

11281
7



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

**"EFECTO TÓXICO DE LA L-3, 4-DIHIROXIFENILALANINA SOBRE
CÉLULAS CROMAFINES *IN VITRO* Y EN TRANSPLANTE EN UN
MODELO ANIMAL DE ENFERMEDAD DE PARKINSON"**

T E S I S

**PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS**

ALEPH ALEJANDRO CORONA MORALES

**TUTOR
DRA. LIMEI ZHANG JI
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA
FACULTAD DE MEDICINA
UNAM**



MEXICO, D.F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

OCTUBRE 2002



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A la vida

A mi madre Coco y mi padre Tomás

A Lluvia y a Vane

A mis abuelas Esperanza y Neri

A W&B

A mi amada UNAM

A mi asesora Dra. Limei Zhang y
al Dr. Andrés Castell

A mis amigos

A México

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ÍNDICE

1. Índice de abreviaturas	4
2. Resumen	5
3. Abstract	7
4. Introducción	9
4.1 Enfermedad de Parkinson	9
4.1.1 Histopatología de la EP	10
4.1.2 Tratamiento farmacológico de la EP	15
4.1.3 Modelo animal de la EP con 6-OHDA	18
4.2 Células Cromafines	20
4.3 Trasplantes en la EP	22
4.3.1 Trasplante de Sustancia Nigra fetal en modelo animal	23
4.3.2 Trasplante de Sustancia Nigra fetal en humanos	25
4.3.3 Trasplante de Células Cromafines en modelo animal	26
4.3.4 Trasplante de Células Cromafines en humanos	28
4.4 Toxicidad de la L-DOPA	29
4.5 Radicales libres y antioxidantes	31
5. Planteamiento del Problema	36
6. Hipótesis	37
7. Objetivos	38
8. Método	39
8.1 Experimentos <i>in vitro</i>	39
8.2 Experimentos <i>in vivo</i>	44
9. Resultados	48
9.1 Resultados <i>in vitro</i>	48
9.2 Resultados <i>in vivo</i>	56
10. Discusión	62
11. Conclusiones	69
12. Referencias	71

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

CC	Células Cromafines
DA	Dopamina
DAAA	Descarboxilasa de los aminoácidos aromáticos
EP	Enfermedad de Parkinson
FGF	Factor de Crecimiento Fibroblástico
GP	Globo Pálido
GPe	Globo Pálido externo
GPi	Globo Pálido interno
GSH	Glutación reducido
GSHpx	Glutación peroxidasa
GSSG	Glutación oxidado
HE	Hematoencefálica
L-DOPA	3,4-dihidroxifenilalanina
MAO	Monoamino Oxidasa
MPTP	1-metil-4-fenil-1, 2, 3, 6-tetrahidropiridina
NGF	Factor de Crecimiento Neural
SN	Sustancia Nigra
SNpc	Sustancia Nigra pars compacta
SNpr	Sustancia Nigra pars reticulata
SNC	Sistema Nervioso Central
SOD	Superóxido Dismutasa
TH	Tirosina Hidroxilasa
6-OHDA	6-hidroxi-dopamina

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESUMEN

La enfermedad de Parkinson (EP) es un padecimiento neurodegenerativo que se caracteriza por la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la *Sustancia Nigra pars compacta* y que afecta principalmente a la población mayor de 60 años. La L-DOPA, precursor de la dopamina, es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y ser metabolizada a dopamina en las terminales nerviosas de las neuronas nigroestriales que aún sobreviven. Su administración en los pacientes resulta satisfactoria al inicio, controlando los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, después de algunos años, su efectividad disminuye y aparecen otras complicaciones motoras propias del fármaco. El autotransplante de células cromafines al cerebro surgió en la década de los 80's como una alternativa terapéutica para la enfermedad. Después de llevarse a cabo alrededor del mundo por diversos grupos de investigadores, los resultados de esta estrategia en enfermos son diversos y en muchas ocasiones contradictorios. Es importante señalar que después de la cirugía, los pacientes con autotransplante de tejido suprarrenal continúan la administración del fármaco. Por otra parte, se ha demostrado que la L-DOPA es tóxica en diversos sistemas celulares en cultivo y en ciertas circunstancias *in vivo*; además, la toxicidad de L-DOPA se ha podido prevenir por el uso de antioxidantes.

El presente proyecto pretende contestar las siguientes preguntas: ¿Puede la L-DOPA, bajo ciertas condiciones clínicas, inducir toxicidad a las células cromafines de la médula suprarrenal en pacientes con el transplante?, ¿Puede ser lo anterior un factor que contribuye a las controversias de los resultados reportados?. Si estas respuestas son afirmativas, ¿Puede prevenirse por medio de ciertos antioxidantes?

El trabajo se dividió en dos partes: la primera es un estudio *in vitro* de células cromafines de la médula suprarrenal expuestas a concentraciones clínicas de L-DOPA. Se empleó tejido suprarrenal de ratas de tres días de edad, se cultivaron por diez días y los cultivos se dividieron en tres grupos: control, L-DOPA y L-DOPA con antioxidantes. En este modelo de toxicidad por estrés oxidativo, se estudiaron tres aspectos: la toxicidad de la L-DOPA, la caracterización de la muerte celular tanto necrótica como apoptótica y el estudio del efecto del fulereno C₆₀, molécula recientemente descubierta con propiedades antioxidantes, sobre la prevención del daño y la comparación con un agente antioxidante ampliamente estudiado, el ácido ascórbico.

La segunda parte consistió en indagar el posible efecto de la L-DOPA y del ácido ascórbico en transplante de tejido suprarrenal al sistema nervioso central. Para esto, se empleó el modelo animal de EP con la droga 6-OHDA para obtener ratas con lesión unilateral de la vía nigroestriatal. Después de la prueba de giro, los animales recibieron un transplante de médula suprarrenal de ratas recién nacidas. Inmediatamente después de la cirugía, se les comenzó la administración de los fármacos por diez días bajo el siguiente esquema: grupo control, grupo L-DOPA y grupo L-DOPA más ácido ascórbico.

Los resultados en ambos modelos indican que:

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Toxicidad de la L-DOPA en células cromafines

- La L-DOPA a dosis equivalentes a las clínicas induce la muerte de las células cromafines.
- La muerte celular fue tanto de tipo necrótico como apoptótico, además de que las células cromafines mostraron mayor vulnerabilidad al fármaco que otros tipos celulares.
- Los antioxidantes empleados, C₆₀ y ácido ascórbico fueron capaces de revertir el daño inducido por la L-DOPA.

El empleo de la L-DOPA podría contribuir a la degeneración del trasplante de células cromafines observada en numerosos estudios *post mortem*. Más aún, debido a la especificidad del daño sobre células catecolaminérgicas, la toxicidad de la L-DOPA debe tomarse en cuenta para futuros intentos de trasplante.

Finalmente, se discuten las virtudes y las limitaciones de los modelos empleados en este trabajo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder characterized by the loss of dopaminergic neurons from the *Sustancia Nigra pars compacta*, affecting mainly elder people. The dopamine precursor L-DOPA is able to go across the blood-brain barrier and be metabolized to dopamine in the cell terminal of the surviving nigrostriatal neurons. Its use in patients is satisfactory at the beginning, being able to control the disease's symptoms. However, after some years under treatment, its effectiveness diminishes and new motor problems appear in relation with the drug. The adrenal chromaffin cell autotransplant into the brain emerged since the 80's as a therapeutic alternative to Parkinson's disease. After it was carried out by many research groups around the world, the results in patients had been diverse and contradictory in many cases. It is important to say that after chromaffin cell grafting surgery, patients continued with the L-DOPA treatment. On the other hand, L-DOPA has been demonstrated to be toxic to different cell systems in culture and *in vivo* under certain circumstances. Furthermore, such toxicity could be prevented by using some antioxidants.

The present work is aimed to answer the following questions: Could L-DOPA, in certain clinic circumstances, induce toxicity to the adrenal chromaffin cells in post-grafted patients? Could this toxicity contribute the diversity of clinical results? If so, could it be prevented by some antioxidants?

This work is divided into two parts: the first one is an *in vitro* study where adrenal chromaffin cells were exposed to clinical doses of L-DOPA. Three-day-old rat adrenal tissue was cultured for ten days and cultures were divided into three groups: control, L-DOPA and L-DOPA with antioxidants. In this experimental model, three points were studied: L-DOPA toxicity, apoptotic and necrotic death characterization and the fullerene C₆₀ antioxidant prevention from L-DOPA damage, compared with ascorbic acid, highly used antioxidant.

The second part was aimed to study the effects of L-DOPA and ascorbic acid on adrenal chromaffin cell grafts into the central nervous system. The 6-OHDA lesion model for PD was used in order to obtain nigrostriatal unilateral lesion rats. After rotational behavior, lesion animals received an adrenal medullae graft from new born rats. Immediately after surgery, animals were treated with drugs for ten days under the next drug scheme: control group, L-DOPA group and L-DOPA plus ascorbic acid group.

