mu\text{l}/\text{h}$  for 48 h) not only induces the synthesis of brain metallothionein, but also induces the synthesis of hepatic MT (Ebadi, 1986a; Table 1).

The efflux of excess zinc from the brain and its induction of hepatic MT adds further credence to the hypothesis that the steady-state concentration of zinc in the brain is regulated firmly. Similarly, Nishimura *et al.* (1992) reported that the s.c. injection of cadmium or zinc did not significantly increase the level of MT immunoreactivity in the rat brain. The lack of induction of brain MT by i.p. administration of zinc originally reported by Itoh *et al.* (1983) has been confirmed by Heilmaier and Summer (1985), Arvidson and Tjälve (1986), Hidalgo *et al.* (1991), and Itano *et al.* (1991). The choroid plexus, whose MT is induced by

heavy metals (Itano *et al.*, 1991; Zheng *et al.*, 1991) plays a major role in guarding against penetration and accumulation of excess metal in the brain.

Since the i.p. administration of zinc sulfate does not stimulate the synthesis of brain MT, this protein is induced by administering zinc sulfate i.c.v. using a surgically implanted minipump. In addition to implanting a single pump for delivery of zinc sulfate (test) or saline (control), a dual pump system may be implanted, wherein one pump may deliver zinc sulfate and the second pump may deliver [ $^{35}\text{S}$ ]cysteine; or one pump may deliver zinc sulfate and the second pump may deliver a protein synthesis inhibitor such as actinomycin D. By using this technique, we have learned that the protein that incorporates [ $^{35}\text{S}$ ]cysteine and binds  $^{65}\text{Zn}$  have identical profiles (Figs 1 and 2).

#### PROPERTIES OF BRAIN METALLOTHIONEIN

The areas of brain that possess a high concentration of zinc also synthesize MT on a continuous basis. For example, MT has been isolated from zinc-untreated bovine hippocampus (Paliwal and Ebadi, 1989), bovine retina (Takahashi *et al.*, 1988), and bovine pineal gland (Awad *et al.*, 1989). However, in the brain, in addition to MT, there are other low molecular weight zinc-binding proteins of unknown nature. For example, the zinc-untreated bovine retina contains a low molecular weight zinc-binding protein which exhibits an elution volume ( $V_e/V_0$ ) of 1.9 on gel permeation chromatography. Furthermore, this protein seems to be similar to the zinc-induced hepatic MT on gel permeation chromatography, but produces only one isoform on a reverse phase high performance liquid chromatography with a retention time of 16.67 min, while the rat zinc-induced hepatic MT-II produces a similar protein peak with a retention time of 16.47 min. On the other hand, the retina contains at least two other major zinc-binding proteins with retention

Table 1. Effects of  $\text{ZnSO}_4$  injected i.p. and i.c.v. on the synthesis of hepatic and brain MT

Treatment	MT in brain ( $\mu\text{g Zn}/\text{mg protein}$ )	<i>P</i> values	MT in liver ( $\mu\text{g Zn}/\text{mg protein}$ )	<i>P</i> values
Saline	1.5 $\pm$ 0.12		0.2 $\pm$ 0.01	
$\text{ZnSO}_4$ (7.5 mg/kg/d/i.p.)	1.4 $\pm$ 0.18		5.4 $\pm$ 0.3	<i>P</i> < 0.01
$\text{ZnSO}_4$ (5.0 mg/kg/d/10 d/i.p.)	1.6 $\pm$ 0.15		ND	
$\text{ZnSO}_4$ (0.22 $\mu\text{mol}/\mu\text{l}/48 \text{ h}/\text{i.c.v.}$ )	7.4 $\pm$ 0.60	<i>P</i> < 0.01	1.2 $\pm$ 0.18	<i>P</i> < 0.05

Rats were injected i.p. with 7.5 mg/kg  $\text{ZnSO}_4$  and decapitated 18 h post treatment. In order to test the chronic effects of zinc, another group of rats were injected i.p. with  $\text{ZnSO}_4$  (5.0 mg/kg/d/10 d) and decapitated 8 h after the last injection. For comparison,  $\text{ZnSO}_4$  was administered i.c.v. by surgically implanted minipumps at a rate of 0.22  $\mu\text{mol}/\mu\text{l}/\text{h}$ , and the rats were decapitated 48 h after the implantation of the minipumps. The brains and the livers were analyzed for metallothionein. Each value represents the mean  $\pm$  SEM of at least 6 sets of experiments using between 3 and 5 rats in each set. The hepatic metallothionein was not analyzed (ND) following 10 d of zinc.  
d = day.

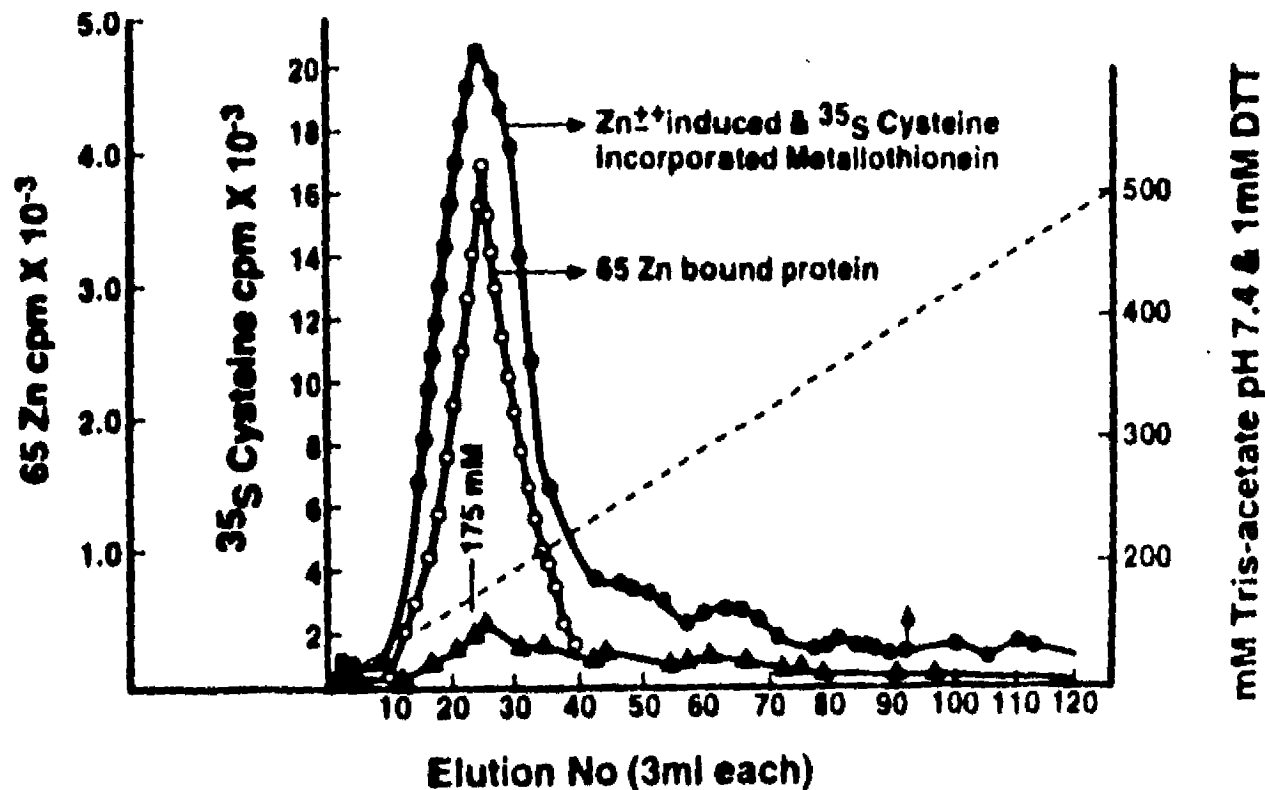


Fig. 1. The incorporation of cysteine into brain MT. Rats were injected i.c.v. with zinc sulfate (0.22  $\mu\text{mol}/\mu\text{l}/24\text{ h}$ ) and [ $^{35}\text{S}$ ]cysteine (0.5  $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}/24\text{ h}$ ). The control group received saline and [ $^{35}\text{S}$ ]cysteine. The brains were then homogenized in 5 vol. of 0.05 M Tris-acetic acid buffer (pH 7.5). The high speed (100,000  $g$ ) supernatant was applied to columns of Sephadex G-75, and the MT was eluted at 4°C. The MT was further purified by applying anion exchange chromatography using DEAE-A25 Sephadex, and the MT isoform was eluted with a linear gradient using a Tris-acetate buffer (0–200 mM, pH 7.5). The zinc-induced MT incorporates a large quantity of [ $^{35}\text{S}$ ]cysteine in comparison to the saline-treated group. Furthermore, the protein that incorporates [ $^{35}\text{S}$ ]cysteine and the one that binds  $^{65}\text{Zn}$  have identical elution profiles.

times of 18.4 and 19.71 min, which appear on the chromatograph when absorption is recorded at 220 nm. Similar zinc-binding proteins do not appear in the chromatograph exhibiting the zinc-induced hepatic MT-II. The biochemical properties of retinal zinc-binding proteins with retention times of 18.4 and 19.71 min are not known (Takahashi *et al.*, 1988).

#### AMINO ACID COMPOSITIONS OF ZINC-INDUCED BRAIN METALLOTHIONEIN

Both the brain and liver have MT isoforms I and II that have 60 and 61 residues, respectively. However, the brain MT isoforms I and II have 17 and 18 cysteine residues (Table 2), respectively, values which vary slightly from 21 cysteine residues reported from human hepatic MT II (Kissling and Kägi, 1977), from 21 cysteine residues reported for equine renal MT

(Kissling and Kägi, 1977), from 17 and 21 cysteine residues reported for the rat hepatic MT isoforms (Wong and Klaassen, 1979), from 20 and 21 cysteine residues reported for the rat hepatic MT isoforms (Winge *et al.*, 1984), and from 19 and 20 cysteine residues reported for bovine fetal hepatic MT isoforms (Munger *et al.*, 1985). However, 14 cysteine residues have been reported for crustacean MT-I (Olafson *et al.*, 1979) and 15 cysteine residues have been reported for rabbit MT isoform I (Nordberg *et al.*, 1972). In addition, in comparison with the hepatic MT, the brain MT isoforms contain considerably higher amounts of aspartic acid and glutamic acid (Table 2).

It should be noted that the amino acid composition of zinc-induced brain MT-II isoform is similar, but not exactly identical, to the induced amino acid composition of the cDNA clone isolated from a non-induced brain cDNA library (Saijoh *et al.*, 1989), suggesting metal- and brain-specific alteration of met-

## METALLOTHIONEIN ISOFORMS

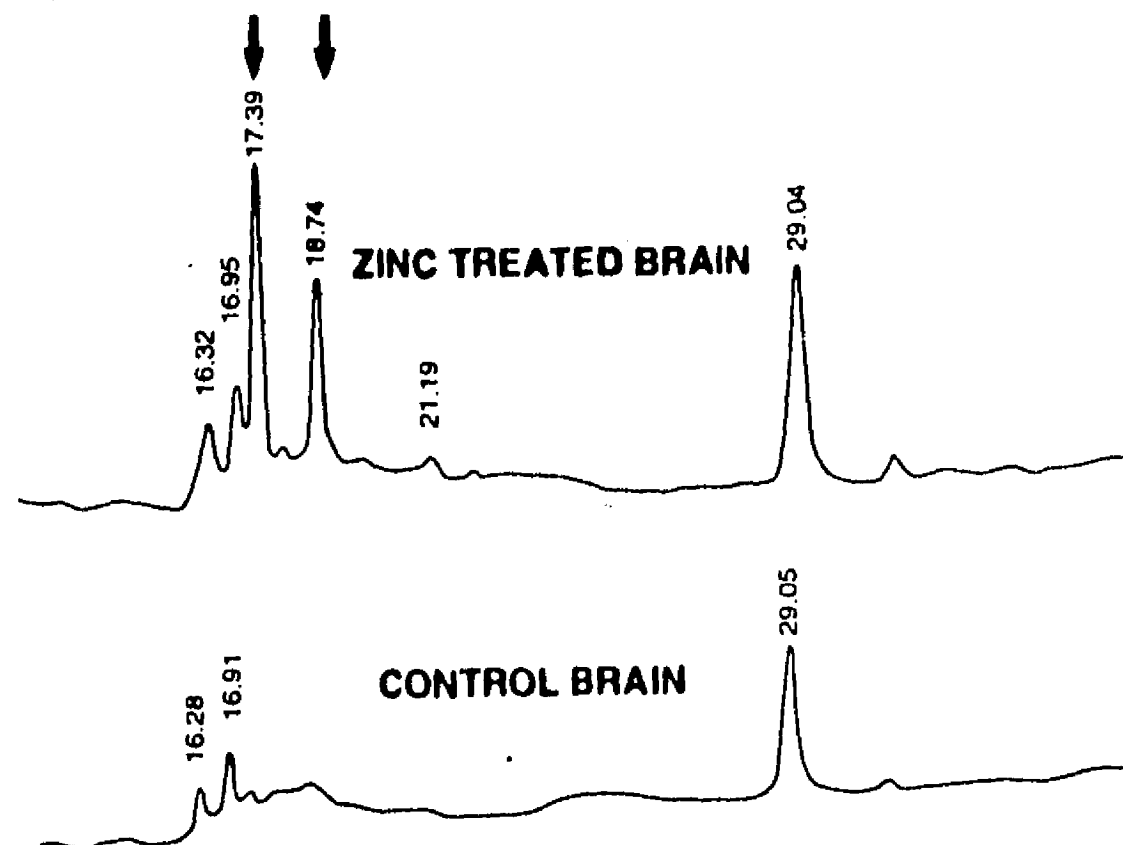


Fig. 2. Comparative HPLC profiles of zinc-binding proteins isolated from brains of zinc-treated (top panel) and control rats (bottom panel). The rats were administered  $ZnSO_4$  i.c.v. ( $0.22 \mu\text{mol}/\mu\text{l}/\text{h}/48 \text{ h}$ ) using Alzet minipumps. The control rats were given saline, but otherwise received identical treatment. The zinc-binding proteins were determined by HPLC. The MT isoforms and other zinc-binding proteins were analyzed for zinc using atomic absorption spectrometry and for protein.

Table 2. The amino acid composition of zinc-induced brain MT-like isoforms

Amino acids	Isoform I		Isoform II	
	Residues	% Total	Residues	% Total
Aspartic acid	5	8.4	4	6.5
Threonine	3	5.0	3	4.9
Serine	8	13.3	9	14.8
Glutamic acid	3	5.0	4	6.6
Proline	2	3.3	2	3.3
Glycine	7	11.7	5	8.2
Alanine	4	6.7	5	8.2
Valine	2	3.3	1	1.6
Cysteine*	17	28.3	18	29.5
Methionine†	1	1.7	1	1.6
Isoleucine	—	—	—	—
Lysine	8	13.3	9	14.8
Histidine	—	—	—	—
Arginine	—	—	—	—
Leucine	—	—	—	—
Tyrosine	—	—	—	—
Phenylalanine	—	—	—	—
Total	60	100	61	100
Minimum molecular weight‡		6900.83		7076.10

\* Determined as cysteic acid.

† Determined as methionine sulfone.

‡ Assumes no tryptophan.

allothionein (Andersen *et al.*, 1989; Saijoh *et al.*, 1994).

#### CONSTITUTIVE EXPRESSION OF METALLOTHIONEIN IN MAMMALIAN BRAINS

The constitutive levels of MT and MT mRNA vary in different tissues (Paliwal *et al.*, 1990; Choudhuri *et al.*, 1993; Blaauwgeers *et al.*, 1994). For example, Paliwal *et al.* (1990) showed that 6 h following i.c.v. administration of zinc sulfate, in a dose of 0.1 or 0.5  $\mu\text{mol}/10 \mu\text{l}$ , the total concentrations of zinc in the brain increased from a control value of 15.8 to 25.8 and 33.5  $\mu\text{g}/\text{g}$  tissue, respectively. The same treatments enhanced the concentration of zinc in the liver from a control value of 31.76 to 38.8 and 42.35  $\mu\text{g}/\text{g}$  tissue, respectively. In previous studies, we have shown that i.c.v. administered zinc sulfate in a dose of 0.22  $\mu\text{mol}/\mu\text{l}$  induced the synthesis of MTs in the brain from a control (saline) level of 1.5 to 7.4  $\mu\text{g Zn}/\text{mg}$  protein (Ebadi, 1986a), whereas the zinc sulfate administered i.p. in a dose of 7.5 mg/kg stimulated the synthesis of MTs in the liver from 0.3 to 4.0  $\mu\text{g Zn}/\text{mg}$  protein (Itoh *et al.*, 1983).

#### INDUCTION OF BRAIN METALLOTHIONEIN II mRNA BY ZINC

The i.c.v. administration of ZnSO<sub>4</sub> in doses of 0.1 and 0.5  $\mu\text{mol}/10\ \mu\text{l}$  increased the poly A<sup>+</sup> RNA in the brain from a control value of 6.6 to 8.0 and 9.6  $\mu\text{g}/\text{g}$  brain tissue, respectively. Furthermore we probed the poly A<sup>+</sup> RNA with [<sup>32</sup>P]labeled 180 pair BamHI/PvuII restriction fragment containing the cDNA for human MT-II from pHMT-II<sub>1</sub> plasmid. Slot blot analysis of poly A<sup>+</sup> RNA revealed that administration of zinc increased brain MT-II hybridizable RNA. In comparing the association between the tissue concentrations of zinc and induction of MT-II mRNA in the liver and brain, it becomes apparent that although the constitutive level of MT-II mRNA is higher in the brain, the slope of the augmentation of MT-II mRNA synthesis as a function of increasing tissue concentration of zinc, is much steeper in the liver when compared to the same criterion in the brain. This phenomenon is apparent when one compares a computer analytical model contrasting the relation between the levels of MT-II mRNA and the doses of zinc given i.c.v. between the levels of MT-II mRNA and the tissue concentrations of zinc and between the levels of MT-II mRNAs and the percentage variation in concentrations of zinc (Paliwal *et al.*, 1990).

Northern blot analysis of poly A<sup>+</sup> RNA, extracted from the brain and liver of control rats using [<sup>32</sup>P] labeled cDNA, which is a BamHI-PvuII fragment of PHMT-II, as a probe, showed a major band of hybridization of approx. 700 bases in both liver and brain, suggesting that the size of message in both tissues is similar. Furthermore, the RNA blots for liver and brain were compared 6 h following zinc injection, the brain MT-II mRNA became shortened from 700 to 500 bases, whereas the liver MT-II mRNA became curtailed from 700 to 400 bases. The mechanism(s) for the differential and somewhat slower rate of degradation of brain poly A<sup>+</sup> RNA tail, which may in turn be responsible for the constitutively directed higher basal level of MT-II mRNA in the brain, is not understood (Paliwal *et al.*, 1990).

In addition to a variation in the tissue level of MT mRNA, there exists a vast difference in the species level of MT and its mRNA. For example, Choudhuri *et al.* (1993) have reported a 20-fold difference in MT-I gene expression in the brains of mice and rats.

#### REGIONAL DISTRIBUTION OF BRAIN METALLOTHIONEIN I mRNA IN RAT BRAIN

Hao *et al.* (1994), by having employed the MT-I cDNA as a probe, sought to gain additional insight

into the function of MT by discerning the regional distribution of its mRNA. Northern blot analysis of brain mRNA revealed that the administration of zinc sulfate enhanced MT-I mRNA (570 bp). The *in situ* hybridization study revealed that MT-I mRNA was localized in several areas of brain including dorso-lateral geniculate nucleus, hippocampus, internal capsule, caudate-putamen, insular cortex, intralimbic cortex, lateral septum, paraventricular thalamic nucleus, medial habenular nucleus, posterior commissure, central gray, inferior colliculus, 2nd cerebellar lobule, 3rd cerebellar lobule, and crusiform lobule (Figs 3 and 4).

#### CELLULAR LOCALIZATION OF METALLOTHIONEIN IN MAMMALIAN BRAINS

The cellular localization of MT in the mammalian brain has been carried out in several elegant studies (Nakajima *et al.*, 1989, 1991; Nishimura *et al.*, 1990, 1992; Itano *et al.*, 1991; Young *et al.*, 1991; Suzuki *et al.*, 1992a,b; Blaauwgeers *et al.*, 1993, 1994).

In the mouse brain, MT immunostaining is found in ependymal cells, glial elements, arachnoid, and pia matter (Nishimura *et al.*, 1992). In the young rat brain, MT immunostaining is found in ependyma, choroid plexus epithelium, pia matter, and arachnoid (Nishimura *et al.*, 1990, 1992). In the adult rat, MT immunoreactivity is found in ependymal cells, choroid plexus, blood vessels (Nakajima *et al.*, 1989), and in astrocytes throughout the brain (Young *et al.*, 1991; Young, 1994). In the monkey brain, MT immunoreactivity is found in pia matter, ependymal cells, and astrocytes (Suzuki *et al.*, 1992a,b). In the human, MT immunoreactivity is found mainly in the astrocytes (Nakajima *et al.*, 1991; Uchida *et al.*, 1991; Suzuki *et al.*, 1992a,b; Blaauwgeers *et al.*, 1993, 1994). A study by Kasarskis *et al.* (1993) has identified MT in the cytoplasm and axons and dendritic processes of motor neurons in the ventral spinal cord.

#### METALLOTHIONEIN IN DEVELOPING MAMMALIAN BRAIN

The ontogenic variation in the concentration of MT has been studied in the rat brain (Ebadi, 1986b). The concentrations of zinc in the cerebellum, hypothalamus, and basal ganglion are highest at 20 days after birth and decline thereafter. On the other hand, the concentrations of zinc in the cerebrum and hippocampus do not seem to exhibit developmental alterations. Gel permeation chromatography on Sephadex G-75 columns has shown that the concentration of

FALLA DE ORIGEN



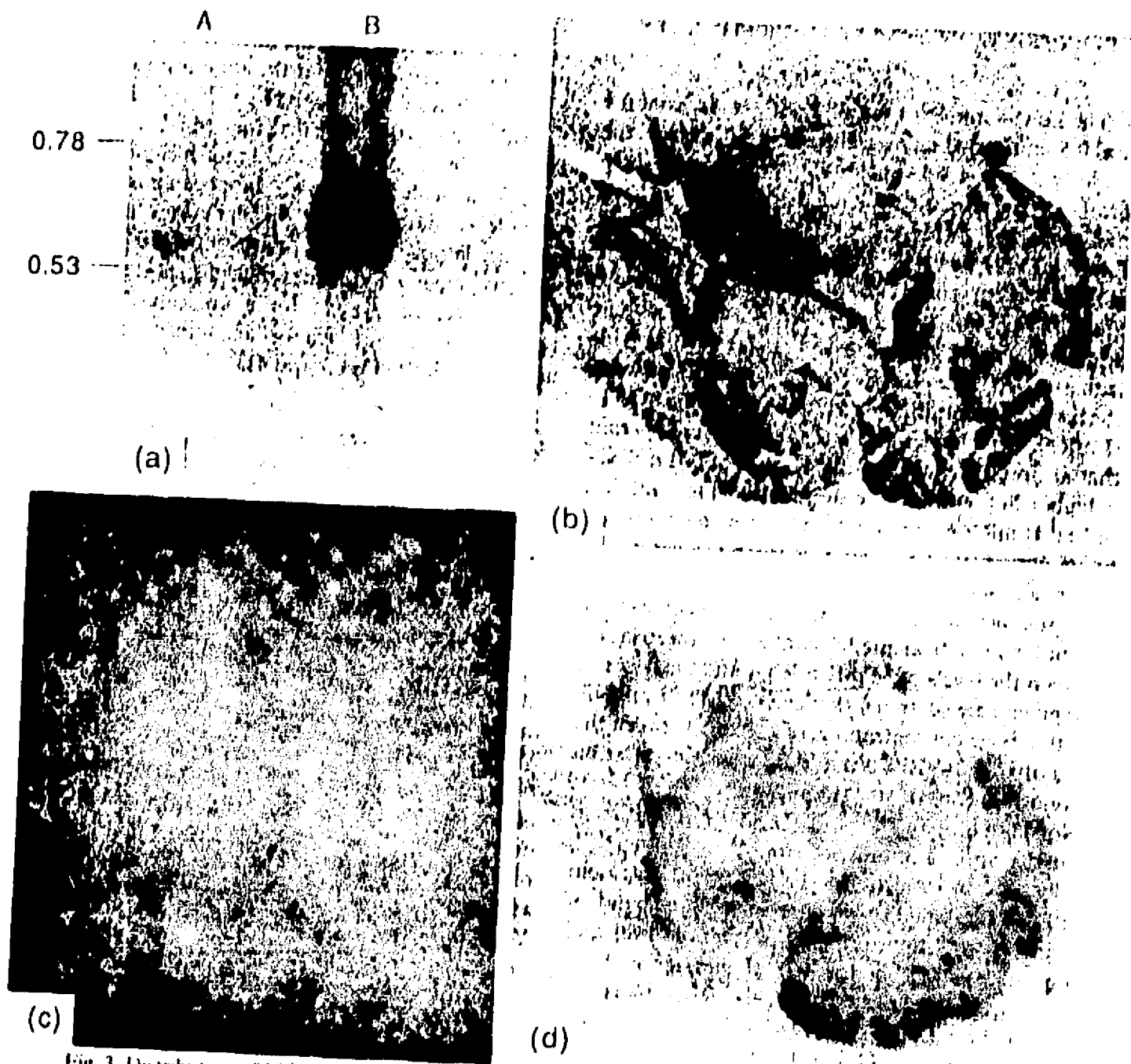


Fig. 3. Distribution of MT-I mRNA in rat brain, section a. Northern blot analysis of mRNA expressed in control (panel A) and zinc-treated rat brain (panel B), section b, *in situ* hybridization of  $^{35}\text{S}$ -labeled cDNA probe delineating the regional distribution of brain MT-I mRNA 6 h post zinc treatment. Section c, RNAse treated brain produced no signal; section d, *in situ* hybridization of  $^{32}\text{P}$ -labeled cDNA probe delineating the regional distribution of brain MT-I 6 h post zinc treatment.

MT increases in the brain steadily and dramatically after birth, from  $0.2 \mu\text{g}$  in 1 day to  $3.60 \mu\text{g}$  zinc/mg protein by 50 days after birth. The enhancement in the concentration of MT after birth was not related to a lower level of total protein concentration during the prenatal period (Ebadi, 1986b).

The developmental concentrations of MT have been studied in the autopsied brains of fetuses, infants, and children using immunohistochemical techniques (Suzuki *et al.*, 1994). No MT could be detected in the

glial cells of fetal brains, whereas the glial cells of adult brains exhibited strong staining for MT.

The concentrations of zinc-binding proteins in developing mammalian tissues increase, decrease, or remain unaltered. For example, the concentration of MT increases in developing rat brain, and the level of zinc thionein is augmented in developing rat testis. Unlike these tissues, the concentrations of hepatic MT are high in the fetal and neonatal livers in rat and human and decline thereafter. The high level of hep-

FALLA DE ORIGEN

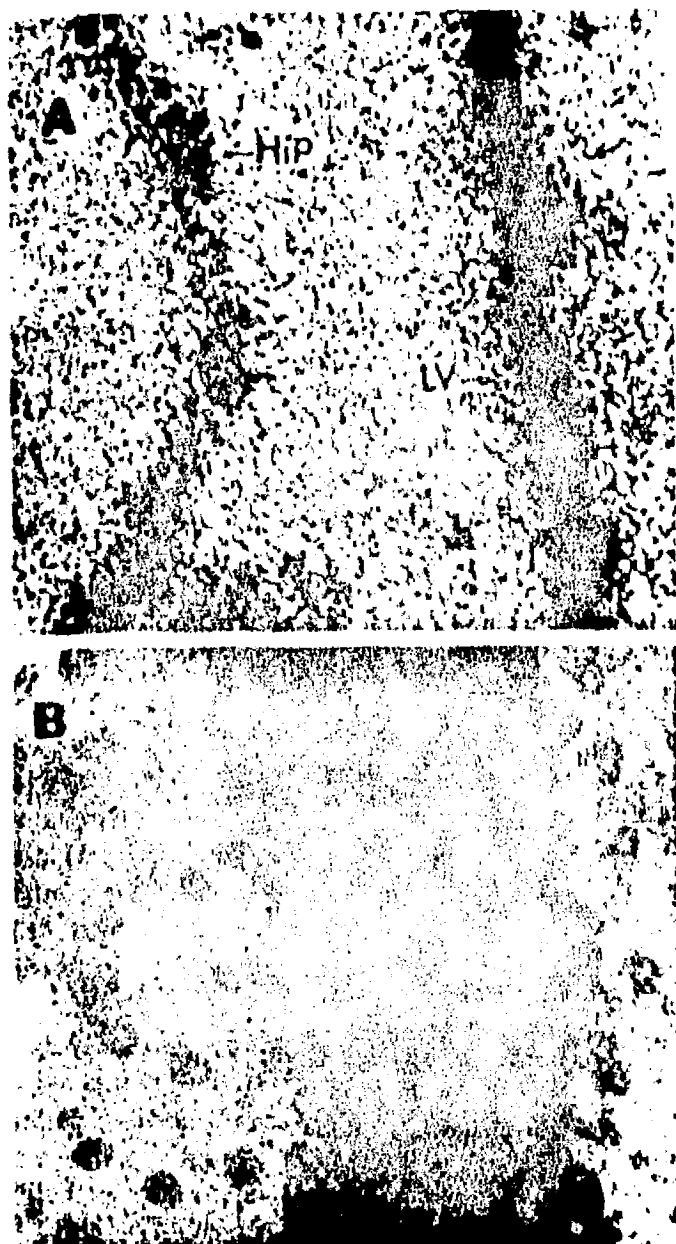


Fig. 4. *In situ* hybridization of  $^{35}\text{S}$ -labeled cDNA probe showing that in the rat brain silver grains are localized mostly in lateral ventricle (LV, panel A), and hippocampus (Hip, panel B). The sections were counterstained with cresyl violet. Magnification  $\times 800$ .

atic MT during fetal and neonatal periods has been interpreted to indicate that the MT may play a role in the storage, donation, and utilization of essential elements, such as zinc and possibly copper, for nucleic acid metabolism, protein synthesis, and other metabolic processes during a period of rapid differentiation and growth.

Unlike that in the hepatic MT, the concentration of the MT in the kidney does not undergo the rapid and dramatic alteration during prenatal and neonatal periods. Furthermore, the MT in the kidneys of the newborn rat is a zinc-containing protein, whereas in the adult rat, it is predominantly a copper-containing protein.