The results from both models indicate that:

- L-DOPA, in clinical doses, induces chromaffin cell death.
- Both necrotic and apoptotic cell death was induced, and chromaffin cells shown more vulnerability to L-DOPA than other cell types.

- Both C₆₀ and ascorbic acid were able to diminish significantly L-DOPA damage.

The use of L-DOPA could contribute to the chromaffin cell transplant degeneration observed in several *post mortem* studies. Furthermore, due to specific damage of L-DOPA to catecholamine cells, L-DOPA toxicity and prevention measurements should be considered for future grafting approaches and clinical trials.

Finally, the virtues and limitations of the present work are discussed.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INTRODUCCIÓN

Enfermedad de Parkinson

En 1817 la enfermedad de Parkinson (EP) surge como una entidad clínica propia cuando el médico inglés James Parkinson la describe como un desorden del movimiento caracterizado principalmente por temblor y dificultad para iniciar movimientos voluntarios. Por estas características le llamó "parálisis agitante", y posteriormente el neurólogo francés Charcot la nombra como EP.

La EP es un padecimiento neurodegenerativo, progresivo e irreversible cuyo índice de prevalencia se incrementa proporcionalmente con la edad (Schoenberg, 1987). En personas de 40-50 años, el ratio de incidencia es aproximadamente de 1:10,000, pero en personas de 60-70 años el aumento es exponencial, de 1:1,000 habitantes. Como es de esperarse, la incidencia de la EP se incrementará en los próximos años debido a que la proporción de gente de avanzada edad aumentará considerablemente.

Clínicamente, la EP se caracteriza por 4 alteraciones del movimiento, en los cuales se basa su diagnóstico: a) temblor en reposo, con una frecuencia de 4-6 Hz, particularmente prominente en los músculos distales de las extremidades superiores, y que con el sueño desaparece (Struppler et. al, 1978); b) bradicinesia o lentitud para iniciar y/o ejecutar movimientos voluntarios, que se manifiesta como dificultad para caminar, ausencia de expresión facial y falta de alocución espontánea; c) rigidez muscular, debido a un

incremento del tono tanto de los músculos flexores como extensores; y d) inestabilidad de la postura.

Aunque las complicaciones motoras son las más evidentes e inhabilitantes, se presentan otras complicaciones de índole autónomo debido a la pérdida progresiva de ganglios simpáticos, como son hipotensión ortostática, sudoración, constipación y salivación excesivas. En estados muy avanzados, se presentan frecuentemente problemas cognitivos como disminución de la capacidad de atención, de abstracción (formación de conceptos), de la función lingüística, de la habilidad visioespacial e incluso demencia y depresión (Growdon et. al, 1990).

Histopatología de la EP

En 1919, Tretiakoff descubre, por estudios postmortem, que en cerebros de pacientes con EP existe una pérdida marcada de las células pigmentadas de la *Sustancia Nigra pars compacta* (SNpc). Estudios en la década de los 1950's en los que se logró medir la cantidad de dopamina (DA) intracerebral y observar que el núcleo caudado y el putamen eran las zonas de mayor abundancia de DA, Hornykiewicz y Ehringer demuestran que los cerebros de pacientes con EP tenían una marcada disminución de DA en estas regiones, e incluso en otras como el globo pálido y la sustancia nigra (Hornykiewicz, 1974). También se observaron concentraciones disminuidas de ácido homovainílico (HVA), metabolito de la DA y de las actividades de las enzimas sintetizadoras de la DA, la tirosina hidroxilasa (TH) y la descarboxilasa de los aminoácidos aromáticos (DAAA), así como el hecho de que existía una correlación directa entre la reducción de DA y la pérdida de células de la SNpc (Agid et. al, 1987).

Lo anterior ha llevado a identificar histopatológicamente a la EP como un padecimiento que se caracteriza principalmente por la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la SNpc. Una segunda característica de la EP, reportada inicialmente por el neurólogo alemán Frederick Lewi en 1913, es la presencia de inclusiones eosinófilas citoplasmáticas con un núcleo denso y un halo periférico en las neuronas dopaminérgicas restantes (Kopin, 1993). Estas inclusiones, ahora llamadas cuerpos de Lewi, son estructuras esféricas de 5 a 25 μm inmunorreactivas a neurofilamentos, tubulina, proteínas asociadas a microtúbulos y ubiquitina (Jellinger, 1990).

Además del sistema nigroestriatal se ha observado, aunque en menor grado, la pérdida de neuronas dopaminérgicas en otras regiones del sistema nervioso central (SNC), como en la neocorteza, en el hipotálamo (Agid et. al, 1987; Jellinger, 1990) y en retina (Nguyen-Legros et. al 1993). De manera similar, en la EP también existen alteraciones en otras poblaciones neuronales no dopaminérgicas, las cuales podrían explicar en parte algunos de los síntomas no relacionados con el movimiento. Así, estudios histopatológicos muestran que existe degeneración de células noradrenérgicas del *locus coeruleus* y del núcleo vagal dorsal, de neuronas serotoninérgicas del raquí dorsal y de neuronas colinérgicas del núcleo basal de Meynert y del núcleo pedúnculo pontino (Jellinger, 1990).

A pesar de esto último, las evidencias demuestran que la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la SNpc *per se* es responsable de las complicaciones motoras que se presentan en la enfermedad. Estas evidencias se pueden resumir en tres puntos: i) hay una

correlación entre el grado de degeneración de la SNpc y la severidad de los síntomas; ii) la destrucción o inhibición de la vía nigroestriatal en modelos animales y en humanos induce complicaciones del movimiento muy similares a las de la EP; iii) un incremento en la concentración de DA o la estimulación de receptores dopaminérgicos estriatales revierte los síntomas.

Lo anterior es como consecuencia de las relaciones anatómicas, fisiológicas y químicas de las estructuras corticales y subcorticales extrapiramidales involucradas en la planeación, control y ejecución del movimiento. A estas estructuras se les llama en su conjunto los núcleos basales (en la bibliografía, por motivos históricos, se nombran como ganglios basales) y comprenden el núcleo caudado, putamen (ambas conforman el neostriado o simplemente estriado), el núcleo subtalámico, el globo pálido -GP- (dividido en segmento interno -GPi- y segmento externo -GPe-) y la sustancia nigra (pars compacta -SNpc- y pars reticulata -SNpr-) (Mink, 1999).

A los núcleos de la base se les puede considerar como un asa lateral moduladora del flujo de información que viaja de la corteza cerebral hacia las neuronas motoras de la médula espinal. El estriado recibe aferencias de diferentes regiones de la corteza cerebral a través de la vía corticoestriatal glutamatérgica. Desde el estriado parten dos vías: una llamada directa en donde neuronas inhibitorias llegan al GPi y a la SNpr y otra indirecta en la cual células GABAérgicas están en contacto con neuronas del GPe; éstas a su vez envían prolongaciones inhibitorias al núcleo subtalámico y de aquí, a través de una vía excitatoria, el impulso nervioso llega al GPi y SNpr, donde converge con la de la vía directa. Estos dos núcleos forman conexiones sinápticas inhibitorias con los núcleos dorsoventral y