The factors regulating the synthesis of MTs in different organs may be dissimilar during prenatal, neonatal, and other periods. During the neonatal period, when demand for zinc is high, the synthesis of MT would be more subject to hormonal control and less dependent on zinc influence. However, in the mature rat, when the demand for zinc diminishes, the synthesis of MT would be influenced by zinc, and MT would function to maintain zinc homeostasis (see Ebadi, 1986b and the references cited within this article).

#### METALLOTHIONEIN GENE EXPRESSION IN MAMMALIAN BRAIN

The high degree of homology among MT isoforms, with respect to nucleotides and amino acid sequences, has made it untenable to obtain cDNA probes or antibodies capable of distinguishing the various isoforms of MT (Durnam and Palmiter, 1981; Searle *et al.*, 1984; Saijoh *et al.*, 1989, 1994). The traditional MT-I and MT-II isoforms are expressed in several areas of brain (Ebadi, 1991; Hao *et al.*, 1994). On the other hand, a unique MT isoform, labeled as the growth inhibitory factor (GIF) or MT-III, has recently been identified from human brain (Uchida *et al.*, 1991; Tsuji *et al.*, 1992) and human and mouse brain (Palmiter *et al.*, 1992). The deduced amino acid sequence of MT-III exhibits greater similarity to the MT-II isoform than to the MT-I isoform. In addition, MT-III, which is expressed mostly in the brain and not in the peripheral tissues, contains an additional 7 amino acids, therefore possessing a total of 68 amino acid residues (Uchida *et al.*, 1991; Palmiter *et al.*, 1992).

#### GENERAL FEATURES OF THE INDUCTION OF METALLOTHIONEIN

The regulation of MT gene expression, namely *cis-trans* regulation, has been well documented. That is, binding of *trans* elements to *cis* sequences in the 5' flanking region, the promoter sequence, of MT genes produces an increase in transcription of MT mRNA. Stress signals, such as heavy metals and glucocorticoid, are involved in such mechanisms, but several other similar inducers, such as endotoxin (De *et al.*, 1990), interleukin-1 (Kikuchi *et al.*, 1992, 1993), and X-irradiation (Shiraishi *et al.*, 1989) have been studied. Although the promoter sequence is highly homologous in various species (Varshney *et al.*, 1986), the level of transcription of MT gene most probably varies in different tissues (Garg *et al.*, 1989). There-

FALLA DE ORIGEN

fore, the availability of *trans*-elements and utilization of inducers may influence the differential expression of MT in various tissues (Saijoh *et al.*, 1994).

#### INDUCTION OF METALLOTHIONEIN IN ASTROCYTES BY CYTOKINES

Since the synthesis of metallothionein is induced by interleukin-1 and tumor necrosis factor, MT is now considered an acute phase protein. Astrocytes do contain MT (Itano *et al.*, 1991; Nakajima *et al.*, 1991; Young *et al.*, 1991; Nishimura *et al.*, 1992; Suzuki *et al.*, 1992a,b; Kikuchi *et al.*, 1993; Sawada *et al.*, 1994; Young, 1994). In addition, they contain interleukins-1, -2, and -6, tumor necrosis factor, interferon, and granulocyte macrophage colony stimulating factor, which play a role in growth and differentiation of microglial and astroglial cells (Goetzl *et al.*, 1990; Breneman *et al.*, 1992; Benveniste, 1993; Sawada *et al.*, 1993). Since the growth of astrocytes by interleukin-1 (Sawada *et al.*, 1994) is associated with production of interleukin-6 (Frei *et al.*, 1989; Kasahara *et al.*, 1990; Aloisi *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1993a,b), interleukin-8 (Aloisi *et al.*, 1992), tumor necrosis factor (Gadient *et al.*, 1990; Spranger *et al.*, 1990), nitric oxide synthase (Lee *et al.*, 1993a,b), and prostaglandin E<sub>2</sub> (Katsuura *et al.*, 1989), it is thought that the production of interleukin-1 by astrocytes takes place when injury or inflammation occurs in the CNS (Woodroffe *et al.*, 1991; Yan *et al.*, 1992). Interleukin-1 and heavy metals induce the synthesis of MT and its mRNA for a prolonged period of time (Kikuchi *et al.*, 1992, 1993). Therefore, Sawada *et al.* (1994) believe that in inflammation, the level of interleukin-1 increases. This, in turn, induces the synthesis of long-acting MT, and hence protects against free radicals and oxidative stress caused by inflammation and tissue injury in the CNS.

#### EXPRESSION OF METALLOTHIONEIN AND RESISTANCE TO METAL-INDUCED TOXICITY

A transient increase in metal tolerance of eukaryotic cells can be induced by prior treatment with sub-lethal concentrations of certain metal ions. This tolerance coincides with cellular metal binding capacity due to transcriptional induction of the MT gene (Karin and Richards, 1982; Richards *et al.*, 1984; Peterson and Mercer, 1988; Peterson *et al.*, 1988; Gupta *et al.*, 1993). A more stable tolerance can be caused by exposure to cell cultures to stepwise increase in metal ion concentrations. This tolerance is associated with an increase in MT gene copy number and a cor-

responding increase in MT mRNA, and MT protein (Palmiter, 1987). Genomic rearrangements involving amplification of MT genes have been reported in metal-tolerant eukaryotes (Gupta *et al.*, 1993).

It is generally believed that metals are more toxic in a system which is less capable of synthesizing MT. For example, in a study we (Ebadi *et al.*, 1989b) have shown that neuroblastoma IMR-32 cells exhibited less tolerance to the toxicity of both cadmium and zinc than Chang liver cells. Furthermore, we found that this phenomenon was directly related to the inherent ability of these cells to produce MT (Table 3).

The control Chang liver cells or the human neuroblastoma IMR-32 cells, untreated with either zinc or cadmium, were able to incorporate [<sup>35</sup>S]cysteine and synthesize MT. The incubation of Chang liver cells with 100  $\mu$ M zinc for 24 h stimulated 6.7-fold over the control value the incorporation of [<sup>35</sup>S]cysteine into MT over the control group, whereas the incubation of neuroblastoma cells with an identical amount of zinc and under identical conditions, stimulated the synthesis of MT only 2.3-fold over the control value. The incubation of Chang liver cells with 1  $\mu$ M cadmium for 24 h stimulated 5.0-fold over the control value the incorporation of [<sup>35</sup>S]cysteine into MT, whereas the incubation of neuroblastoma cells with an identical amount of cadmium and under identical conditions, stimulated the synthesis of MT only 2.25-fold over the control value.

The minimum tested concentration of cadmium

Table 3. The dose-dependent toxic effects of cadmium and zinc on the viability of Chang liver cells and neuroblastoma IMR-32\*

Cadmium concentration of the medium	Chang liver cells	Neuroblastoma IMR-32
1 $\mu$ M	0	0
2.5 $\mu$ M	0	$\Delta$
5 $\mu$ M	0	X
7.5 $\mu$ M	$\Delta$	X
10 $\mu$ M	$\Delta$	
Zinc concentration of the medium	Chang liver cells	Neuroblastoma IMR-32
100 $\mu$ M	0	0
120 $\mu$ M	0	X
150 $\mu$ M	X	

\*All cells were incubated in the presence of various concentrations of either cadmium or zinc for 24 h, and their morphologies were examined after 24 h of exposure to the metals.

0 Denotes that the cells survived with no apparent morphological alterations.

$\Delta$  Denotes that the cells survived, but their morphologies became altered by the appearance of granules in the coarsened cytoplasm.

X Denotes that the shape of the cells changed from an elliptoid configuration to a circular one, and the dead cells were floating in the medium.

stimulating the synthesis of MT in the Chang liver cells was 1  $\mu$ M, and 7.5  $\mu$ M caused cell death. The minimum tested concentration of zinc stimulating the synthesis of MT was 100  $\mu$ M in the neuroblastoma IMR-32, and 150  $\mu$ M caused cell death. The neuroblastoma IMR-32 exhibited a lesser degree of tolerance to the toxic effects of either cadmium or zinc and demonstrated susceptibility to morphological damage or lethal effects with substantially smaller amounts of the metals (Table 3).

#### THE USE OF OLIGONUCLEOTIDES TO PROBE THE ESSENTIALITY OF METALLOTHIONEIN GENE

Antisense refers to the use of chemical or biological agents which interact with cellular nucleic acid targets in a sequence-specific fashion. This interaction results in disruption of the transfer of genetic information within the targeted cells. Potential targets for antisense agents involve modification of the integrity of genomic DNA, modification of transcription, processing, transport, stabilization, splicing, and translation (Stein and Cohen, 1988; Toulme and Helene, 1988; van der Krol *et al.*, 1988; Zon, 1988; Dolnick, 1990).

Iversen and Ebadi (1992) synthesized an antisense oligodeoxyribonucleotide with sequence complementary to the mRNA coding for human MT-II (Fig. 5) and tested its ability to inhibit both constitutive and cadmium-induced MT protein synthesis in neuroblastoma IMR and Chang liver cells in culture. The sense oligonucleotide was also prepared and tested as a control for its sequence-specific effects. Oligonucleotide entry into cells was enhanced through the use of a polybrene carrier so that nearly 30% of a 10  $\mu$ M dose of oligonucleotide was shown to be

associated with cells (Fig. 6). The antisense oligonucleotide inhibition of MT protein synthesis rendered both cell types more sensitive to cadmium toxicity. However, the sense oligonucleotide had no effects on either MT protein synthesis or sensitivity to cadmium toxicity. Similar results were obtained by using hamster lung V79 cells in culture (Iversen *et al.*, 1992).

Furthermore, Takeda *et al.* (1994) have prepared a synthetic antisense oligodeoxyribonucleotide to the mRNA specific for human *c-myc* and tested its potential to regulate MT synthesis in Chang liver cells in culture. The results of this study revealed that the *c-myc* antisense oligodeoxyribonucleotide led to greater induction of zinc-promoted but not cadmium- or dexamethasone-induced synthesis of MT. These data were interpreted to suggest that *c-myc* acts as a repressor of at least one of the six human MT isoforms and demonstrates a unique mode of regulation capable of discriminating between zinc- and dexamethasone-induced synthesis of MT.

The *myc* family of oncogenes codes for nuclear proteins that are believed to function as transcription and replication factors (Chomczynski and Sacchi, 1987; Dang, 1991). This family consists of four well-characterized members, including *c-myc*, *N-myc*, *l-myc*, and *b-myc* (Jakobovits *et al.*, 1985; Zimmerman *et al.*, 1986; Ingvarsson *et al.*, 1988; Semsei *et al.*, 1989). Studies in rat and mouse have shown that *c-myc* and *b-myc* are expressed in a variety of cell types, whereas *N-myc* and *l-myc* transcripts appear predominantly in brain, kidney, and heart. *c-myc* has been cloned from the rainbow trout and shown to be expressed in the liver (Van Beneden *et al.*, 1986). The amount of *b-myc* that is expressed in the pituitary increases as



- |                   |                              |
|-------------------|------------------------------|
| 1. ANTISENSE MT   | 5' - GGCGCAGGAGCAGTTGGG - 3' |
| 2. SENSE MT       | 5' - CCCAACTGCTCCTGCGCC - 3' |
| 3. ANTISENSE SDMT | 5' - GGAGAATGGCCGCGC - 3'    |

Fig. 5. Diagrammatic representation of the MT-I gene. The three exons are shown as boxes with coding regions shaded. The three exons are separated by two introns shown as single lines connecting the boxes. The sequence of the oligonucleotides tested and their locations within the exon I of the MT gene are shown below the gene.

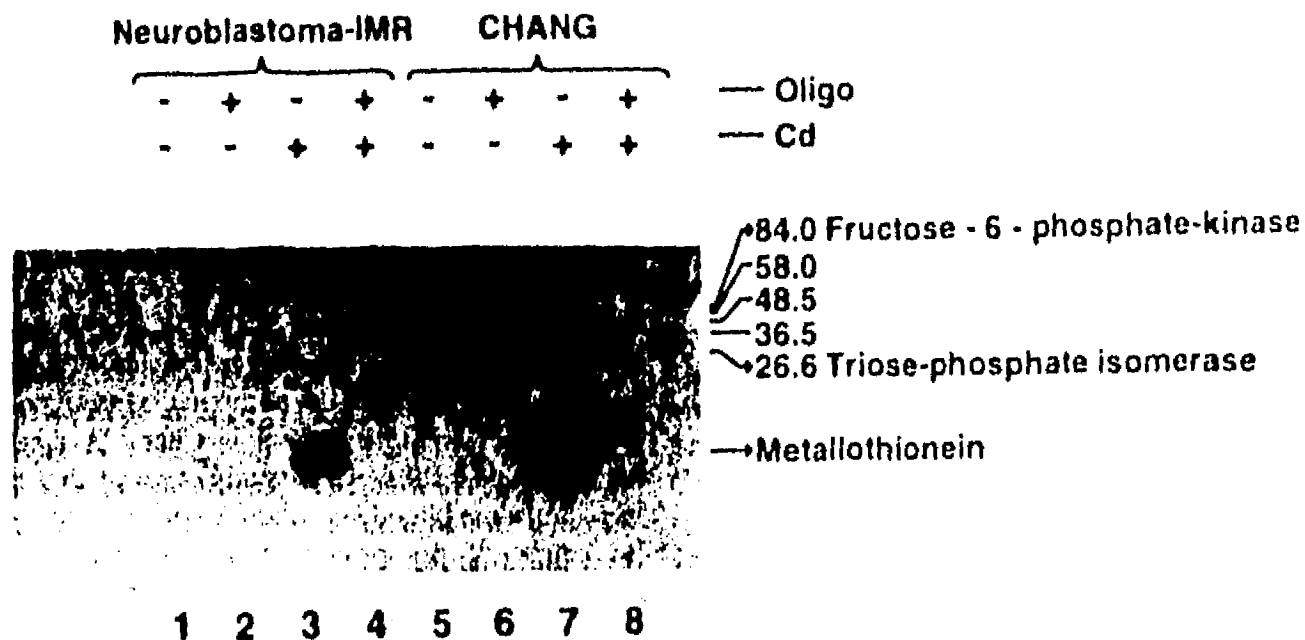


Fig. 6. An autoradiograph of [<sup>35</sup>S]cysteine metabolically labeled cultured cells. The cellular cytosolic proteins were carboxymethylated and separated through a 17% polyacrylamide gel. Lanes 1 and 5 are mock transfected cells; lanes 2 and 6 are antisense oligonucleotide transfected cells; lanes 3 and 7 are cells that were treated with 50  $\mu$ M of cadmium; and lanes 4 and 8 are cells that were treated with antisense oligonucleotides plus 50  $\mu$ M of cadmium.

the organisms approach sexual maturity (Panno and McKeown, 1993).

In our studies (Takeda *et al.*, 1994), the antisense phosphorothioate corresponding to the *c-myc* oncogene effectively reduced the cadmium-induced toxicity in the Chang liver cell cultures which were pretreated with zinc. Zinc is known to protect against cadmium-induced toxicity in different systems, including cadmium-induced cytotoxicity in hepatocytes (Kägi *et al.*, 1992). Our data confirm the non-antisense-mediated protection of the culture by zinc from cadmium-induced toxicity. The addition of the *c-myc*-specific antisense phosphorothioate oligonucleotide increased cadmium tolerance more than 2-fold. One possible mode of action of the antisense in the zinc-treated cells would be the derepression of MT synthesis by zinc as an inducer: *c-myc* expression may be a possible component for MT repression. The results of *c-myc* inhibition on the cadmium- and dexamethasone-pretreated cultures indicate that *c-myc* does not act significantly as a transacting factor for MT induced by these compounds. This agrees with the view that the mechanism of MT induction by each inducer is highly specific, involving dissimilar inductive mechanisms.

In humans, a family of at least 12 MT genes exists. The analysis of the regulation of the human MT-I and MT-II genes has revealed differences in their response to zinc and dexamethasone (Ebadi *et al.*, 1989b). Furthermore, Peterson and Mercer (1988), by studying the regulation of the closely linked endogenous sheep

MT-Ia, MT-Ib, MT-Ic and MT-II, have shown that only the synthesis of MT-II mRNA increased in response to dexamethasone.

Since *c-myc* gene is able to transform normal cells into malignant cells and since overexpression of MT represents one mechanism of resistance to some clinically important antineoplastic agents (Kelly *et al.*, 1988; Takeda *et al.*, 1992; Yang *et al.*, 1994), the delineation of the precise mechanism regulating the induction of MT may have some important therapeutic implications.

#### DIFFERENTIAL AND UNIQUE REGULATION OF BRAIN METALLOTHIONEIN

It has been recognized for a long period of time that the peripherally administered metals, including zinc, do not readily traverse the blood-brain barrier, and hence do not alter the steady-state concentration of metals in the brain. After discovery of MT in the brain (Itoh *et al.*, 1983) and after recognizing that its synthesis in the brain could not be induced following either a single large i.p. administration of zinc (Itoh and Ebadi, 1982) or chronic daily i.p. injection of zinc (Ebadi, 1986a), it was postulated that the regulation of synthesis of MT in the brain most probably differed from those operating in the liver or kidneys (Ebadi, 1986b; Churchich *et al.*, 1988; Ebadi *et al.*, 1989a,b, 1992; Paliwal *et al.*, 1990; Hao *et al.*, 1993; Shiraga *et al.*, 1993; Takeda *et al.*, 1994; Table 4).

Table 4. Unique regulation of brain MT

Parameters tested	Rat hepatic MT and Chang liver cells	Rat brain MT and neuroblastoma IMR-32 cells
Synthesis following i.p. administration of zinc given either acutely or chronically	Yes	No
Synthesis stimulated following i.c.v. administration of zinc	Yes	Yes
Basal level of MT	Very low but stimulated dramatically	Relatively high but stimulated rather modestly
Basal MT-II mRNA and its degradation	Liver lower and faster than the brain	Brain higher and slower than the liver
Synthesis stimulated following ethanol	Yes	No
Synthesis in neuroblastoma IMR-32 cells stimulated by zinc or Cd <sup>2+</sup>	Yes	Yes
Synthesis in neuroblastoma IMR-32 stimulated by dexamethasone	Yes	No
Neonatal level of MT	High in liver and declines	Low in brain and increases
Isoforms	Two in liver	Four in brain
Amino acid residues	60,60	60,61
Cysteine residues	20,20	17,18
Immunoreactivity	Bovine hippocampal MT cross-reacts with antibody formed against sheep and hepatic MTs	
Involvement in oxidative stress and scavenging free radicals	Yes	Yes
Activation of pyridoxal kinase by MT	Yes	Yes

In view of the fact that higher than physiological concentrations of essential elements such as zinc and copper, and even a minute amount of non-essential elements such as cadmium and barium are quite toxic (Ebadi and Hama, 1986; Yokoyama *et al.*, 1986), several mechanisms may be operational simultaneously to avert deleterious neurotoxicity. First, exposure to metals induces the synthesis of hepatic and renal MTs rapidly to effectively bind additional amounts of metals. Furthermore, the blood-brain barrier guards actively against the massive transport of any trace elements into the brain. In addition, the brain synthesizes MT in a higher constitutive level than the peripheral tissues and on a continuous basis (Ebadi, 1986a; Paliwal *et al.*, 1990). Finally, and most importantly, a complex structure such as brain, pos-

sessing an estimated 30,000 mRNAs and having one third of the mammalian genome exclusively dedicated to its functions (Sutcliffe, 1988), may have developed unique processes for transporting, compartmenting, releasing and utilizing zinc, copper, calcium and other essential elements, commensurate with the diversified and vital functions endowed and invested to its various regions.

#### ZINC METALLOTHIONEIN-INDUCED ACTIVATION OF PYRIDOXAL KINASE

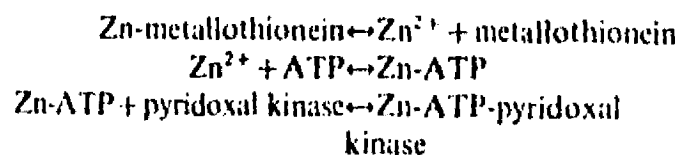
Pyridoxal phosphate is not supplied by diet and must be synthesized in the body. The naturally occurring B<sub>6</sub> derivatives, namely pyridoxine, pyridoxal, and pyridoxamine, are absorbed efficiently and rapidly

FALLA DE ORIGEN

from the gastrointestinal tract. On the other hand, the phosphorylated derivatives, pyridoxine phosphate, pyridoxal phosphate, and pyridoxamine phosphate, are not transported to any great extent across most cellular membranes. In the body, the absorbed pyridoxine, pyridoxal, and pyridoxamine are converted to pyridoxine phosphate, pyridoxal phosphate, and pyridoxamine phosphate, respectively, by pyridoxal kinase (ATP: pyridoxal 5-phosphotransferase, EC 2.7.1.35; McCormick *et al.*, 1961).

The activity of pyridoxal kinase is unevenly distributed throughout the brain, ranging from 94 to 248  $\mu\text{mol}$  pyridoxal phosphate formed/g tissue/h. The highest kinase activity is shown in olfactory tubercle > basal ganglia > superior colliculus = olfactory bulb = inferior colliculus = hypothalamus. Intermediate activity was seen in cerebellum = thalamus > cerebrum; whereas medulla > pons = hippocampus > spinal cord reveal the lowest pyridoxal kinase activity. Similarly, the concentration of pyridoxal phosphate is non-uniform in discrete regions of brain ranging from 0.859 to 1.965  $\mu\text{g/g}$  tissues. The highest pyridoxal phosphate concentration is shown in inferior colliculus, superior colliculus > thalamus = olfactory tubercle. Cerebellum = hypothalamus > medulla = cerebrum > basal ganglia = hippocampus possessed intermediate levels. Olfactory bulb > spinal cord contain the lowest amounts of pyridoxal phosphate (Ebadi and Bifano, 1978).

Among the divalent cations tested ( $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ),  $\text{Zn}^{2+}$  was the most effective activator of hepatic pyridoxal kinase (McCormick *et al.*, 1961). Furthermore, the human hepatic pyridoxal kinase exhibits a complete dependence on zinc (Merrill *et al.*, 1984). Moreover, zinc activates pyridoxal kinase in the rat brain, and the  $\text{ED}_{50}$  values for stimulation in the cerebellum, superior colliculus, and hippocampus are 5.5, 8.5, and  $17.0 \times 10^{-6}$  M respectively (Ebadi *et al.*, 1981). Finally, Churchich *et al.* (1988) have shown that MT activated pyridoxal kinase isolated from sheep and pig brains. On the other hand, apoprotein of MT inhibited the activity of pyridoxal kinase. This fact supports the contention that zinc activates pyridoxal kinase according to the following mechanisms (Churchich *et al.*, 1988).



Similarly, Hao *et al.* (1993) found that MT stimulated the activity of pyridoxal kinase in trout brain.

#### ZINC AND GLUTAMIC ACID DECARBOXYLASE

Zinc alters the activity of glutamic acid decarboxylase (GAD) (Wu and Roberts, 1974; Wu *et al.*, 1976). Both zinc deficiency and zinc excess have been reported to produce epileptiform seizures (Ebadi and Pfeiffer, 1984). In a series of experiments, Itoh and Ebadi (1982) established that at physiological concentrations, zinc stimulates the activity of pyridoxal kinase (50% stimulation  $1.7 \times 10^{-7}$  M), enhancing the formation of pyridoxal phosphate, which is required for glutamic acid decarboxylase. In pharmacological concentrations (50% inhibition of  $6.5 \times 10^{-4}$  M), zinc inhibits GAD by preventing the binding of pyridoxal phosphate to Holo GAD (Itoh and Ebadi, 1982; Fig. 7).

Zinc binding proteins such as MT, by donating zinc, stimulate the activity of pyridoxal kinase, stimulating the formation of pyridoxal phosphate, and are able to enhance the formation of GABA. Moreover, when the cytoplasmic concentration of zinc is perturbed and is becoming in excess, by virtue of the fact that MT is induced by zinc, it is able to bind additional amounts of zinc and hence prevent it from inhibiting GAD, a sulfhydryl containing enzyme.

In a study, Denner and Wu (1985) showed that two forms of GAD are found in the rat brain. One form, GAD A, does not require exogenous pyridoxal phosphate for activity whereas another form, GAD B, does. Furthermore, the ratio between GAD A and GAD B is non-uniform throughout the brain area, and the hippocampus contains twice as much GAD B as GAD A.

The involvement of MT in protecting glutamic acid decarboxylase may not be unique for GABA-containing neurons, since S-adenosylmethionine decarboxylase, histidine decarboxylase, acetoacetate decarboxylase, and L-ornithine decarboxylase also contain sulfhydryl groups and are hence inhibited by higher than physiological concentrations of zinc.

#### SUMMARY AND CONCLUSION

As an essential trace element necessary for the proper functioning of more than 300 enzymes, zinc is indispensable for the growth and development of the CNS.

The interaction of zinc with proteins helps explain another critical function of zinc in biological systems, the regulation of DNA and RNA synthesis. At least three types of zinc-binding motifs, namely zinc fingers, zinc twists, and zinc clusters occur in various families

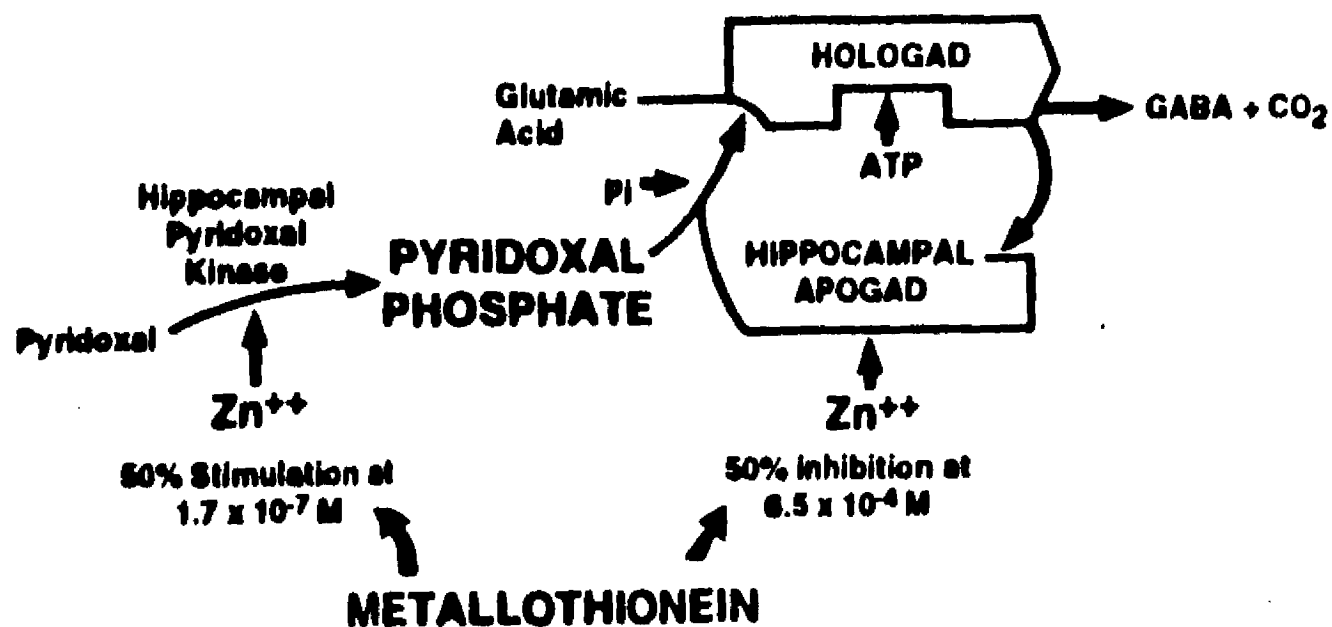


Fig. 7. A proposed model postulating the role of MT, not only in donating zinc to numerous apometalloenzymes, but also by their inducibility in preventing the elevation in the free concentration of zinc and hence protecting an extensive number of sulfhydryl-containing enzymes such as glutamic acid decarboxylase.

of DNA-binding proteins, which differ from those of enzymes.

The areas of brain containing high concentrations of zinc such as the hippocampus, pineal gland, and retina also synthesize metallothionein (MT) isoforms on a continuous basis.

The ocular MT and zinc may play an important role in regulating the activity of zinc enzymes such as retinal dehydrogenases,  $\alpha$ -mannosidase, carbonic anhydrase, and corneal collagenases, and lens aminopeptidase.

The mammalian MT family consists of four similar but distinct isoforms designated as MT-I–MT-IV. MT-I and MT-II are expressed in many tissues; MT-III is expressed only in the brain; and MT-IV is expressed in tissues containing stratified squamous epithelia. Gene knock-out experiments have shown that MTs-I and II protect against metal-induced toxicity, whereas MT-III regulate zinc homeostasis. The expression of MT-III is absent in glia rich white matters, whereas that of MT-I is abundant. Although the CA3 portion of the hippocampus express both MT-I and MT-III, MT-III is abundant in areas of brain containing "vesicular pool of zinc." The presence of MT-III in neurons that sequester zinc in their synaptic vesicles portends of an extremely important or perhaps unique function for MT to be delineated in future studies.

*Acknowledgements*—The authors extend their heartfelt appreciation to Mrs Dorothy Panowicz and Mrs Lori Clapper for their excellent secretarial skills in preparing this

manuscript. The studies cited were supported in part by a grant from USPHS (ES03949).

#### REFERENCES

- Aloisi F., Care A., Borsellino G., Gallo P., Rosa S., Bassani A., Cabibbo A., Testa U., Levi G. and Peschle C. (1992) Production of hemolymphopoietic cytokines (IL-6, IL-8, colony-stimulating factors) by normal human astrocytes in response to IL-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J. Immun.* 149, 2358–2366.
- Andersen R. A., Daae H. L., Mikalsen A. and Alexander J. (1989) Occurrence of various forms of metallothionein in the rat after a short-term cadmium injection regimen. *Comp. Biochem. Physiol.* 93C, 367–375.
- Andrews G. K., Gallant K. R. and Cherian M. G. (1987) Regulation of the ontogeny of rat liver metallothionein mRNA by zinc. *Eur. J. Biochem.* 166, 527–531.
- Arvidson B. and Tjälve H. (1986) Distribution of <sup>109</sup>Cd in the nervous system of rats after intravenous injection. *Acta Neuropath.* 69, 111–116.
- Awad A., Govitrapong P., Hama Y., Hegazy M. and Ebadi M. (1989) Presence of metallothionein-like protein in the bovine pineal gland. *J. Neurol. Transm.* 76, 129–144.
- Beaulieu C., Dyck R. and Cynader M. (1992) Enrichment of glutamate in zinc-containing terminals of the cat visual cortex. *Neuroreport* 3, 861–864.
- Benveniste E. N. (1993) Astrocyte-microglia interactions. In: *Astrocytes: Pharmacology and Function* (Murphy S., ed.), pp. 399–436. Academic Press, San Diego.
- Berg J. W. (1990) Zinc finger domains: Hypotheses and current knowledge. *Ann. Rev. Biophys. Chem.* 19, 405–421.
- Blaauwgeers H. G. T., Sillevs Smitt P. A. E., de Jong J. M. B. V. and Troost D. (1993) Distribution of metallothionein in the human central nervous system. *Glia* 8, 62–70.
- Blaauwgeers H. G. T., Sillevs Smitt P. A. E., de Jong J. M.