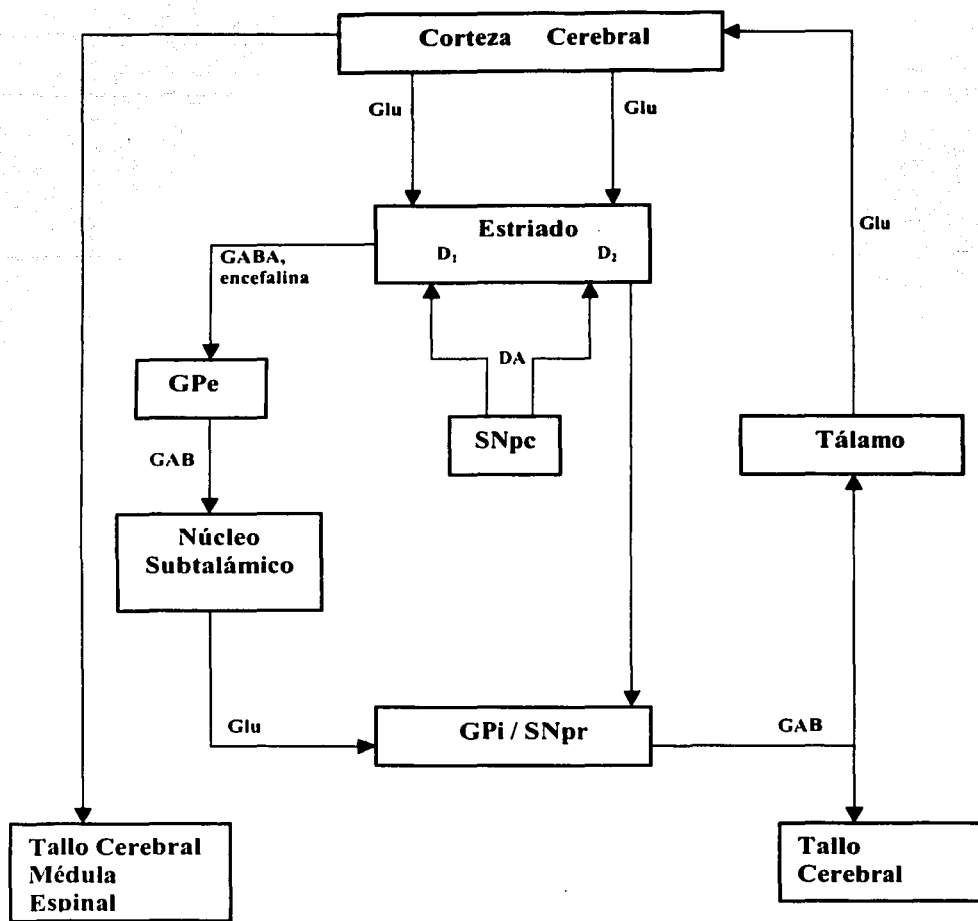


Fig. 1. Diagrama de los núcleos basales con sus neurotransmisores. Glu = glutamato, GABA = ácido γ -aminobutírico, DA = dopamina.

dorsolateral del tálamo; finalmente, la información regresa a la corteza por una vía excitatoria. De esta manera, el efecto neto de la estimulación de la vía directa es un incremento de la emisión de impulsos excitatorios a la corteza cerebral, mientras que el efecto por la estimulación de la vía indirecta es la reducción de estímulos en la corteza.

Dentro de este contexto, las neuronas dopaminérgicas de la SNpc juegan un papel primordial sobre la modulación del flujo de señales motoras. El punto clave reside en el efecto de la DA sobre cada una de las vías. Las células estriatales de la vía directa expresan principalmente receptores dopaminérgicos D_1 , por lo que la señal de la DA es excitatoria sobre estas células; por el contrario, la DA ejerce un efecto inhibitorio sobre las neuronas estriatales de la vía indirecta, puesto que estas últimas expresan receptores dopaminérgicos D_2 . Por consiguiente, la estimulación de la SNpc incrementa la actividad de la vía directa y disminuye la de la vía indirecta. La pérdida de estas neuronas durante la EP hace que ocurra exactamente el efecto opuesto, lo cual significa que el efecto neto es una reducción de la actividad talámica y de la corteza motora (fig. 1).

La causa primaria que desencadena la degeneración neuronal en la EP continúa siendo desconocida, sin embargo, se han realizado importantes avances al respecto que plantean como posible hipótesis al daño celular causado por radicales libres que pueden ser altamente tóxicos al rebasar los mecanismos celulares de defensa para ciertos tipos de células (Burke, 1999).

El cerebro es uno de los órganos más vulnerables al ataque de estas moléculas, ya que sus mecanismos antioxidantes son, comparados con otros tejidos, deficientes: casi no contiene catalasa (enzima que reduce el H_2O_2 a H_2O) y sus niveles de glutatión reducido (GSH), glutatión peroxidasa (GSHpx) y vitamina E son relativamente bajos. Además, en la SN existen altas concentraciones de hierro, el cual al reaccionar con H_2O_2 da lugar a la formación de radicales hidroxilo (Olanov, 1993a).

Tratamiento farmacológico para la EP

Las bases de la terapia moderna para la EP se dieron a finales de los 50's cuando se demuestra que: 1) las concentraciones de DA más elevadas en el cerebro se encuentran en el estriado (70%), por lo que Carlsson propone (Carlsson et. al, 1958) que la DA podría estar involucrada en el control del movimiento; 2) el precursor de la DA, la 3,4-dihidroxi-fenilalanina revierte las complicaciones motoras producidas por el tratamiento con reserpina —sustancia que provoca que se agoten las monoaminas intracerebrales, causando una inhibición intensa de la motilidad conocida como catalepsia— (Bertler et. al, 1959); 3) pacientes con EP idiopática tienen concentraciones disminuidas de DA estriatales (Homykiewicz, 1966). Aunque los primeros intentos farmacológicos comenzaron con la administración directa de DA, pronto se descubrió que no atravesaba la barrera hematoencefálica (HE).

Posteriormente comenzó la terapia con el precursor de DA en su forma levógiro, la L-3,4-dihidroxi-fenilalanina (levodopa o L-DOPA), la cual es absorbida en el duodeno y en el tercio proximal del yeyunoíleon por un sistema de transporte activo de aminoácidos aromáticos. La L-DOPA es capaz de atravesar la barrera HE, ingresar a las neuronas dopaminérgicas de la SNpc sobrevivientes y ser metabolizada a DA (Barbeau, 1961). En los inicios de la terapia con L-DOPA, se requerían dosis altas del fármaco, pues únicamente el 1% de la L-DOPA ingerida ingresa al cerebro; el resto se metaboliza como DA, ácido homovanílico o ácido dihidroxi-fenilacético. Además, dosis elevadas de DA tiene efectos periféricos como hipotensión postural, náuseas y vómito. Estas desventajas del tratamiento fueron evitadas al administrar la L-DOPA con carbidopa, un inhibidor de la descarboxilasa de los aminoácidos aromáticos, DAAA (Cotzias, 1967, 1968), enzima que metaboliza la L-

DOPA en DA en la periferia, pero que no llega al SNC (Papavasiliou, 1972; Pletscher, 1973). Desde entonces hasta la fecha, ésta es la estrategia terapéutica más eficaz y frecuente para controlar las complicaciones motoras de la enfermedad.

Es importante señalar que al tiempo en que comienzan los primeros síntomas, y por lo tanto, el inicio de la administración de L-DOPA, aproximadamente el 75-85% de las células DAérgicas de la SNpc han desaparecido. En etapas tempranas de la enfermedad, la L-DOPA controla casi por completo el temblor, la discinesia y la rigidez, y la duración de su efecto llega a exceder la vida media del fármaco en el plasma, lo cual indica que las células aún vivas de la SNpc poseen la capacidad para almacenar parte de la DA recién formada.

El tratamiento con L-DOPA logra disminuir la sobreexpresión de receptores D_2 en el estriado que presentan los pacientes no tratados.

Sin embargo, después del uso prolongado del fármaco, durante 5 a 8 años, comienzan a aparecer problemas relacionados con fluctuaciones de la respuesta motora del enfermo. Al inicio, aparece el fenómeno de desgaste en el cual las dosis de L-DOPA mejoran la movilidad por un tiempo, pero, principalmente la rigidez y la bradicinesia regresan al final del intervalo entre las dosis. Este fenómeno se debe a que la muerte de las neuronas dopaminérgicas continúa y por ende, disminuye la capacidad de almacenamiento del neurotransmisor. El fenómeno de desgaste puede controlarse al aumentar las dosis y/o la frecuencia de administración; no obstante, el incremento de las concentraciones del

fármaco en el cerebro trae otras consecuencias, como la aparición de discinesias y, en casos avanzados, confusión, alucinaciones o psicosis.

Otras alteraciones que surgen con el tratamiento prolongado son los estados de prendido-apagado en los que periodos repentinos de temblor y rigidez se alternan con periodos de movilidad en un patrón no predecible y que no se relaciona con las dosis del fármaco. Se piensa que este fenómeno se debe a cambios en la farmacocinética de la droga, a la sensibilización de los receptores y al progreso de la enfermedad. Se ha demostrado que la L-DOPA exógena puede ser descarboxilada a DA en las células serotoninérgicas (Arai et. al, 1994). Esto causa que la DA formada libere serotonina por desplazamiento en las vesículas sinápticas (Ng et. al, 1970). Incluso la DA así sintetizada también puede ser liberada, bajo condiciones en las cuales no hay un control fisiológico normal. Asimismo, la exposición de receptores DAérgicos a variaciones extremas en las concentraciones de DA puede causar otras anomalías en la expresión de tales receptores y en ciertas señales de transducción (Chase et. al, 1990).

Los efectos colaterales del tratamiento con L-DOPA pueden llegar a ser igual o más inhabilitantes que los propios síntomas de la enfermedad por lo que se han desarrollado otras estrategias farmacológicas en las últimas décadas. Entre ellas, se ha utilizado la inhibición de la enzima que degrada a la DA, la monoamina oxidasa (MAO), que aumenta las concentraciones de DA en el espacio sináptico y con ello sus efectos en la neurotransmisión. La selegilina es un inhibidor irreversible específico de la MAO-B - tipo de la enzima que se encuentra en SNC - (Olanow, 1993b), y combinada con la L-DOPA mejora los síntomas de la EP y reduce los efectos del fenómeno de encendido-apagado. El

uso de la amantidina, la cual estimula la liberación de catecolaminas de las vesículas presinápticas, coadyuva en el tratamiento con L-DOPA; sin embargo, la confusión, agitación y alucinaciones son parte de sus efectos colaterales. Otro tratamiento consiste en la administración de agonistas DAérgicos; la bromocriptina y la pergolida son los más empleados, reduciendo el temblor, la rigidez y la bradicinesia. Sus efectos benéficos son menores que los de la L-DOPA y su administración se limita hasta el momento en que aparecen efectos negativos (nausea, hipotensión ortostática, problemas de visión y psiquiátricos). Además, estas drogas (al igual que otros derivados del centeno), pueden inducir la aparición de fibrosis pulmonar y retroperitoneal, eritromialgia y vasospasmo digital.

En resumen, con estos tratamientos farmacológicos se han observado mejorías muy limitadas y moderadas, por lo que su uso terapéutico más bien se ha limitado a la coadministración con L-DOPA.

La limitación de los tratamientos farmacológicos, la ausencia de otros métodos eficaces en la clínica y el continuo progreso de la enfermedad, llevaron a la realización de los primeros trasplantes en pacientes con EP avanzada, con dos modalidades: trasplante de neuronas dopaminérgicas de mesencéfalo (el área que da lugar a la SN fetal) y el autotrasplante de células cromafines de la médula suprarrenal.

Modelo animal de la EP con 6-hidroxidopamina (6-OHDA)

Las alteraciones bioquímicas inducidas por esta toxina son muy similares a las de la propia EP. La inyección unilateral de 6-OHDA sobre el estriado o la SNpc de ratas lleva a

la muerte masiva de células dopaminérgicas del mismo lado y la consecuente disminución de DA en el estriado (Gerlach et. al, 1996). El mecanismo por el cual la 6-OHDA destruye selectivamente a las células catecolaminérgicas del cerebro es por la inducción de estrés oxidativo: la 6-OHDA es capturada por el sistema de transporte catecolaminérgico de alta afinidad; en el interior de la neurona, la 6-OHDA produce gran cantidad de moléculas altamente reactivas, ya que genera H_2O_2 y radicales superóxido (O_2^-) e hidroxilo (HO). Al mismo tiempo, induciendo la liberación de hierro de la ferritina, aumenta la concentración de este metal en el estriado, favoreciendo aún más la formación de radicales libres por la reacción de Fenton. También se ha observado que la 6-OHDA reduce los niveles de GSH y provoca una disminución en la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) (Gerlach et. al, 1996). Además, la 6-OHDA inhibe la actividad del complejo I mitocondrial, produciendo más O_2^- (Sian et. al, 1999).

Cuando se induce la destrucción unilateral masiva de células dopaminérgicas de la SNpc, los animales exhiben una serie de conductas motoras anormales: la cabeza y cola se ladean ipsilateral a la lesión y las extremidades contralaterales se extienden (Ungerstedt, 1971). Además, los animales no muestran una orientación a estímulos visuales, auditivos, olfatorios o táctiles contralaterales a la lesión (Dunnett et. al, 1981; Marshall, 1979). Con la administración sistémica de L-DOPA, agonistas dopaminérgicos (como apomorfina) o moléculas liberadoras de DA (por ejemplo, anfetamina), aparece en estos animales una asimetría diferente a lo largo del eje longitudinal del cuerpo llamada conducta de giro. El número de giros en un tiempo determinado indica el grado de lesión (unilateral) en el sistema nigroestriatal del animal (Schmidt et. al, 1982).

Células Cromafines

La glándula suprarrenal se divide en una región externa de color pardo amarillenta que representa el 90% del volumen total llamada corteza, y una región interna, la médula, de color pardo rojizo. Embriológica y funcionalmente, la corteza y la médula representan dos órganos diferentes (Ganong, 2002). La médula suprarrenal está conformada por cordones celulares separados por capilares y vénulas y se encuentra inervada por fibras de los nervios espláncnicos formando estructuras sinápticas típicas con las células cromafines. Como en todas las sinapsis del sistema nervioso autónomo, éstas son de tipo colinérgico. Histológicamente, la médula suprarrenal se compone de dos tipos celulares distintos: células noradrenérgicas (gránulos con núcleo electrodenso) y células adrenérgicas (gránulos con núcleo difuso). Las catecolaminas, almacenadas en los gránulos citoplasmáticos, se oxidan por sales de cromo, dando un color rojizo, por lo que se les nombró células cromafines (Ganong, 2002).

Las células cromafines de la médula suprarrenal provienen del linaje simpatoadrenal de la región dorsal del tubo neural durante el desarrollo embrionario (Black, 1992; Unsicker, 1993). La migración de las células de este linaje se inicia ventralmente del ápice del tubo neural a la aorta dorsal. Estas células se agregan y diferencian en una cadena primaria simpática en la que hay células que expresan marcadores neurales (por ejemplo, neurofilamentos) como las neuronas simpáticas, y otras que no expresan tales marcadores como las CC. Señales del microambiente recibidas durante la migración y consolidación del órgano determinan si el precursor llegará a ser una neurona simpática o una CC (Chalmers, 1995). De este modo, la exposición a ciertos factores tróficos como son el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) y el factor de crecimiento neural (NGF) durante el

desarrollo inducen la diferenciación hacia neuronas simpáticas, mientras que la presencia de altos niveles de glucocorticoides en la glándula suprarrenal inhibe la diferenciación neural e induce a un fenotipo cromafín (Chalmers, 1995; Zhang et. al, 1997). Cuando las células cromafines se encuentran rodeadas de células de la corteza suprarrenal, son células redondas y liberan grandes cantidades de adrenalina, pero cuando son extraídas de la glándula y colocadas en cultivo, cambian morfológica y bioquímicamente, y pueden liberar importantes cantidades de DA en presencia de células blanco —neuronas estriatales— (Zhang et. al, 2000).

Las células cromafines in vitro, aún aquellas de animales adultos, pueden adoptar características de fenotipo neural, como es el crecimiento de prolongaciones neuríticas, elongación del cuerpo celular y, cambios en la morfología de las vesículas de almacenamiento (Doupe et. al, 1985; Notter et. al, 1986; Tischler et. al, 1980; Unsicker et. al, 1985), alteraciones que pueden potenciarse con la exposición a NGF (Stromberg et. al, 1988; Unsicker et. al, 1978).

Las células cromafines son excitables eléctricamente, sintetizan y liberan neurotransmisores y se encuentran inervadas por fibras simpáticas preganglionares, a diferencia de otras glándulas puramente endocrinas las cuales son inervadas por fibras posganglionares. Desde este punto de vista, la médula suprarrenal se puede considerar como un ganglio simpático.

Las células cromafines poseen todos los sustratos necesarios para la síntesis y liberación de catecolaminas, incluyendo DA, por lo cual estas células son candidatos calificados para el tratamiento quirúrgico de la EP.

En un reporte de cocultivo celular, se ha observado que en la presencia de neuronas estriatales, la modulación morfológica y funcional hacia un tipo neural de las CC se incrementa y se establecen contactos sinápticos con las neuronas estriatales; el crecimiento neurítico es direccional y la formación de contactos sinápticos es seleccionada espacialmente. Además, la liberación de DA se triplica igualando la concentración de noradrenalina (Zhang et. al, 2000).

Transplantes en la EP

Hace más de un siglo se empezaron a llevar a cabo transplantes con el propósito de estudiar el desarrollo, función y plasticidad del cerebro, y con la esperanza de reestablecer su función en aquellos tejidos envejecidos o con algún daño. Así, Thomson en 1890 y Saltykow en 1905, fueron los primeros en realizar transplantes de tejido nervioso, y Del Conte en 1907, en transplantar tejido embrionario en cerebro de mamífero. Aunque los primeros resultados fueron muy pobres (muy baja sobrevida del transplante), pronto vinieron resultados más alentadores: en 1917, Dunn consiguió transplantar tejido de corteza inmadura a corteza madura e incluso observó conexiones entre el transplante y el tejido huésped. En 1923, Murphy y Sturn propusieron que el cerebro es un sitio privilegiado al no encontrar rechazo por parte del cerebro huésped y Medawar (en 1948) postuló que el cerebro es un sitio inmunológicamente privilegiado en este sentido (Björklund et. al, 1976).

A pesar de los esfuerzos anteriores, no es sino hasta la década de los 70's cuando se logran con éxito trasplantes de tejido neuronal al cerebro de mamífero. Con la ayuda de nuevas técnicas histoquímicas y auto-radiográficas, se observa que el tejido del sistema nervioso central en desarrollo es capaz de sobrevivir, extender axones y establecer conexiones aferentes y eferentes en cerebros embrionarios y maduros, en áreas donde se había inducido experimentalmente una lesión (Lund et. al, 1976; Björklund et. al, 1984). Gracias a esto, se piensa en el trasplante como posible alternativa para enfermedades neurodegenerativas.