- B. V. and Troost D. (1994) Localization of metallothionein in the mammalian central nervous system. *Biol. Signals* 3, 181-187.
- Blaylock T. L., Dunn M. A. and Cousins R. J. (1988) Metallothionein gene expression in rats: Tissue-specific regulation by dietary copper and zinc. *J. Nutr.* 188, 222-228.
- Bremner I. (1987) Nutritional and physiological significance of metallothionein. *Experientia (Suppl.)* 52, 81-107.
- Bremner I. and Beattie J. H. (1990) Metallothionein and the trace minerals. *Ann. Rev. Nutr.* 10, 63-83.
- Brenneman D. E., Schultzberg M., Bartfai T. and Gozes I. (1992) Cytokine regulation of neuronal survival. *J. Neurochem.* 59, 454-460.
- Celentano J. J., Gyenes M., Gibbs T. T. and Farb D. H. (1991) Negative modulation of the  $\gamma$ -aminobutyric acid response by extracellular zinc. *Molec. Pharmacol.* 40, 766-773.
- Chomczynski P. and Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analyt. Biochem.* 162, 156-159.
- Choudhuri S., McKim J. M. Jr. and Klaassen C. D. (1993) Differential expression of the metallothionein gene in liver and brain of mice and rats. *Toxic Appl. Pharmacol.* 119, 1-10.
- Christensen M.-K., Frederickson C. J. and Danscher G. (1992) Retrograde tracing of zinc-containing neurons by selenide ions: A survey of seven selenium compounds. *J. Histochem. Cytochem.* 54, 2-6.
- Churchich J. E., Scholz G. and Kwok F. (1988) Modulation of the catalytic activity of pyridoxal kinase by metallothionein. *Biochem. Int.* 17, 395-403.
- Cousins R. J. (1985) Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: Special reference to metallothionein and ceruloplasmin. *Physiol. Rev.* 65, 239-309.
- Dang C. V. (1991) *c-myc* oncoprotein function. *Biochim. Biophys. Acta* 1072, 103-113.
- De S. K., McMaster M. T. and Andrews G. K. (1990) Endotoxin induction of murine metallothionein gene expression. *J. Biol. Chem.* 265, 15,267-15,274.
- Denner L. A. and Wu J. Y. (1985) Two forms of rat brain glutamic acid decarboxylase differ in their dependence on free pyridoxal phosphate. *J. Neurochem.* 44, 957-965.
- Dolnick B. J. (1990) Antisense agents in pharmacology. *Biochem. Pharmacol.* 40, 671-675.
- Durnam D. M. and Palmiter R. D. (1981) Transcriptional regulation of the mouse metallothionein-I gene by heavy metals. *J. Biol. Chem.* 256, 5712-5716.
- Ebadi M. (1984) The presence of metallothionein-like protein (MLT) in rat brain. *Fedn. Proc.* 43, 3317.
- Ebadi M. (1986a) Characterization of a metallothionein-like protein in rat brain. *Biol. Trace Elem. Res.* 11, 101-116.
- Ebadi M. (1986b) Biochemical alteration of a metallothionein-like protein in developing rat brain. *Biol. Trace Elem. Res.* 11, 117-128.
- Ebadi M. (1991) Metallothionein and other zinc-binding proteins in brain. *Meth. Enzym.* 205, 363-387.
- Ebadi M. and Babin D. (1989) The amino acid composition of zinc-induced metallothionein isoforms in rat brain. *Neurochem. Res.* 14, 69-73.
- Ebadi M. and Bifano J. (1978) The synthesis of pyridoxal phosphate in rat brain regions. *Int. J. Biochem.* 9, 606-611.
- Ebadi M. and Hama Y. (1986) Zinc binding proteins in the brain. *Adv. Exp. Med. Biol.* 203, 557-570.
- Ebadi M. and Pfeiffer R. (1984) Zinc in neurological disorders and in experimentally-induced epileptic seizures. *Neurol. Neurobiol.* 11B, 307-324.
- Ebadi M. and Swanson S. (1987) Characterization of metallothionein-like protein in rat brain. *Experientia (Suppl.)* 52, 289-291.
- Ebadi M., Itoh M., Bifano J., Wendt K. and Earle A. (1981) The role of  $Zn^{++}$  in pyridoxal phosphate mediated regulation of glutamic acid decarboxylase in brain. *Int. J. Biochem.* 13, 1107-1112.
- Ebadi M., White R. J. and Swanson S. (1984) The presence and functions of zinc binding proteins in developing and mature brains. *Neurol. Neurobiol.* 11A, 39-57.
- Ebadi M., Paliwal V. K., Takahashi T. and Iversen P. L. (1989a) Zinc metallothionein in mammalian brain. *UCLA Symposia Molec. Cell. Biol.* 98, 257-267.
- Ebadi M., Takahashi T. and Tuomins P. (1989b) The stimulation of metallothionein synthesis in neuroblastoma IMR-32 by zinc and cadmium but not by dexamethasone. *Biol. Trace Elem. Res.* 22, 233-246.
- Ebadi M., Pfeiffer, R. F. and Huff A. (1992) Differential stimulation of hepatic and brain metallothionein by ethanol. *Neurochem. Int.* 21, 555-562.
- Ebadi M., El-Sayed M. A. and Aly M. H. M. (1993) Actions and regulation of protein kinase C in brain. *Neuroendocrin. Lett.* 15, 69-88.
- Ebadi M., El-Sayed M. and Aly M. (1994a) The importance of zinc and metallothionein in the brain. *Biol. Signals* 3, 123-126.
- Ebadi M., Hao R., Ceruti D. R., Blaxall H. S., Pfeiffer R. F., Rodriguez-Sierra J. F., Norgren R. B. Jr, Strauss J. and El-Sayed M. A. (1994b) Zinc, metallothionein, zinc fingers, and neurotrophic activity in neuroimmunendocrine system. In: *Pathophysiology of Immune-neuroendocrine Communication Circuit* (Gupta D., Wollmann H. A. and Fedor-Freybergh P. G., eds), pp. 11-47. Mattes Verlag, Heidelberg.
- Evans R. M. and Hollenberg S. M. (1988) Zinc fingers: Guilt by association. *Cell* 52, 1-3.
- Frederickson C. J. (1990) Neurobiology of zinc and zinc-containing neurons. *Int. Rev. Neurobiol.* 31, 145-238.
- Frederickson C. J. and Danscher G. (1988) Hippocampal zinc, the storage granule pool: Localization, physiochemistry and possible function. In: *Nutritional Modulation of Neural Function* (Morley J. E., Sternman M. B. and Walsh J. H., eds), pp. 289-306. Academic Press, New York.
- Frederickson C. J. and Danscher G. (1990) Zinc-containing neurons in the hippocampus and related CNS systems. *Prog. Brain Res.* 83, 71-84.
- Frederickson C. J. and Moncrieff D. W. (1994) Zinc containing neurons. *Biol. Signals* 3, 127-139.
- Frederickson C. J., Rampy B. A., Reamy-Rampy S. and Howell G. A. (1992) Distribution of histochemically reactive zinc in the forebrain of the rat. *J. Chem. Neuroanat.* 5, 521-530.
- Frei K., Malipiero U. V., Leist T. P., Zinkernagel R. M., Schwab M. E. and Fontana A. (1989) On the cellular source and function of interleukin 6 produced in the central nervous system in viral disease. *Eur. J. Immun.* 19, 689-694.
- Gadient R. A., Cron K. C. and Otten U. (1990) Interleukin- $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  synergistically stimulate nerve growth factor (NGF) release from cultured rat astrocytes. *Neurosci. Lett.* 117, 335-340.
- Garg L. C., Dixit A., Webb M. L. and Jacob S. T. (1989)

- Interaction of a positive regulatory factor(s) with a 106-base pair upstream region controls transcription of metallothionein-I gene in the liver. *J. Biol. Chem.* **264**, 2134-2138.
- Goetzl E. J., Adelman D. C. and Sreedharan S. P. (1990) Neuroimmunology. *Adv. Immun.* **48**, 161-190.
- Gupta A., Morby A. P., Turner J. S., Whitton B. A. and Robinson N. J. (1993) Deletion within the metallothionein locus of cadmium-tolerant *Synechococcus* PCC 6301 involving a highly iterated palindrome (HHP1). *Molec. Microbiol.* **7/2**, 189-195.
- Hao R., Pfeiffer R. F. and Ebadi M. (1993) Purification of characterization of metallothionein and its activation of pyridoxal phosphokinase in trout brain. *Comp. Biochem. Physiol.* **104**, 293-298.
- Hao R., Cerutis R., Blaxall H. S., Rodriguez-Sierra J. F., Pfeiffer R. F. and Ebadi M. (1994) Distribution of zinc metallothionein I mRNA in rat brain by *in situ* hybridization. *Neurochem. Res.* **19**, 761-767.
- Hamer D. H. (1986) Metallothionein. *Ann. Rev. Biochem.* **55**, 913-951.
- Harrison N. L. and Gibbons S. J. (1994) Zn<sup>2+</sup>: an endogenous modulator of ligand- and voltage-gated ion channels. *Neuropharmacology* **33**, 935-952.
- Haug F.-M. S., Blackstad T. W., Simonsen A. H. and Zimmer J. (1971) Timm's sulphide silver reaction for zinc during experimental anterograde degeneration of hippocampal mossy fibers. *J. comp. Neurol.* **142**, 23-32.
- Heilmaier H. E. and Summer K. H. (1985) Metallothionein content and zinc status in various tissues of rats treated with iodoacetic acid and zinc. *Archs Toxic.* **56**, 247-251.
- Hidalgo J., Campmany L., Marti O. and Armario A. (1991) Metallothionein-I induction by stress in specific brain areas. *Neurochem. Res.* **16**, 1145-1148.
- Hiramatsu M., Kohno M., Mori A., Shiraga H., Pfeiffer R. F. and Ebadi M. (1994) An ESR study of 6-hydroxydopamine-generated hydroxyl radicals and superoxide anions in brain. *Neuroscience* **20**, 129-138.
- Howell G. A. and Frederickson C. J. (1984) Electrical stimulation facilitates zinc turnover in hippocampal slices. In: *The Neurobiology of Zinc* (Frederickson C. J., Howell G. A. and Kasarskis E. J., eds), Vol. A, pp. 141-156. AR Liss, New York.
- Howell G. A. and Frederickson C. J. (1989) A retrograde transport method for mapping zinc-containing fiber systems in the brain. *Brain Res.* **515**, 277-286.
- Howell G. A., Perez-Clausell J. and Frederickson C. J. (1991) Zinc containing projections to the bed nucleus of the stria terminalis. *Brain Res.* **562**, 181-189.
- Huber K. L. and Cousins R. L. (1993) Metallothionein expression in rat bone marrow is dependent on dietary zinc but not dependent on interleukin-1 or interleukin-6. *J. Nutr.* **123**, 642-648.
- Huckle J. W., Morby A. P., Turner J. S. and Robinson N. J. (1993) Isolation of a prokaryotic metallothionein locus and analysis of transcriptional control by trace metal ions. *Molec. Microbiol.* **7**, 177-187.
- Huibregtse J. M., Engelke D. R. and Thiele D. J. (1989) Copper-induced binding of cellular factors to yeast metallothionein upstream activation sequences. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 65-69.
- Ingvarsson S., Asker C., Axelson H., Klein G. and Sunegi J. (1988) Structure and expression of B-myc, a new member of the myc gene family. *Molec. Cell. Biol.* **8**, 3168-3174.
- Itano Y., Noji S., Koyama E., Taniguchi S., Taga N., Takahashi T., Ono K. and Kosaka F. (1991) Bacterial endotoxin-induced expression of metallothionein genes in rat brain, as revealed by *in situ* hybridization. *Neurosci. Lett.* **124**, 13-16.
- Itoh M. and Ebadi M. (1982) The selective inhibition of hippocampal glutamic acid decarboxylase in zinc-treated epileptic seizures. *Neurochem. Res.* **7**, 1287-1298.
- Itoh M., Ebadi M. and Swanson S. (1983) The presence of zinc binding proteins in brain. *J. Neurochem.* **41**, 823-829.
- Iversen P. L. and Ebadi M. (1992) Antisense oligonucleotide-mediated inhibition of metallothionein protein synthesis in neuroblastoma IMR 32 and Chang liver cells in culture. *Biol. Signals* **1**, 57-64.
- Iversen P. L., Mata J. E. and Ebadi M. (1992) Synthetic antisense oligonucleotide probes the essentiality of metallothionein gene. *Biol. Signals* **1**, 293-299.
- Jakobovits A., Schwab M., Bishop J. M. and Martin G. R. (1985) Expression of N-myc in tetradecarcinoma stem cells and mouse embryos. *Nature* **318**, 188-191.
- Kägi J. H. R. and Hunziker P. (1989) Mammalian metallothionein. *Biol. Trace Elem. Res.* **21**, 111-118.
- Kägi J. H. R. and Kojima Y. (1987) Chemistry and biochemistry of metallothionein. *Experientia (Suppl.)* **52**, 25-61.
- Kägi J. H. R. and Schäffer A. (1988) Biochemistry of metallothionein. *Biochemistry* **27**, 8509-8515.
- Kaji T., Mishima A., Koyanagi E., Yamamoto C., Sakamoto M. and Kozuka H. (1992) Possible mechanism for zinc protection against cadmium cytotoxicology in cultured vascular endothelial cells. *Toxicology* **76**, 257-270.
- Karin M. and Richards R. I. (1982) Human metallothionein genes—Primary structure of the metallothionein-II gene and a related processed gene. *Nature* **299**, 797-802.
- Karin M., Eddy R. L., Henry W. M., Haley L. L., Byers M. G. and Shows T. B. (1984) Human metallothionein genes are clustered on chromosome 16. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **81**, 5494-5498.
- Kasahara T., Yagisawa H., Yamashita K., Yamaguchi Y. and Akiyama Y. (1990) IL-1 induces proliferation and IL-6 mRNA expression in a human astrocytoma cell line—Positive and negative modulation by cholera toxin and cAMP. *Biochem. biophys. Res. Commun.* **167**, 1242-1248.
- Kasarskis E. J., Ehmann W. D. and Markesbery W. R. (1993) Trace metals in human neurodegenerative diseases. *Prog. clin. Biol. Res.* **380**, 299-310.
- Katsuura G., Gottshall P. E., Dahl R. R. and Arimura A. (1989) Interleukin-1 beta increases prostaglandin E<sub>2</sub> in rat astrocyte cultures: Modulatory effect of neuropeptides. *Endocrinology* **124**, 3125-3127.
- Kay J., Cryer A., Darke B. M., Kille P., Lees W. E., Norey C. G. and Sark J. M. (1991) Naturally occurring and recombinant metallothioneins: Structure, immunoreactivity and metal-binding functions. *Int. J. Biochem.* **23**, 1-5.
- Kelly S. L., Basu A., Teicher B. A., Hacker M. P., Hamer D. H. and Lazo L. S. (1988) Overexpression of metallothionein confers resistance to anticancer drugs. *Science* **241**, 1813-1815.
- Kikuchi Y., Irie M., Ikebuchi H., Sawada J. and Terao T. (1992) Identification of metallothionein in cultured cells by immunoblotting and immunofluorescence using a new monoclonal antibody. *Hybridoma* **11**, 295-300.
- Kikuchi Y., Irie M., Kasahara T., Sawada J. and Terao T. (1993) Induction of metallothionein in a human astro-