Para fines experimentales, en los primates y roedores, la pérdida específica de la vía nigroestriatal puede inducirse con las neurotoxinas 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y 1-metil-4-fenil-1, 2, 3, 6-tetrahidropiridina (MPTP) . Debido a que estas lesiones se pueden evidenciar por un comportamiento motor alterado y que se conocen con cierto detalle las relaciones anatomofuncionales de los ganglios basales, el modelo animal de la EP ofrece grandes posibilidades de experimentación y ha permitido obtener gran parte de nuestro conocimiento actual en el campo de los trasplantes y de las neurociencias.

Trasplante de Sustancia Nigra (SN) fetal en modelo animal

El trasplante ectópico de SN fetal sobrevive cuando es colocado cerca o en el estriado denervado y muestra integración y reconstrucción anatómica. La corteza inerva el tejido transplantado y éste a su vez a las neuronas espinosas típicas del estriado, específicamente en su región dorsomedial (Freed et. al, 1981). Estudios *in vivo* demuestran que las células transplantadas tienen actividad espontánea, y en las zonas donde llegan sus axones, la síntesis y liberación de DA llegan a niveles cercanos a los normales (sin lesión).

Es más, se ha observado que más del 50% de las neuronas transplantadas responden a estimulación del estriado o de la corteza (Fisher et. al, 1991). La función también se recupera en gran medida: la conducta de giro disminuye e incluso llega a desaparecer (Coyle et. al, 1976), así como la respuesta alterada a estímulos externos que el animal sufre al lesionar la vía nigroestriatal. Esta recuperación anatómica y funcional persiste a largo plazo, alcanzando incluso hasta año y medio (Freed, 1983) y es altamente específica en dos aspectos fundamentales: 1) otras regiones cerebrales no ofrecen tal mejoría y 2) la recuperación depende en gran medida de la interacción específica con las células del cuerpo estriado. No obstante, la integración de las células fetales no es completa: sus axones no se extienden a más de pocos milímetros (Doucet et. al, 1989), establecen conexiones anatómicas inusuales y funcionalmente persisten algunos movimientos incoordinados de las extremidades anteriores (Dunnett et. al, 1987).

Aunque la habilidad de la SN embrionaria de establecer contactos sinápticos recíprocos con el tejido huésped es mayor durante el desarrollo fetal del animal que recibe el trasplante y disminuye en tiempos postnatales, en el cerebro huésped adulto se pueden formar conexiones funcionales y, algo muy significativo clínicamente, esta capacidad es mucho mayor cuando el cerebro ha sido lesionado. Ésta y otras evidencias han sugerido que los mecanismos de diferenciación e integración neuronal que se llevan a cabo durante el desarrollo pueden ser reactivados por lesiones o procesos degenerativos (Sotelo et. al, 1991; Snyder et. al, 1997).

Transplante de SN fetal en humanos

Desde el primer transplante humano de SN fetal por Backlund y colegas en 1982 (Backlund et. al, 1985), docenas de pacientes con EP se han sometido a tal intervención brindando información altamente valiosa. Los resultados muestran un incremento en la recaptura de (18 F)-DOPA en la región del transplante (lo que demuestra su viabilidad), una mejoría moderada (Olanow et. al, 1996) en los síntomas motores de la enfermedad junto con una disminución (pero no eliminación) de las dosis de L-DOPA. Con base en estudios postmortem, se observa una alta sobrevivencia de las células transplantadas con una extensa inervación del estriado (Lang, 2000). Incluso hay un reporte de un paciente en el que la función del transplante persiste después de diez años (Puccini et. al, 1999).

El beneficio del transplante se ha logrado en pacientes de hasta 60 años de edad, pero no en mayores. El resultado depende en gran medida de una serie de factores que incluyen entre otros el o los sitios donde se coloca el transplante, de la cantidad de tejido transplantado, la edad tanto del donante como del huésped y del tiempo transcurrido desde la obtención de las células fetales hasta su colocación al cerebro huésped.

A pesar del éxito relativo del transplante de células de SN embrionaria, su empleo trae principalmente tres consecuencias negativas: 1) la dificultad de su obtención (se requieren de seis a ocho fetos para inervar favorablemente el estriado de un paciente), 2) problemas éticos por ser obtenidos a partir de abortos, y 3) posibles rechazos inmunológicos. Es por esto que el empleo de esta técnica dejó de ser vista como alternativa para aliviar los síntomas de la enfermedad.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Transplante de Células Cromafines en modelo animal

Por las desventajas del uso de SN fetal y porque al inicio de los estudios con transplante neuronal en animales se pensaba que únicamente bastaba incrementar las cantidades de DA en el estriado para revertir los efectos de las lesiones, se comenzó a investigar el uso de CC de la médula suprarrenal. Lo anterior se reforzó por el hecho de que la concentración de DA en la médula suprarrenal rebasa los niveles de cualquier parte del cerebro (Molinof et. al, 1971).

En los primeros trabajos clásicos, se transplantaron CC a la cámara anterior del ojo, observando que la producción de noradrenalina disminuía considerablemente -coincidiendo con experimentos *in vitro*- (Unsicker et. al, 1981; Olson, 1970) y, además del cambio morfológico a tipo neuronal, las células podían inervar injertos intraoculares de corteza cerebral (Olson et. al, 1980). Asimismo, en cultivo, el proceso de transformación se maximizaba cuando se le añadía al medio NGF (Unsicker et. al, 1978). Gracias a estas características, se comenzaron a transplantar CC en los modelos animales de Parkinson, con la expectativa de que se integrasen al sistema nervioso central y funcionasen como bombas biológicas de DA.

Los resultados generales a partir de gran cantidad de experimentos se pueden resumir de la siguiente manera: las CC de animales jóvenes transplantadas intraventricularmente muestran una notoria reducción (~40%) en la conducta de giro. Se encuentran altas concentraciones de DA dentro del transplante y en el estriado, que disminuyen gradualmente en la periferia (Becker et. al, 1988) e incluso en algunos casos la

cantidad de DA es dos veces más que la del estriado no lesionado (Freed, 1983). Además, la inmunorreactividad a la tirosina hidroxilasa (enzima que convierte la L-DOPA a DA) se incrementa y la de la enzima feniletanolamina-N-metiltransferasa -PMNT- (transforma la noradrenalina en adrenalina) disminuye (Hansen et. al, 1994), lo cual corrobora la diferenciación y plasticidad de las CC. En cuanto a la morfología, ésta muy variada, desde aquellas que poseen forma redondeada (típica de CC dentro de la médula suprarrenal) hasta algunas con forma alargada y procesos neuríticos.

Sin embargo, los procesos neuríticos que proyectan se encuentran principalmente dentro del propio tejido transplantado y raramente penetran al estriado. De igual manera, la densidad de CC vivas después de un tiempo disminuye notoriamente, comparado con el número total de células transplantadas. El hecho de que no se formen conexiones sinápticas entre las CC y el estriado no es requisito para aminorar de manera importante las disfunciones motoras: la sola liberación de DA bien puede tener un efecto satisfactorio. Esta posibilidad se apoya en el hecho de que las CC colocadas contralateralmente a la lesión reducen la conducta de giro (Drucker-Colín, 1989).

No obstante, algunos investigadores han sugerido que la mejoría motora observada a pesar de la baja tasa de células viables podría deberse a que el trasplante induce la síntesis de factores neurotróficos y/o neuroprotectores que promuevan la regeneración de células dopaminérgicas propias del huésped (Becker et. al, 1990). Sin embargo la mejoría no es la misma cuando en lugar de CC se transplanta algún otro tejido, lo cual puede sugerir que todos estos factores intervienen activamente.

Transplante de Células Cromafines en humanos

El primer intento con CC para el tratamiento de la EP fue un autotransplante de médula suprarrenal colocado dentro del parénquima del núcleo caudado llevado a cabo con dos pacientes en Suecia en 1985 (Backlund et. al, 1985). Se obtuvieron resultados positivos sólo durante pocos días después de la operación. Consecuentemente, otros dos pacientes fueron operados, pero esta vez, el tejido suprarrenal fue colocado dentro del parénquima del putamen. Los resultados satisfactorios duraron sólo dos meses (Backlund et. al, 1985). Sin embargo, el estudio que creó mayor interés fue el de Madrazo et. al, quienes reportaron evidente progreso en dos pacientes con autotransplante de 6 – 7 pequeños fragmentos de médula suprarrenal en una cavidad del núcleo caudado en contacto con el líquido cefalorraquídeo del ventrículo lateral (Madrazo et. al, 1987). Al cabo de unos años, más de cuarenta pacientes fueron tratados de manera similar por el mismo grupo. El 60% mostró respuesta satisfactoria, 20% mejoría moderada y en el restante 20% la respuesta fue nula. El mejoramiento se observó principalmente sobre la rigidez, bradicinesia e inestabilidad de la postura. Además, se requirió menos de la mitad de la dosis diaria de L-DOPA que la administrada antes de ser operados (Madrazo et. al, 1990).

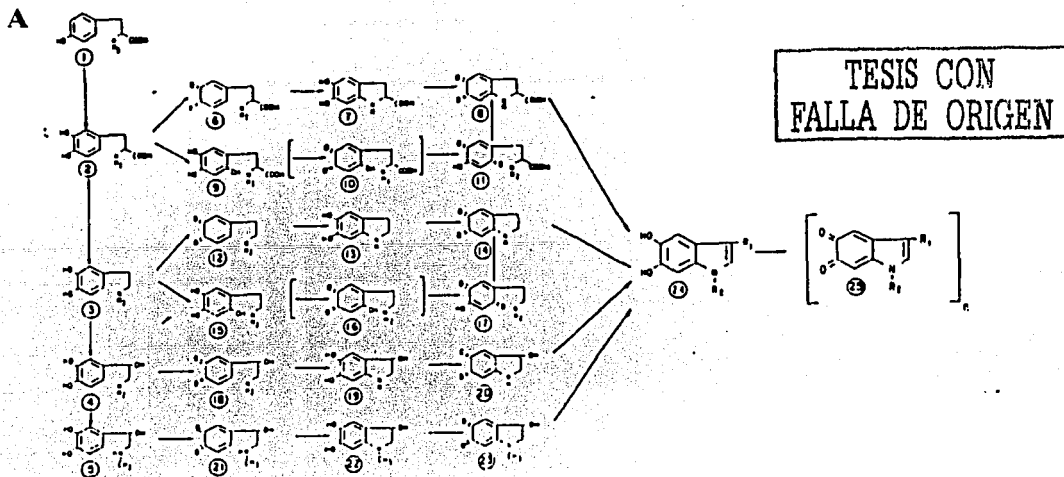
A partir de estos estudios, cientos de pacientes alrededor del mundo recibieron autotransplantes de médula suprarrenal de la misma manera y los resultados crearon gran controversia con los publicados anteriormente. En general, el transplante no produjo mejoría alguna en la mayoría de ellos (60%) y únicamente algunos individuos, los más jóvenes que todavía respondían a la terapia farmacológica, tuvieron una ligera recuperación, pero en ningún caso se observaron resultados similares a los de Madrazo et. al. (1990). En las autopsias de algunos de estos sujetos, se evidenció muy baja sobrevida de

las células transplantadas (Jankovic et. al, 1989), aunque es de notar que la mayoría de estas autopsias fueron de pacientes sin respuesta por el trasplante. Sin embargo, un estudio demostró después de algunos meses de la cirugía alta viabilidad de CC y la concentración de receptores dopaminérgicos estriatales ipsilateralmente al trasplante fue menor que en el estriado contralateral, lo que sugiere que las células transplantadas indujeron una disminución en la sobreexpresión de los receptores dopaminérgicos, consecuencia del incremento en la concentración de DA (Hurtig et. al, 1989).

Toxicidad de la L-DOPA

Existen dos mecanismos principales por los cuales la L-DOPA puede llegar a ser tóxica (fig. 2). El primero radica en que a través de su autooxidación se forman quinonas, semiquinonas y radicales libres $\text{—O}_2\cdot$ y HO— (Graham et. al, 1978a, 1978b). El segundo mecanismo consiste en que, dentro de las células, también existe producción de radicales libres debido a que estos se forman por el metabolismo enzimático de la DA por medio de la MAO-B (Jenner, 1998).

La muerte celular por toxicidad puede ser de dos tipos: necrótica o apoptótica (fig. 3). La toxicidad de la L-DOPA *in vitro* ha sido demostrada en gran cantidad de estudios en los que se observa que induce degeneración celular y muerte apoptótica en células PC12 (Walkinshaw et. al, 1995), en neuronas simpáticas de pollo (Ziv et. al, 1994), daño a las membranas celulares y al ADN (Spencer et. al, 1994). Además este daño puede ser prevenido por diversos antioxidantes (Offen et. al, 1996, Pardo et. al 1995, Mena et. al, 1993), confirmando que la toxicidad de la L-DOPA es por la inducción de estrés oxidativo.



Las vías oxidativas de las catecolaminas: 1. tirosina; 2. dopa; 3. dopamina; 4. noradrenalina; 5. adrenalina; 6. dopaquinona (radical libre, RL); 7. leuкодopacromo; 8. dopacromo; 9. lopa; 10. o-quinona (RL); 11. p-quinona (RL); 12. dopamina - o-quinona (RL); 13. leucoaminocromo; 14. aminocromo (RL); 15. 6-hidroxi-dopamina; 16. o-quinona - 6 - hidroxidopamina (RL); 17. p-quinona - 6 - hidroxidopamina (RL); 18. o-quinona - noradrenalina (RL); 19. leuconoradrenocromo; 20. noradrenocromo; 21. o-quinona - adrenalina (RL); 22. leucoadrenocromo; 23. adrenocromo; 24. dihidroxi-indol; 25. indol-quinona (RL) (Graham et al., 1978)

B)

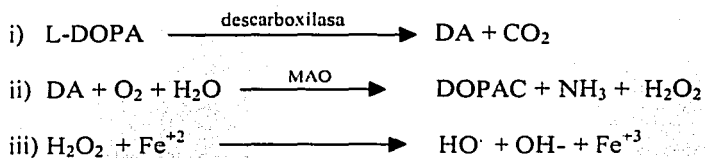


Fig 2. Formación de radicales libres producidos por la L-DOPA. A) por la autooxidación de las catecolaminas se forman quinonas, semiquinonas y O_2^\cdot y HO^\cdot . B) Por la degradación enzimática de la DA también se pueden producir radicales libres a través de la reacción de Fenton (iii).

A pesar de que está bien comprobado que la levodopa induce apoptosis y necrosis a muy altas concentraciones (Lai et. al, 1997; Spencer et. al, 1994; Walkinshaw et. al 1995), existe controversia sobre si el fármaco puede acelerar la degeneración neuronal en los pacientes bajo su tratamiento. Diversos investigadores afirman que no existen evidencias

convincientes que demuestren *in vivo* que el tratamiento con L-DOPA acelere el daño en la SN, sea en animales o en humanos (Melaned et. al 1998). Sin embargo, se ha observado que la administración de L-DOPA a ratones sanos provoca un aumento en los niveles de glutatión oxidado (GSSG), lo que demuestra *in vivo* un estado de estrés oxidativo, así como también la disminución de la actividad del complejo I mitocondrial y una degeneración de terminales dopaminérgicas (Jenner, 1998).

	NECROSIS	APOPTOSIS
Estímulos	Hipoxia, toxinas	Fisiológica y patológica
Histología	Hinchazón celular Necrosis por coagulación Rotura de los orgánulos	Células aisladas Condensación de la cromatina Cuerpos apoptóticos
Mecanismos de descomposición del ADN	Al azar, depleción difusa de ATP Lesión de la membrana Lesión por radicales libres	Internucleosomal Activación genética Endonucleasa
Reacción tisular	Infamación	No infamación Fagocitosis de cuerpos apoptóticos

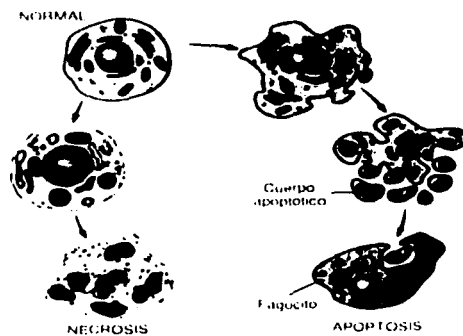


Fig. 3. Características y diferencias entre la muerte celular por necrosis y por apoptosis.

Radicales Libres v Sistemas Antioxidantes

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Un compuesto estable, como la mayoría de las moléculas biológicas, posee electrones con *spines* apareados, es decir, en direcciones opuestas. Sin embargo, los radicales libres son especies químicas que contienen uno o más electrones desapareados en sus órbitas externas. Debido a la tendencia natural al apareamiento electrónico, la presencia de uno o más de estos electrones desapareados induce a un radical a reaccionar rápida y desordenadamente con otra molécula al donar o tomar un electrón. Por lo tanto, un radical es una molécula altamente reactiva y de vida media muy corta, lo cual puede llevar a un

proceso de reacción en cadena (un radical genera otro y así sucesivamente). Los radicales libres son producidos en la célula constantemente bajo condiciones normales como consecuencia del metabolismo aeróbico (Curtin et. al, 2002). Sin embargo, en ciertas condiciones, la formación de radicales libres puede llevar a un estado de estrés oxidativo, es decir, a un desequilibrio entre moléculas oxidantes y sistemas antioxidantes, donde la producción de los primeros rebasa las capacidades de los segundos (Picardo, 1997).