- cytoma cell line by interleukin-1 and heavy metals. *FEBS Lett.* 317, 22-26.
- Kille P., Stephens P. E. and Kay J. (1991) Elucidation of cDNA sequences for metallothioneins from rainbow trout, stone loach and pike liver using the polymerase chain reaction. *Biochim. Biophys. Acta* 1089, 407-410.
- Kissling M. M. and Kägi J. H. R. (1977) Primary structure of human hepatic metallothionein. *FEBS Lett.* 82, 247-250.
- Kobayashi H., Uchida Y., Ihara Y., Nakajima K., Kohsaka S., Miyatake T. and Tsuji S. (1993) Molecular cloning of rat growth inhibitory factor cDNA and the expression in the central nervous system. *Molec. Brain Res.* 19, 188-194.
- van der Krol A. R., Mol N. M. J. and Stuitje A. R. (1988) Modulation of eukaryotic gene expression by complementary RNA or DNA sequences. *Biol. Tech.* 6, 958-976.
- Lee S. C., Dickson D. W., Liu W. and Brosnan C. F. (1993a) Induction of nitric oxide synthase activity in human astrocytes by interleukin-1 $\beta$  and interferon- $\gamma$ . *J. Neuroimmun.* 46, 19-24.
- Lee S. C., Liu W., Dickson D. W., Brosnan C. F. and Berman J. W. (1993b) Cytokine production by human fetal microglia and astrocytes: Differential induction by lipopolysaccharide and IL-1 $\beta$ . *J. Immun.* 150, 2659-2667.
- Mandava P., Howell G. A. and Frederickson C. J. (1993) Zinc-containing neuronal innervation of the septal nuclei. *Brain Res.* 608, 115-122.
- Margoshes M. and Vallee B. L. (1957) A cadmium protein from equine kidney cortex. *J. Am. Chem. Soc.* 79, 4813-4814.
- Maret W. (1994) Oxidative metal release from metallothionein via zinc-thiol/disulfide interchange. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 237-241.
- Masters B. A., Quaife C. J., Erickson J. C., Kelly E. J., Froelick G. J., Zambrowicz B. P., Brinster R. L. and Palmiter R. D. (1994) Metallothionein III is expressed in neurons that sequester zinc in synaptic vesicles. *J. Neurosci.* 14, 5844-5857.
- McCormick D. B., Gregory M. E. and Snell E. E. (1961) Pyridoxal phosphokinase. I. Assay, distribution, purification and properties. *J. Biol. Chem.* 236, 2076-2084.
- Meister A. (1983) Selective modification of glutathione metabolism. *Science* 220, 472-477.
- Merrill A. H., Henderson J. M., Wang E., McDonald B. W. and Millikan W. J. (1984) Metabolism of vitamin B<sub>6</sub> by human liver. *J. Nutr.* 114, 1664-1674.
- Mokdad R., Debec A. and Wegnez M. (1987) Metallothionein genes in *Drosophila melanogaster* constitute a dual system. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 2658-2662.
- Moos T. (1993) Simultaneous application of Timm's sulphide silver method and immunofluorescence histochemistry. *J. Neurosci. Meth.* 48, 149-156.
- Munger K., Germann U. A., Beltramini M., Niedermann D., Baitelli-Eberle G., Kägi J. H. R. and Lerch K. (1985) (Cu, Zn)-Metallothioneins from fetal bovine liver. *J. Biol. Chem.* 260, 10,032-10,038.
- Nakajima K., Adachi M., Kimura M., Kobayashi K. and Suzuki K. (1989) Immunocytochemical studies of metallothionein I in brain, retina, peripheral nerve and paraneuron. *J. Trace Elem. Exp. Med.* 2, 104.
- Nakajima K., Suzuki K., Otaki N. and Kimura M. (1991) Detection of metallothionein in brain. *Meth. Enzym.* 205, 387-395.
- Nishimura N., Nishimura H. and Tohyama C. (1990) Metallothionein localization in cadmium-treated rat brain. *J. Histochem. Cytochem.* 38, 1023.
- Nishimura N., Nishimura H., Ghaffar A. and Tohyama C. (1992) Localization of metallothionein in the brain of rat and mouse. *J. Histochem. Cytochem.* 40, 309-315.
- Nordberg G. F., Nordberg M., Piscator M. and Vestberg O. (1972) Separation of two forms of rabbit metallothionein by isoelectric focusing. *Biochem. J.* 126, 491-498.
- Olafson R. W., Sim R. G. and Boto K. G. (1979) Isolation and chemical characterization of the heavy metal-binding protein metallothionein from marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.* 62, 407-416.
- Paliwal V. K. and Ebadi M. (1989) Biochemical properties of metallothionein isoforms from bovine hippocampus. *Exp. Brain Res.* 75, 477-482.
- Paliwal V. K., Iversen P. L. and Ebadi M. (1990) Regulation of zinc metallothionein II mRNA synthesis in rat brain. *Neurochem. Int.* 17, 441-447.
- Palmiter R. D. (1987) Molecular biology of metallothionein gene expression. *Experientia (Suppl.)* 52, 63-80.
- Palmiter R. D., Findley S. D., Whitmore T. E. and Durham D. M. (1992) MT-III, a brain-specific member of the metallothionein gene family. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 6333-6337.
- Panno J. P. and McKeown B. A. (1993) Expression of the *myc* photo-oncogene in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comp. Biochem. Physiol.* 104b, 649-652.
- Pavletich N. P. and Pabo C. (1991) Zinc finger-DNA recognition: Crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science* 252, 809-817.
- Perez-Clausell J. and Danscher G. (1986) Release of zinc sulphide accumulations into synaptic clefts after *in vivo* injection of sodium sulphide. *Brain Res.* 362, 358-361.
- Peterson M. G. and Mercer J. F. B. (1988) Differential expression of four linked sheep metallothionein genes. *Eur. J. Biochem.* 174, 425-429.
- Peterson M. G., Hannan F. and Mercer J. F. B. (1988) The sheep metallothionein gene family: Structure, sequence, and evolutionary relationship of five linked genes. *Eur. J. Biochem.* 174, 417-424.
- Quaife C. J., Findley S. D., Erickson J. C., Forelick G. J., Kelly E. J., Zambrowicz B. P. and Palmiter R. D. (1994) Induction of a new metallothionein isoform (MT-IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia. *Biochemistry* 33, 7250-7259.
- Richards R. I., Heguy A. and Karin M. (1984) Structural and functional analysis of the human metallothionein-1<sub>A</sub> gene: Differential induction of metal ions and glucocorticoids. *Cell* 37, 273-275.
- Rojas-Castaneda P., Cerutis D. R., Blaxall H. S., Happe H. K., Murrin L. C. and Ebadi M. (1994) Protective effects of zinc and metallothionein in oxygen free radical-mediated oxidative stress in brain. *Soc. Neurosci. Abstr.* 24, 2.
- Sadhu C. and Gedamu L. (1988) Regulation of human metallothionein (MT) genes. *J. Biol. Chem.* 263, 2679-2684.
- Sajjoh K., Kuno T., Shuntoh T., Tanaka C. and Sumino K. (1989) Molecular cloning of cDNA for rat brain metallothionein-II and regulation of its gene expression. *Pharmac. Toxic.* 64, 464-468.
- Sajjoh K., Katsuyama H. and Sumino K. (1994) Brain metallothionein gene expression and regulation. *Biol. Signals* 3, 150-156.
- Sato M. and Bremner J. (1993) Oxygen free radicals and metallothionein. *Free Rad. Biol. Med.* 14, 325-337.

- Sawada M., Suzumura A., Itoh Y. and Marunouchi T. (1993) Production of interleukin-5 by mouse astrocytes and microglia in culture. *Neurosci. Lett.* **155**, 175-178.
- Sawada J., Kikuchi Y., Shibutani M., Mitsumori K., Inoue K. and Kasahara T. (1994) Induction of metallothionein in astrocytes by cytokines and heavy metals. *Biol. Signals* **3**, 157-168.
- Schroeder J. J. and Cousins R. J. (1990) Interleukin-6 regulates metallothionein gene expression and zinc metabolism in hepatocyte monolayer cultures. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 3137-3141.
- Searle P. T., Davison B. L., Stuart G. W., Wilkie T. M., Norstedt G. and Palmiter R. D. (1984) Regulation, linkage, and sequence of mouse metallothionein I and II genes. *Molec. Cell. Biol.* **4**, 1221-1230.
- Semsei I., May S. and Cutler R. G. (1989) Differential expression of the *myc* protooncogene family throughout the lifespan of the C57BL/6J mouse strain. *Oncogene* **4**, 465-470.
- Shiraga H., Pfeiffer R. F. and Ebadi M. (1993) The effects of 6-hydroxydopamine and oxidative stress on the level of brain metallothionein. *Neurochem. Int.* **23**, 561-566.
- Shiraishi N., Hayashi H., Hiraki Y., Hiraki Y., Aono K., Itano Y., Kosaka F., Noji S. and Taniguchi S. (1989) Elevation in metallothionein messenger RNA in rat tissues after exposure to X-irradiation. *Toxic. appl. Pharmac.* **8**, 501-506.
- Slomianka L., Danscher G. and Frederickson C. J. (1990) Labeling of the neurons of origin of zinc-containing pathways by intraperitoneal injections of sodium selenite. *Neuroscience* **38**, 843-854.
- South T. L. and Summers M. F. (1990) Zinc fingers. *Adv. Inorg. Biochem.* **8**, 199-248.
- Spranger M., Lindholm D., Bandtlow C., Heumann R., Gnahn H., Näher-Noe M. and Thoenen H. (1990) Regulation of nerve growth factor (NGF) synthesis in the rat central nervous system: Comparison between the effects of interleukin-1 and various growth factors in astrocyte cultures and *in vivo*. *Eur. J. Neurosci.* **2**, 69-76.
- Stein C. A. and Cohen J. S. (1988) Oligodeoxynucleotides as inhibitors of gene expression: A review. *Cancer Res.* **48**, 2659-2668.
- Sutcliffe J. G. (1988) mRNA in the mammalian central nervous system. *Ann. Rev. Neurosci.* **11**, 157-198.
- Suzuki K., Nakajima K., Kawaharada U., Hara F., Uehara K., Otaki N., Kimura M. and Tamura Y. (1992a) Localization of metallothionein in the brain of *Macaca fascicularis*. *Acta Histochem. Cytochem.* **25**, 609-616.
- Suzuki K., Nakajima K., Kawaharada U., Uehara K., Hara F., Otaki N., Kimura M. and Tamura Y. (1992b) Metallothionein in the human brain. *Acta Histochem. Cytochem.* **25**, 617-622.
- Suzuki K., Nakajima K., Otaki N. and Kimura M. (1994) Metallothionein in developing human brain. *Biol. Signals* **3**, 188-192.
- Takahashi T., Paliwal V. K. and Ebadi M. (1988) Subcellular distribution of zinc and the presence of a metallothionein-like protein in bovine retina. *Neurochem. Int.* **13**, 525-530.
- Takeda A., Sato T., Tamano H. and Okada S. (1992) Elevation of hepatic levels of metallothionein and zinc in mice bearing experimental tumors. *Biochem. biophys. Res. Commun.* **189**, 645-649.
- Takeda A., Norris J. S., Iversen P. L. and Ebadi M. (1994) Antisense oligonucleotide of *c-myc* discriminates between zinc- and dexamethasone-induced synthesis of metallothionein. *Pharmacology* **48**, 119-126.
- Taplitz S. J., Calame K. L. and Herschman H. R. (1986) Alternative inducers of the rat metallothionein I gene cause distinct changes in chromatin structure in the 5' region of the gene. *Molec. Cell. Biol.* **6**, 2576-2581.
- Toulme J. J. and Helene C. (1988) Antimessenger oligodeoxynucleotides: An alternative to antisense RNA for artificial regulation of gene expression. A review. *Gene* **72**, 51-58.
- Tsuji S., Kobayashi H., Uchida Y., Ihara Y. and Miyatake T. (1992) Molecular cloning of human growth inhibitor factor cDNA and its down-regulation in Alzheimer's disease. *EMBO J.* **11**, 4843-4850.
- Turner J. S., Morby A. P., Whitton B. A., Gupta A. and Robinson N. J. (1993) Construction of  $Zn^{2+}/Cd^{2+}$  hypersensitive cyanobacterial mutants lacking a functional metallothionein locus. *J. Biol. Chem.* **268**, 4494-4498.
- Uchida Y., Takio K., Titani K., Ihara Y. and Tomonaga M. (1991) The growth inhibitory factor that is deficient in the Alzheimer's disease brain is a 68 amino acid metallothionein-like protein. *Neuron* **7**, 337-347.
- Vallee B. L. (1988) Zinc: Biochemistry, physiology, toxicology and clinical pathology. *Biofactors* **1**, 31-36.
- Vallee B. L. and Auld D. S. (1990) Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins. *Biochemistry* **29**, 5647-5659.
- Vallee B. L. and Falchuk K. H. (1993) The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol. Rev.* **73**, 79-118.
- Van Beneden R. J., Watson D. K., Chen T. T., Lautenberger T. A. and Papas T. S. (1986) Cellular *myc* (*c-myc*) in fish (rainbow trout). *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 3698-3702.
- Varshney U., Jahroudi N., Foster R. and Gedamu L. (1986) Structure, organization and regulation of human metallothionein gene: Differential and cell-type-specific expression in response to heavy metals and glucocorticoids. *Molec. Cell. Biol.* **6**, 26-37.
- Walsh C. T., Sandstead H. H., Prasad A. S., Newberne P. M. and Fraker P. J. (1994) Zinc: Health effects and research priorities for the 1990s. *Envir. Health Perspect.* **102**, 5-46.
- Westbrook G. L. and Mayer M. L. (1987) Micromolar concentrations of  $Zn^{2+}$  antagonize NMDA and GABA responses of hippocampal neurons. *Nature* **328**, 640-643.
- Wilkinson D. G. and Nemer M. (1987) Metallothionein genes MTA and MTH expressed under distinct quantitative and tissue-specific regulation in sea urchin embryos. *Molec. Cell. Biol.* **7**, 48-58.
- Winge D. R., Nielson K. B., Zeikus R. D. and Gray W. R. (1984) Structural characterization of the isoforms of neonatal and adult rat liver metallothionein. *J. Biol. Chem.* **259**, 11,419-11,425.
- Wong K.-L. and Klaassen C. D. (1979) Isolation and characterization of metallothionein which is highly concentrated in newborn rat liver. *J. Biol. Chem.* **254**, 12,399-12,403.
- Woodroffe M. N., Sarna G. S., Wadhwa M., Hayes G. M., Loughlin A. J., Tinker A. and Cuzner M. L. (1991) Detection of interleukin-1 and interleukin-6 in adult rat brain, following mechanical injury, by *in vivo* microdialysis: Evidence of a role for microglia in cytokine production. *J. Neuroimmun.* **33**, 227-236.
- Wu F. Y.-H. and Wu C.-W. (1987) Zinc in DNA replication and transcription. *Ann. Rev. Nutr.* **7**, 251-272.
- Wu J. Y. and Roberts E. (1974) Properties of brain L-glu-

- tamic decarboxylase: Inhibition studies. *J. Neurochem.* **23**, 759-767.
- Wu J. Y., Wong E., Saito K., Roberts E. and Schousboe A. (1976) Properties of L-glutamate decarboxylase from brains of adult and newborn mice. *J. Neurochem.* **27**, 653-659.
- Xie X. and Smart T. G. (1991) A physiological role for endogenous zinc in rat hippocampal synaptic neurotransmission. *Nature* **349**, 521-524.
- Yan H. Q., Banos M. A., Herrogoitia P., Hooghe R. and Hooghe-Peters E. L. (1992) Expression of interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6 and their respective receptors in the normal rat brain and after injury. *Eur. J. Immun.* **22**, 2903-2911.
- Yang Y.-Y., Woo E. S., Reese C. E., Bahnson R. R., Saijo N. and Lazo J. S. (1994) Human metallothionein isoform gene expression in cisplatin-sensitive and resistant cells. *Molec. Pharmac.* **45**, 453-460.
- Yokoyama M., Koh H. and Choi D. W. (1986) Brief exposure to zinc is toxic to cortical neurons. *Neurosci. Lett.* **71**, 351-355.
- Young J. K. (1994) Glial metallothionein. *Biol. Signals* **3**, 169-175.
- Young J. K., Garvey J. S. and Huang P. C. (1991) Glial immunoreactivity for metallothionein in the rat brain. *Glia* **4**, 602-610.
- Zheng W., Perry D. F., Nelson D. L. and Aposhian V. (1991) Choroid plexus protects cerebrospinal fluid against toxic metals. *FASEB J.* **5**, 2188-2193.
- Zimmerman K. A., Yancopoulos G. D. and Collum R. G. (1986) Differential expression of *myc* family genes during murine development. *Nature* **319**, 780-783.
- Zon G. (1988) Oligonucleotide analogues as potential chemotherapeutic agents. *Pharmac. Res.* **5**, 539-549.