Las especies reactivas de oxígeno que más frecuentemente se producen en la célula son los radicales O_2^- , HO^\cdot y óxido nítrico (NO^\cdot). Otras moléculas, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el peroxinitrato ($ONOO^\cdot$) no son radicales libres pero pueden llevar a la generación de éstos por medio de reacciones químicas (Ciccone et. al, 1998). En los sistemas biológicos, los radicales libres reaccionan con diferentes componentes celulares y extracelulares, como son lípidos insaturados, proteínas, ácidos nucleicos, azúcares y diversos metabolitos intermedios. Las consecuencias de estas reacciones pueden llevar a la citotoxicidad y dar como resultado mutaciones, aberraciones cromosómicas, carcinogénesis, degeneración y muerte celular tanto necrótica como apoptótica (Cadet et. al, 1998). Incluso, se ha implicado al estrés oxidativo en la patogénesis de diversas enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Huntington, esclerosis amiotrófica lateral, enfermedad de Alzheimer, degeneración de retina y por supuesto, la EP (Curtin et. al, 2002).

Las células tienen sistemas biológicos coordinados para protegerse del potencial daño celular causado por la producción constante de radicales libres, con base en enzimas

(sistema primario) y en moléculas antioxidantes tanto de origen endógeno como exógeno (sistema secundario) (Picardo et al, 1997).

El sistema primario previene el daño oxidativo al metabolizar directamente las especies reactivas. La superóxido dismutasa (SOD) cataliza la dismutación del O_2^- para formar oxígeno y peróxido de hidrógeno ($2O_2^- \rightarrow O_2 + H_2O_2$) y representa la primera línea de defensa contra la toxicidad del oxígeno. Puesto que la SOD produce H_2O_2 , potencialmente tóxico, trabaja en coordinación con otras dos enzimas, la catalasa y la glutatión peroxidasa (GSHpx), que catalizan la oxidación de glutatión reducido (GSH) a glutatión oxidado convirtiendo el H_2O_2 en H_2O (Picardo et al, 1997).

El sistema secundario actúa transformando el radical libre en una molécula menos reactiva, generalmente interrumpiendo las reacciones en cadena de los radicales libres a través de moléculas con capacidad de donar un hidrógeno. Una de estas moléculas es el α -tocoferol (vitamina E), el cual puede eliminar del ambiente al O_2^- y al $HO\cdot$. El ácido ascórbico ha demostrado una buena capacidad antioxidante; en modelos de isquemia e hipoglucemia, el ácido ascórbico disminuye pronunciadamente la muerte celular.

Por otra parte, los fulerenos (C_{60} , 70, 80, 90...200) o nanoesferas puras de carbón han atraído fuertemente la atención desde su descubrimiento en 1985 por sus propiedades biológicas. Los carboxifulerenos, C_{60} , son las moléculas más pequeñas de esta clase con un diámetro de 7Å con alta capacidad como atrapadores de radicales libres. Se ha reportado que una sola esfera de C_{60} es capaz de unirse con 34 radicales metilo (Krusic et. al, 1991). También, actúan como potentes atrapadores de radicales $HO\cdot$ (se requieren concentraciones

de C₆₀ 10-100 veces menores que otros antioxidantes) y de O₂^{·-}. Radicales de oxígeno y óxido nítrico se producen durante el proceso de excitotoxicidad por sobreestimulación de receptores glutamatérgicos (Garthwaite et. al, 1988; Dugan, 1995). En cultivo de neuronas corticales, el C₆₀ reduce en gran parte la muerte neuronal por excitotoxicidad (tanto por receptores NMDA como AMPA). Además, en estos mismos cultivos, es posible inducir una muerte celular apoptótica por medio del retiro de suero o por la exposición al péptido amiloide Aβ₁₋₄₂, en los cuales el daño se asocia a la producción intracelular especies reactivas de oxígeno. La aplicación de C₆₀ reduce significativamente la producción de radicales libres y, como consecuencia, el número de células apoptóticas. Incluso, en un modelo de esclerosis lateral amiotrófica, la infusión intraperitoneal continua de C₆₀ retarda tanto el comienzo de los síntomas como finalmente la muerte del animal (Dugan et. al, 1997).

En un modelo de isquemia-reperfusión a través de la inducción de un infarto focal transitorio de la corteza cerebral (en ratas), se producen concentraciones de radicales libres muy por encima de lo normal, por medio de diversos mecanismos, tales como por el metabolismo de los ácidos grasos libres por la vía de la ciclooxigenasa y por metabolismo de nucleótidos de adenina por la vía de la xantina oxidasa (Chan, 2001). Se ha demostrado en modelos experimentales que la infusión intraventricular de C₆₀ disminuye el daño neuronal por el infarto y previene tanto la peroxidación de lípidos como la disminución en la concentración de GSH inducidos por la isquemia y perfusión. Estos resultados muestran que los carboxifulerenos administrados de esta manera poseen propiedades antioxidantes (Lin, 2002). En cultivo de CC, se ha observado que el C₆₀ no modifica la

viabilidad celular a concentraciones semejantes a las empleadas en este trabajo (100 μM) (Zhang et. al, 1998).

Aunque el mecanismo de acción no se conoce por completo, se sugiere que por sus características químicas tanto hidrofóbicas como hidrofílicas, las moléculas de C_{60} se intercalan entre los lípidos de la membrana celular y reaccionan con los radicales libres formados por el estímulo tóxico, inhibiendo o rompiendo las reacciones en cadena de radicales libres, que de otra manera llevarían a la peroxidación lipídica y consecuentemente a la muerte de la célula (Dugan, 1997).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La realización de trasplantes de CC de médula suprarrenal como terapia para la EP ha sido un punto de discusión desde hace tiempo debido a los resultados clínicos controvertidos y contradictorios que reportan distintos grupos de investigadores en todo el mundo.

Como ya se mencionó con anterioridad, se ha observado por estudios inmunocitoquímicos, neuroquímicos y untraestructurales que las CC en cultivo con neuronas estriatales pueden establecer conexiones sinápticas y liberar grandes cantidades de DA. Por otro lado, en modelo animal, existe un aumento en la concentración de DA en el sitio del trasplante y la periferia cercana, además de que la conducta de giro disminuye significativamente.

Puesto que en los protocolos clínicos en estos pacientes se continúa la administración de L-DOPA a diferentes dosis después del trasplante, es de importancia conocer el efecto directo de la L-DOPA sobre las CC tanto *in vitro* como *in vivo*, aplicando un protocolo similar al clínico

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

HIPÓTESIS

- 1) La administración del fármaco L-DOPA a concentraciones clínicas posee efectos tóxicos sobre las células cromafines de la médula suprarrenal tanto en cultivo como transplantadas al cerebro en un modelo animal de EP.

- 2) La aplicación conjunta de los agentes antioxidantes C_{60} o ácido ascórbico disminuye el daño causado por la L-DOPA en las células cromafines tanto en cultivo como transplantadas al cerebro en un modelo animal de EP.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

OBJETIVOS

1. Determinar los efectos de la L-DOPA sobre las CC en cultivo.
 - 1.1 Estudiar los efectos de diferentes concentraciones de L-DOPA sobre la densidad de CC.
 - 1.2 Analizar los mecanismos de muerte celular por la exposición a L-DOPA.
 - 1.3 Determinar el tiempo de mayor toxicidad de la L-DOPA en la apoptosis.

2. Examinar si los antioxidantes previenen la toxicidad de la L-DOPA *in vitro*.
 - 2.1 Determinar el efecto antioxidante del C₆₀ sobre la toxicidad de L-DOPA a concentraciones clínicas
 - 2.2 Analizar el efecto del AA sobre la toxicidad de L-DOPA a dosis clínicas y compararlo con el del C₆₀.

3. Investigar el efecto de la L-DOPA a dosis clínicas sobre las CC transplantadas al cerebro de ratas con lesión unilateral de la vía nigroestriatal.

4. Indagar el efecto antioxidante del ácido ascórbico sobre la toxicidad inducida por L-DOPA sobre las CC transplantadas al cerebro de ratas con lesión unilateral de la vía nigroestriatal.