**ANEXO 4**

# Mecanismos de Neurotoxicidad de la 1-Metil-4-Fenil-1,2,3,6-Tetrahidropiridina (MPTP)

MC. Patricia Rojas, Quim. Camilo Ríos

Departamento de Neuroquímica, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez". S.S.

**RESUMEN:** La neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) produce toxicidad a las neuronas dopaminérgicas de la vía nigroestriatal, como en la enfermedad de Parkinson idiopática. El mecanismo de daño celular causado por esta toxina se desconoce, sin embargo, se han propuesto una serie de hipótesis: el daño a la mitocondria y la fuerza oxidativa. El 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP<sup>+</sup>), el mayor metabolito activo de la MPTP es captado por la mitocondria, en donde se acumula e inhibe la oxidación de sustratos unidos al NADH de la mitocondria causando una disminución del ATP. Esto sugiere que la toxicidad del MPP<sup>+</sup> puede atribuirse a la inhibición de las funciones de la mitocondria. Sin embargo, esta disminución ha sido observada durante pocas horas. Esto sugiere un segundo mecanismo de daño a las neuronas que pueda explicar los efectos a largo plazo del MPP<sup>+</sup>. La MPTP genera la formación de radicales libres del oxígeno así como también reduce las defensas antioxidantes endógenas y el glutatión para combatir los radicales libres. La toxicidad de la MPTP es disminuida por una variedad de antioxidantes y por el ácido ascórbico que pueden reducir los cambios bioquímicos producidos por el tratamiento con la MPTP. Esos resultados sugieren que la fuerza oxidativa puede producir daño a las neuronas después de la administración de la MPTP.

**Palabras clave:** MPTP, MPP<sup>+</sup> Enfermedad de Parkinson, Neurotoxicidad.

**ABSTRACT:** 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) has been demonstrated to cause selective cytotoxicity to dopaminergic neurons in the midbrain and their projections into the striatum, as in Parkinson's disease. It has been speculated that the mechanism underlying the deleterious effects of MPTP involve at least two potential components: mitochondrial damage and oxidative stress. 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>), the major metabolite of MPTP, is taken up by the mitochondria to inhibit the oxidation of NADH-linked substrates by mitochondria. This suggests that MPP<sup>+</sup> toxicity might be attributed to its inhibition of mitochondrial functions, and subsequent ATP depletion. However, this depletion has been observed for only a few hours. This result suggests a second mechanism of cell damage which explains the long-term effects of MPP<sup>+</sup>, acting in addition to mitochondrial toxicity. MPTP induces oxygen free radical generation and also reduces endogenous antioxidant defences against free radicals such as glutathione. MPTP toxicity is attenuated by a variety of antioxidants, and ascorbic acid can reduce the biochemical changes in the brain consequent to MPTP treatment. These results suggest that oxidative stress may act to produce cell damage after MPTP administration.

**Key words:** MPTP, MPP<sup>+</sup>, Parkinson's disease, Neurotoxicity.

---

**L**a enfermedad de Parkinson es un desorden neurodegenerativo, progresivo, con características patológicas y clínicas bien conocidas. Fue descrita por primera vez en detalle por James Parkinson en 1817 y se le conoció como parálisis agitante. En esta patología se presenta un cuadro clínico caracterizado por bradicinesia, temblor y rigidez

muscular<sup>1</sup>. Esto es causado por la degeneración y muerte de las neuronas dopaminérgicas de la vía nigroestriatal<sup>2</sup>, que producen una disminución en el contenido de dopamina en el cuerpo estriado. En la etiología de la enfermedad de Parkinson no hay factores hereditarios implicados pero se ha señalado que pueden participar compuestos químicos neurotóxicos endógenos y exógenos<sup>3-7</sup>. Para el estudio de los mecanismos etiológicos de la enfermedad de Parkinson se han desarrollado varios modelos. El hallazgo más

---

Correspondencia: Patricia Rojas, Departamento de Neuroquímica, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez". Insurgentes Sur No. 3877, Deleg. Tlalpan, C.P. 14269 México, D.F.

importante en los años recientes es el de la toxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), que produce síntomas clínicos y patología muy similar a la de la enfermedad de Parkinson<sup>8-9</sup>. Esta neurotoxina fue producida como un contaminante intermediario de una droga de abuso producida ilícitamente, el 1-metil-4-fenil-4-propionoxiperidino (MPPP), que se forma por la deshidratación de un precursor de este compuesto. Cuando los adictos a las drogas se administraron esta meperidina sintética que contenía la MPTP presentaron un síndrome parkinsoniano permanente<sup>8-9</sup>, así como cambios intelectuales similares a los que se presentan en los pacientes con la enfermedad de Parkinson tardía<sup>10</sup>. Se ha encontrado que esta neurotoxina reproduce las características patológicas y bioquímicas de la enfermedad en humanos así como cuando se administra en el mono y en el ratón. La MPTP produce hipocinesia y daño específico en el sistema dopaminérgico nigroestriatal similar al descrito para la enfermedad de Parkinson idiopática<sup>11</sup>. La alteración es acompañada por una disminución del contenido de la dopamina en el cuerpo estriado. Es ampliamente reconocido que la administración de MPTP es el mejor modelo experimental con el que se cuenta para el estudio de los cambios neuroquímicos que se presentan en la enfermedad de Parkinson<sup>12</sup>.

#### METABOLISMO DE LA MPTP

La MPTP es un compuesto soluble en lípidos que fácilmente penetra las membranas, incluyendo la barrera hematoencefálica. Después de su administración, la MPTP es convertida al ion 1-metil-4-fenilpiridino (MPP<sup>+</sup>), que se forma en todos los tejidos incluyendo al cerebro; esta biotransformación requiere de la enzima monoamino-oxidasa (MAO-B). El efecto protector de los inhibidores de la MAO-B sobre la toxicidad de la MPTP sugiere que la biotransformación a MPP<sup>+</sup> es necesaria para que ocurra el daño<sup>11,13</sup>. La oxidación de la MPTP a MPP<sup>+</sup> ocurre en 2 pasos siendo el 1-metil-4-fenil-3,4-dihidropiridino (MPDP<sup>+</sup>) un intermediario que se transforma de manera espontánea en MPDP y MPP<sup>+</sup> o por la acción subsecuente de la MAO. El MPP<sup>+</sup> permanece en el cerebro del mono por varios días (la vida media se ha calculado en 10 días), pero desaparece rápidamente del cerebro del ratón. El metabolismo de la MPTP en otros tejidos, como el hígado involucra vías adicionales que generan metabolitos que no producen toxicidad neurológica o general y a nivel periférico el metabolismo de la MPTP actúa como un mecanismo detoxificante<sup>14</sup>. La localización de la MAO puede ser determinante para la toxicidad de la MPTP. Sin embargo, esta enzima no se encuentra en gran cantidad en las neuronas dopaminérgicas, sino que predomina

en las neuronas serotoninérgicas, en los astrocitos<sup>15-17</sup> y en las paredes de los vasos sanguíneos de algunas especies. Si la MAO-B está presente en altas concentraciones en los capilares o en los vasos sanguíneos, fuera de la barrera hematoencefálica, la conversión de MPTP a MPP<sup>+</sup> en este sitio puede limitar la entrada de la toxina al cerebro. El MPP<sup>+</sup> es un compuesto polar que difunde con dificultad a través de las membranas lipídicas; sin embargo, sale de las neuronas serotoninérgicas y de los astrocitos para concentrarse selectivamente por el sistema de recaptura de la dopamina en las neuronas dopaminérgicas<sup>18-20</sup> donde es secuestrado, localizándose en las vesículas sinápticas con la dopamina, concentrándose en la mitocondria o uniéndose con alta afinidad a la neuromelanina que está presente en los cuerpos neuronales de los mamíferos superiores<sup>21,22</sup>. Si se dan inhibidores del sistema de recaptura de la dopamina (por ejemplo el mazindol), se evita el daño a las neuronas dopaminérgicas<sup>23</sup> indicando que este paso es importante para su toxicidad.

#### MECANISMOS DE NEUROTOXICIDAD DEL ION 1-METIL-4-FENILPIRIDINO (MPP<sup>+</sup>)

La administración directa del MPP<sup>+</sup> en diferentes áreas cerebrales ejerce sus efectos neurotóxicos a largo plazo. Estos hallazgos han conducido a que el MPP<sup>+</sup> se considere el responsable de la toxicidad de la MPTP. Sin embargo, los mecanismos de daño celular debidos al MPP<sup>+</sup> se desconocen. El primer mecanismo de toxicidad considerado para el MPP<sup>+</sup> fue el de un estrés redox, como el que ocurre con el paraquat (una molécula estructuralmente parecida al MPP<sup>+</sup>), formándose durante este ciclo radical del oxígeno que son citotóxicos. Por otro lado, se encontró que el MPP<sup>+</sup> inhibe la cadena respiratoria, por su acumulación en la mitocondria lo que provocaría la disminución en la producción del ATP<sup>24,25</sup> y como consecuencia el daño celular.

#### INHIBICION DE LA RESPIRACION MITOCONDRIAL POR EL MPP<sup>+</sup>

Una de las hipótesis para explicar la toxicidad del MPP<sup>+</sup> está en relación a los recientes hallazgos que sugieren que esa neurotoxina es un inhibidor del transporte de electrones en la mitocondria a nivel del complejo I (NADPH-CoQ reductasa), esto se ha demostrado en preparaciones de mitocondria del cerebro de la rata, del ratón o en hígado de rata<sup>26</sup>, así como en rebanadas del cuerpo estriado de la rata. Se ha reportado que el MPP<sup>+</sup> inhibe casi completamente la oxidación de los sustratos oxidados por el NAD<sup>+</sup> como son el piruvato/malato y



glutamato/malato, que ceden equivalentes reductores hacia la cadena de transporte de electrones a través del complejo I. Mientras la oxidación del succinato que involucra el paso de equivalentes reductores a la coenzima Q (CoQ) vía el complejo II, no está inhibida. Para que los efectos mencionados puedan llevarse a cabo es necesario que el MPP<sup>+</sup> se concentre en la mitocondria. Esta concentración se lleva a cabo por un sistema de transporte dependiente de energía. Se ha sugerido que el MPP<sup>+</sup> no inhibe la reducción del ferricianuro indicando que el sitio de inhibición del MPP<sup>+</sup> en el complejo I está entre el potencial más alto del grupo Fe-S de la NADH deshidrogenasa y la CoQ, probablemente cerca o en el sitio de unión de la rotenona<sup>27,28</sup>. Ya que administrados estereotaxicamente en el mesencéfalo de la rata los inhibidores del sitio I como la rotenona, los barbitúricos y la piericidina A, producen el daño a las neuronas dopaminérgicas como sucede con el MPP<sup>+</sup>. Por otro lado, los iones de calcio también interfieren con la captura del MPP<sup>+</sup> cuando se analiza en mitocondrias de la rata debido a que este catión puede compeler por el mismo gradiente electroquímico. En otros estudios se ha encontrado que el MPP<sup>+</sup> produce cambios metabólicos (ejemplo acumulación de lactato) en rebanadas de neocórtex de la rata, que conducen a la disminución de la energía almacenada<sup>29,30</sup>. Se ha demostrado que los efectos citotóxicos de la MPTP/MPP<sup>+</sup> producen disminución del ATP, evento que ocurre antes de la muerte celular. También se ha observado que aunque el MPP<sup>+</sup> y el paraquat tienen actividades citotóxicas similares, los mecanismos que conducen a la muerte celular pueden ser distintos.

Estudios recientes en hepatocitos sugieren que los eventos bioquímicos que directamente conducen a la muerte celular son debido a cambios en la concentración de calcio intracelular como son un incremento del calcio citosólico y una disminución del calcio en la mitocondria, que disminuye la salida del catión a través de la membrana celular<sup>31</sup>.

Este hallazgo sugiere que el desequilibrio en la entrada o salida de calcio puede ser el mecanismo de muerte celular producido por la MPTP. Pocos experimentos han investigado los efectos *in vivo* de la MPTP en la función mitocondrial.

Sin embargo, la inhibición *in vivo* de la respiración mitocondrial por la MPTP puede ser de duración corta (unas pocas horas) con un retorno total de la función pocos días después del tratamiento. Un estudio ha reportado cambios en las mitocondrias del cerebro después de la administración de la MPTP a monos<sup>32</sup>.

Esos cambios no son similares a los observados en el ratón, es posible que estos sean transitorios y no pueden explicar completamente los efectos a largo plazo.

## HIPOTESIS DEL ESTRÉS REDOX

A continuación se detallan evidencias a favor y en contra de esta hipótesis. La formación de radicales libres es un mecanismo mediador de los efectos tóxicos de una gran variedad de sustancias<sup>33</sup>. La similitud en la estructura del MPP<sup>+</sup> y el paraquat sugiere que los mecanismos de toxicidad pueden ser similares. Se ha propuesto que los efectos tóxicos del paraquat son mediados por un estrés redox y que en presencia del oxígeno se forman radicales superóxido<sup>34</sup>. Después de la disminución en los antioxidantes protectores endógenos, se forman radicales hidroxilo, superóxido y el peróxido de hidrógeno, que causan la peroxidación de lípidos de la membrana, que dañan el DNA y el RNA, o bien inactivan enzimas vitales. En el metabolismo normal las enzimas superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa previenen la acumulación de radicales libres. Debido a la analogía estructural del paraquat (PQ) y el MPP<sup>+</sup> se ha propuesto que este último puede mediar su toxicidad por el estrés redox. En el caso del paraquat la molécula se reduce formando radical PQ<sup>•+</sup>, que es reoxidado a PQ<sup>2+</sup> por la molécula de oxígeno formándose el radical superóxido. El superóxido es convertido a peróxido de hidrógeno y subsecuentemente a radical hidroxilo, conduciendo a la peroxidación de lípidos de las membranas celulares. La hipótesis estrés redox para la toxicidad del MPP<sup>+</sup> relaciona la formación de radicales libres y mecanismos oxidativos que pueden ser responsables de la disminución de las neuronas de la sustancia nigra con la edad<sup>35</sup>. Las evidencias a favor de un papel del estrés redox del MPP<sup>+</sup> son indirectas. Se ha demostrado la formación de radicales libres en presencia de MPTP, MPDP<sup>+</sup> y MPP<sup>+</sup>. En la transformación del MPDP<sup>+</sup> a MPDP radical, se puede reducir el oxígeno y así formar el radical superóxido. El MPDP produce MPP radical en presencia de MPP<sup>+</sup>. A su vez en la reducción de MPP<sup>+</sup> a MPP radical se forma el radical superóxido, o bien se forma el radical hidroxilo y también el superóxido en presencia de citocromo P-450 reductasa<sup>30,36</sup>. En el caso de la MPTP, se forma el radical superóxido en presencia de metales reactivos. El MPDP<sup>+</sup> reacciona con la melanina y cataliza la formación del radical superóxido indicando que el MPP<sup>+</sup> es capaz de participar en el ciclo redox y que el MPDP<sup>+</sup> puede estar involucrado en su iniciación. El peróxido de hidrógeno es un compuesto importante porque media la formación de radicales libres. En el caso de la MPTP, cuando se metaboliza a MPP<sup>+</sup> se produce el peróxido de hidrógeno en los astrocitos, neuronas serotonérgicas y células endoteliales<sup>15,37</sup>. La producción de peróxido de hidrógeno puede generar especies reactivas del oxígeno, como son los radicales hidroxilo. El potencial oxidativo del peróxido de hidrógeno puede explicar la

toxicidad en astrocitos y en células endoteliales inducida por la MPTP<sup>38</sup>. Un inhibidor de la superóxido dismutasa, el dietilditiocarbamato, potencia la neurotoxicidad de la MPTP. Este efecto puede indicar que la superóxido dismutasa es crítica para la protección de la toxicidad de la MPTP, probablemente por la detoxificación del radical superóxido. Los antioxidantes protegen de la neurotoxicidad sistémica de la MPTP. Con uno de los antioxidantes más importantes, la vitamina E, se ha demostrado que en animales con deficiencia de esta vitamina tienen elevadas tasas de generación de radicales superóxido después de la administración de la MPTP. Por otra parte, la toxicidad de la neurotoxina se ha encontrado que se potencia en animales deficientes en vitamina E<sup>39</sup>. Esto puede estar indicando que la MPTP induce daño oxidativo. Otro antioxidante importante es la vitamina C, del que se ha demostrado su efecto protector contra la toxicidad de la MPTP<sup>40</sup>. La administración de (-)-2-oxo-4-tiazolidine carboxilato, precursor de la síntesis de glutatión, incrementa los niveles en cerebro del aminoácido y atenúa la disminución de la dopamina en el cuerpo estriado y sus metabolitos inducida por la MPTP. Esto demuestra que el glutatión es un factor crítico en la toxicidad de la MPTP. De la misma manera, se ha reportado que la MPTP disminuye los niveles de glutatión en el mesencéfalo, pero no en el cuerpo estriado<sup>41</sup>. La peroxidación de lípidos puede ser una secuela de la fuerza oxidativa, especialmente en animales deficientes en vitamina E. Una medición indirecta de la peroxidación de lípidos *in vivo* es la acumulación de la lipofuscina; se ha encontrado que hay un incremento en este tipo de depósito en la sustancia nigra y en la retina después de la administración de la MPTP. Se encontró que en el cerebro el MPP<sup>+</sup> estimula la peroxidación de lípidos, pero la MPTP inhibe ese proceso<sup>42,43</sup>. Otro hallazgo interesante es que se ha encontrado que el MPP<sup>+</sup> induce un incremento en dos índices de peroxidación de lípidos en el cuerpo estriado y en el mesencéfalo que están involucradas en el daño reportado por la toxina. Estos resultados sugieren que la fuerza oxidativa puede actuar para producir daño celular después de la administración de la MPTP<sup>44</sup>. Sin embargo, hay otras evidencias en contra de la participación de los radicales libres en la neurotoxicidad de la MPTP. Algunos grupos de investigación no encuentran protección con antioxidantes. Sin embargo, los datos en la literatura muestran que los resultados negativos con la vitamina E, vitamina C, beta-caroteno, N-acetilcisteína y otros antioxidantes son preliminares, porque no se demostró la entrada de los antioxidantes en el cerebro antes de probar el efecto de estos sobre la toxicidad de la MPTP. En células de mesencéfalo se ha demostrado que los antioxidantes no protegen contra la toxicidad de la

MPTP o el MPP<sup>+</sup>. Químicamente, es imposible que el MPP<sup>+</sup> participe en el ciclo redox, porque para que se lleve a cabo fisiológicamente la reducción de MPP<sup>+</sup> y así se formen los radicales libres, se necesita de un potencial electroquímico elevado. El dietilditiocarbamato produce retención de la MPTP y el MPP<sup>+</sup> en el tejido y esto puede producir la toxicidad. La MPTP y el MPP<sup>+</sup> no inducen fuerza oxidativa en hepatocitos. La administración sistémica de MPTP no forma peróxidos lipídicos medidos a través de la técnica de dienos conjugados. La administración de algunas drogas que incrementan el contenido de glutatión intracelular no protegen de la neurotoxicidad de la MPTP. Estas son las principales hipótesis que se han planteado como posible mecanismo de daño celular producido por la toxicidad de la MPTP/MPP<sup>+</sup><sup>45,46</sup>.

## REFERENCIAS

- 1.- Javoy-Agid F, Ruberg M, Taquer H, Bobobza B, Agid Y, et al. Biochemical neuropathology of Parkinson's disease. *Adv Neurol* 1984; 40: 189-97.
- 2.- Jenner P, Rupniak NM, Rose S, Kelly E, Kilpatrick G, et al. 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonism in the common marmoset. *Neurosci Lett* 1984; 50: 85-90.
- 3.- Calne DB, Langston JW. Etiology of Parkinson's disease. *Lancet* 1983; 2: 1457-59.
- 4.- Snyder SH, D'Amato RJ. MPTP: a neurotoxin relevant to the pathophysiology of Parkinson's disease. *Neurology* 1986; 36: 250-58.
- 5.- Markey SP, Schuffner NR. The pharmacology of the parkinsonian syndrome producing neurotoxin MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) and structurally related compounds. *Med Res Rev* 1986; 6: 389-429.
- 6.- Tanner CM. The role environmental toxins in the etiology of Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 1989; 12: 49-53.
- 7.- Jenner P. Clues to the mechanism underlying dopamine cell death in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1989; 22-28.
- 8.- Davis GC, Williams AC, Markey SP, et al. Chronic parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry Res.* 1979; 1: 249-54.
- 9.- Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I. Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 1983; 219: 979-80,29.
- 10.- Stern Y, Langston JW. Intellectual changes in patients with MPTP-induced parkinsonism. *Neurology* 1985; 35: 1506-09.
- 11.- Heikkila RE, Hess A, Duvoisin RC. Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mice. *Science* 1984; 224: 1451-53.
- 12.- Gerlach M, Riederer P, Przuntek H, Youdim MBH. MPTP mechanisms of neurotoxicity and their implications for Parkinson's disease. *Eur J Pharmacol Mol Pharmacol* 1991; 200: 273-86.
- 13.- Langston JW, Irwin I, Langston EB, Forno LS. 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP<sup>+</sup>): identification of a metabolite of MPTP a toxin selective to the substantia nigra. *Neurosci Lett* 1984; 48: 87-92.
- 14.- Chiba K, Kubota E, Miyakawa T, Kato Y, Ishizaki T. Characterization of hepatic microsomal metabolism as an *in vivo* detoxification pathway of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 1988; 246: 1108-15.
- 15.- Westlund KN, Denney RM, Kochersperger LM, Rose RM,

- Abell CW. Distinct monoamine oxidase A and B populations in primate brain. *Science* 1985; 230: 181-83.
- 16.- Nakamura S, Vincent SR. Histochemistry of MPTP oxidation in the rat: sites of synthesis of the parkinsonism-inducing toxin MPP<sup>+</sup>. *Neurosci Lett* 1986; 65: 321-25.
- 17.- Mytilineou C, Friedman L. Studies on the metabolism and toxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in cultures of embryonic rat mesencephalon. *J Neurochem* 1988; 51: 750-55.
- 18.- Javitch JA, Snyder SH. Uptake of MPP<sup>+</sup> by dopamine neurons explains selectivity of parkinsonism-inducing neurotoxin, MPTP. *Eur J Pharmacol* 1984; 106: 455-6.
- 19.- Chiba K, Trevor AJ, Castagnoli Jr N. Active uptake of MPP<sup>+</sup>, a metabolite of MPTP by brain synaptosomes. *Biochem Biophys Res Commun* 1985; 128: 1228-32.
- 20.- Schinelli S, Zuddas A, Kopin IJ, Barker JL, DiPorzio U. 1-methyl-4-phenylpyridinium uptake in dissociated cell cultures from the embryonic mesencephalon. *J Neurochem* 1988; 50: 1900-7.
- 21.- D'Amato, R.J., Lipman, Z.P. and Snyder, S.H. Selectivity of the parkinsonian neurotoxin MPTP: toxic metabolite MPP<sup>+</sup> binds to neuromelanin. *Science*. 1986; 231: 987-989.
- 22.- D'Amato, R.J., Benham, D.F. and Snyder, S.H. Characterization of the binding of N-methyl-4-phenylpyridine, the toxic metabolite of the parkinsonian neurotoxin N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, to neuromelanin. *J Neurochem*. 1987; 48: 653-658.
- 23.- Mihalsch W, Ruse H, Przuntek H. Intracerebroventricular administration of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion in mice: effects of simultaneously administered nomifensine, deprenyl, and 1-1-butyl-4,4'-diphenylpiperidine. *J Neural Transm* 1988; 71: 177-88.
- 24.- DiMonte D, Sandy MS, Ekstrom G, Smith MT. Comparative studies on the mechanisms of paraquat and 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP<sup>+</sup>) cytotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; 137: 303-9.
- 25.- Ramsay RR, Singer TP. Energy-dependent uptake of N-methyl-4-phenylpyridinium, the neurotoxic metabolite of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, by mitochondria. *J Biol Chem* 1986; 261: 7585-7.
- 26.- Sánchez-Ramos JR, Helti F, Hollinden DE, Jasick T, Rosenthal M. Oxyl radicals and mitochondrial inhibition hypotheses. In: *Progress in Parkinson Research* Ed. Helti, F. Plenum Press, New York. 1988; 145-52.
- 27.- Ramsay RR, Salach JI, Dadgar J, Singer TP. Inhibition of mitochondrial NADH dehydrogenase by pyridine derivatives and its possible relation to experimental and idiopathic parkinsonism. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; 135: 269-75.
- 28.- Ramsay RR, Kowal AT, Johnson MK, Salach JI, Singer TP. The inhibition site of MPP<sup>+</sup>, the neurotoxic bioactivation product of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine is near the Q-binding site of NADH dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys* 1987; 259: 645-9.
- 29.- Vyas I, Heikkila RE, Nicklas WJ. Studies on the neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: inhibition of NAD-linked substrate oxidation by its metabolite, 1-methyl-4-phenylpyridinium. *J Neurochem* 1986; 46: 1501-7.
- 30.- Chacon JN, Chedekel MR, Land EJ, Truscott TG. Chemically induced Parkinson's disease: intermediates in the oxidation of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine to the 1-methyl-4-phenyl-pyridinium ion. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 144: 957-64.
- 31.- JM, Nicolera P, Orrenius S. The mechanism of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity: role of intracellular calcium. *Arch Biochem Biophys* 1988; 260: 789-97.
- 32.- Nakamura H, Kato S, Tanaka J. Mitochondria covered with a net of parallel and latticed filaments in nigral neurons of monkeys with experimental parkinsonism. *Acta Neuropathol* 1989; 77: 489-93.
- 33.- Trush MA, Mimmaugh EG, Gram TE. Activation of pharmacologic agents to radical intermediates. Implications for the role of free radicals in drug action and toxicity. *Biochem Pharmacol* 1982; 31: 3335-46.
- 34.- Bus JS, Cogen S, Olgaard M, Gibson JE. A mechanism of paraquat. II. Intermediates in the oxidation and reduction reactions of the 1-methyl-4-phenyl-2,3-dihydropyridinium ion and its deprotonated form. *Biochem Biophys Res Commun* 1976; 158: 63-71.
- 35.- Mann DM, Yates PO. Possible role of neuromelanin in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Mech Ageing Dev* 1983; 21: 193-203.
- 36.- Sinha BK, Singh Y, Krishna G. Formation of superoxide and hydroxyl radicals from 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP<sup>+</sup>): Reductive activation by NADPH cytochrome P-450 reductase. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; 135: 583-8.
- 37.- Korytowski W, Felix CC, Kalyanaram B. Oxygen activation during the interaction between MPTP metabolites and synthetic neuromelanin: ESR-spin trapping, optical and oxidase electrode study. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 154: 781-8.
- 38.- Adams JD, Kalivas PW, Miller CW. The acute histopathology of MPTP in the mouse CNS. *Brain Res Bull* 1989; 23: 1-17.
- 39.- Odunze IN, Klaidman LK, Adams JD. MPTP toxicity in the mouse brain and vitamin E. *Neurosci Lett* 1990; 108: 346-9.
- 40.- Perry TL, Yong VW, Clavier RM, Jones K, Wright JM, et al. Partial protection from the dopaminergic neurotoxin N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine by four different antioxidants in the mouse. *Neurosci Lett* 1985; 60: 109-14.
- 41.- Yong V, Perry T, Krism A. Depletion of glutathione in brainstem of mice caused by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine is prevented by antioxidant pretreatment. *Neurosci Lett* 1986; 63: 56-60.
- 42.- Rios C, Tapia R. Changes in lipid peroxidation induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and 1-methyl-4-phenylpyridinium in mouse brain homogenates. *Neurosci Lett* 1987; 77: 321-6.
- 43.- Rojas P, Rios C. Increased striatal lipid peroxidation after intracerebroventricular MPP<sup>+</sup> administration to mice. *Pharmacol Toxicol* 1993; 72: 364-8.
- 44.- Adams JD, Odunze IN. Biochemical mechanisms of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity. Could oxidative stress be involved in the brain? *Biochem Pharmacol*. 1991; 41: 1099-105.
- 45.- Perry TL, Yong VW, Jones K, Wright JM. Manipulation of glutathione contents fails to alter dopaminergic nigrostriatal neurotoxicity of N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the mouse. *Neurosci Lett* 1986; 70: 261-5.
- 46.- Frank DM, Arora PK, Blumer JL, Sayre LM. Model study on the bio-reduction of paraquat, MPP<sup>+</sup> and analogs. Evidence against a redox cycling mechanism in MPTP neurotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 147: 1095-104.

© Publicaciones Científicas INNNMVS, 1994.