MÉTODO

Experimentos in vitro

Cultivo Celular

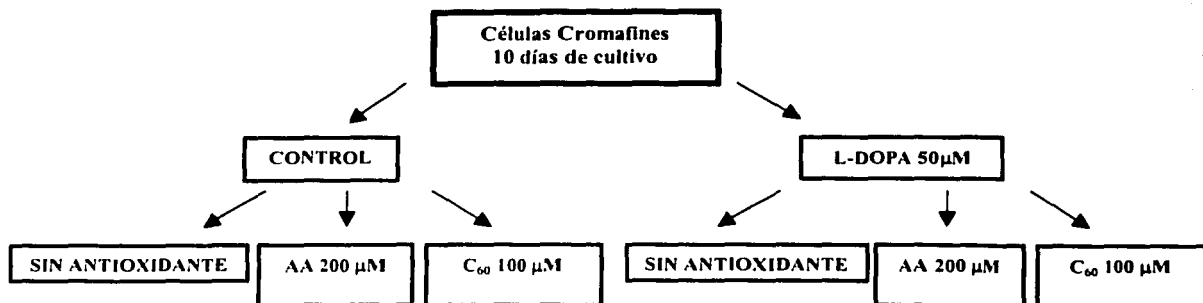
Se emplearon células cromafines de ratas 3 días de edad de la cepa Wistar del bioterio de la Facultad de Medicina, UNAM. Cada animal fue decapitado rápidamente y se extrajeron ambas glándulas suprarrenales en condiciones estériles. Bajo un microscopio de disección, cada médula suprarrenal fue separada de la corteza y para disociar por el método de la colagenasa se suspendieron en una solución Spinner sin calcio suplementada con albúmina bovina (1 ml/ml), desoxirribonucleasa I (15 µg/ml) y colagenasa tipo I (2mg/ml) (Worthington CLS1). Las glándulas se disociaron mecánicamente pasándolas por una pipeta Pasteur siliconizada y alisada con fuego. Posteriormente, la suspensión celular fue incubada durante media hora en un baño a 37°C y centrifugada a 800 rpm por 10 min. El sobrenadante fue eliminado y el botón se disoció y suspendió nuevamente bajo las mismas condiciones. A continuación, las células se suspendieron en medio de cultivo DMEM (Gibco) conteniendo suero fetal bovino (10% v/v) (Gibco), insulina (4.5µg/ml), penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 µg/ml) y anfotericina B (0.25 µg) (Sigma). Por esta técnica se obtuvo más del 95% de viabilidad, observada con un hemocitómetro por la técnica de exclusión con azul de tripano al 0.4%. Finalmente, las células se sembraron a una densidad de 1×10^6 células/ml en placas de cultivo de 4 pozos (250 µl de medio/pozo) (Nunc) sobre cubreobjetos de plástico tratados (13 mm de diámetro, Nunc). Los cultivos se mantuvieron en una incubadora húmeda a 37°C y una atmósfera con 5% de CO₂. El medio de cultivo fue cambiado cada 72 hrs.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Aplicación de L-DOPA y Antioxidantes

En ensayos iniciales, para estudiar la viabilidad celular se emplearon dosis de L-DOPA de 100 μM , 200 μM y 300 μM por 24 hrs. Esto se debió a que en algunos reportes (Mena et. al, 1993) estas eran las dosis de L-DOPA que causaban toxicidad en cultivos neuronales, de modo que se pensó si esto mismo se aplicaba para las CC. De manera similar, para indagar el efecto sobre la formación de células apoptóticas en diferentes tiempos de exposición a la L-DOPA, la concentración usada fue de 300 μM . Sin embargo, por nuestros primeros resultados (Corona-Morales et. al, 2000), se modificó la concentración de L-DOPA a las que se expusieron las CC. Esto se debió a que las concentraciones de levodopa reportadas en líquido cefalorraquídeo de pacientes con EP bajo tratamiento del fármaco van de 25 μM a 100 μM (Walkinshaw et. al, 1995) y a que en nuestros primeros experimentos, la dosis más baja probada (100 μM) producía un efecto máximo similar al de dosis más elevadas. Esto sugería que dosis menores podían seguir degenerando a las CC de manera significativa, por lo cual se eligió continuar los experimentos con una concentración de 50 μM de L-DOPA. De igual manera sucedió con el tiempo de exposición a la L-DOPA, debido a que en nuestros primeros resultados se observó que a las 4 hrs con L-DOPA se alcanzaba el máximo nivel en el número de células apoptóticas. Las concentraciones de AA (200 μM) y C₆₀ (100 μM) empleadas en este trabajo se eligieron debido a que son las concentraciones reportadas con mayor beneficio o recuperación como agentes antioxidantes en cultivo y que no poseen efectos tóxicos (Pardo et. al, 1993; Kalir et. al, 1991; Dugan et. al, 1996; Zhang et. al, 1998). El protocolo a partir de entonces fue el siguiente: los cultivos de células cromafines se dividieron en dos grupos:

control (sin L-DOPA) y con L-DOPA 50 μM . Cada uno a su vez fue dividido en tres subgrupos: sin antioxidantes, con AA 200 μM y C₆₀ 100 μM .



Ensayo de viabilidad celular por MTT

Se estimó la viabilidad celular por las reducción de la sal de tetrazolio MTT a azul formazán (Slater et. al, 1963). Para ello, las células se sembraron en placas de 96 pozos con 100 μl de DMEM por pozo. Después de 24 hrs de exposición a concentraciones de L-DOPA de 100 μM , 200, μM y 300 μM , se agregaron 10 μl de solución stock de MTT (5mg/ml en PBS)/pozo en el que las células se incubaron a 37°C por 3 hrs. Al término, se absorbió la solución con una pipeta Pasteur y se añadieron HCl 0.04 M diluido en isopropanol para solubilizar el azul formazán. Para terminar, se midió la densidad óptica de cada pozo en un lector de ELISA a una longitud de onda de 570-630 nm.

Detección de Apoptosis

Se caracterizó el proceso de muerte celular apoptótica por la técnica de TUNEL (por sus siglas en inglés: Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) – mediated dUTP nick

end-labeling (Promega Corporation). Después de la exposición a las diferentes drogas, los cultivos se fijaron con paraformaldehído al 4% (Merk) en 0.1M de buffer de fosfatos (PBS, pH 7.4) a temperatura ambiente por 20 min. Después de dos lavados con TBS (buffer salino tris), los cultivos se incubaron con proteinasa K (2mg/ml, dilución 1:1000) en TBS 10 mM (pH 8) durante 5 min a temperatura ambiente y luego tres lavados con TBS por 5 min cada uno. Posteriormente se incubaron con H₂O₂ al 3% por 10 min y se lavaron nuevamente con TBS. Los cultivos se preincubaron con buffer de equilibrio TdT por media hora a temperatura ambiente y a continuación se incubaron con una mezcla que contiene a la enzima TdT (3 µl) más los desoxinucleótidos biotinilados en buffer TdT (57µl) por 90 min a 37°C. La reacción se detuvo con un lavado con TBS y otro con EDTA 0.5 M (pH 8) a temperatura ambiente por 5 min. A esto siguió un lavado con buffer bloqueador (BSA al 4% en PBS) por 10 min a temperatura ambiente y una incubación en una cámara húmeda con el conjugado estreptavidina-peroxidasa a 37°C. Después de una hora, los cultivos se lavaron con PBS se revelaron con diaminobencidina -DAB- (5 µg of 3-3 diaminobencidina -Sigma- en 10 ml de buffer Tris-HCl 0.5 M pH 7.4 que contiene 0.01% H₂O₂) por 5 min a temperatura ambiente. Finalmente las células fueron contrateñidas con verde de metilo y montadas con resina sintética sobre portaobjetos de vidrio.

Detección Inmunocitoquímica de células TH-positivas

Los cultivos expuestos a los diversos tratamientos fueron lavados con PBS y fijados con paraformaldehído al 4% en PB 0.1 M y después fueron lavados nuevamente con PBS tres veces. Los cultivos se incubaron con suero normal de cabra (NGS) al 20% (Zymed) más Tritón X-100 (0.1%) en PBS. Posteriormente, se incubaron por 24 hrs con anticuerpo

primario de conejo anti-TH a una dilución de 1:2000 (Chemicon) en PBST (PBS más 0.1% de Triton X-100) más NGS 1%. Al término de la incubación, las células se lavaron con PBST, se incubaron con el anticuerpo secundario biotilado de cabra anti-conejo IgG (ICN Biochemical) por 1h a 37 °C y se lavaron con PBS. Se incubaron con el conjugado estreptavidina-peroxidasa ((ICN Biochemical) por una hora y finalmente la reacción se reveló incubando las muestras por 10 min con la siguiente solución de 3-amino-etil carbazol: 20 mg de carbazol (Sigma), 0.5 ml de dimetilformamida (Sigma), 9.5 ml de buffer de acetato buffer 0.5M (pH 5) y 3 gotas de H₂O₂ al 3% a temperatura ambiente. Las muestras se lavaron varias veces con agua bidestilada y se montaron sobre portaobjetos cubiertos con gelatina de glicerina. De esta manera, el citoplasma de las células TH-positivas se observó de color rojo.

Doble Marcaje: Detección Simultánea de Apoptosis y de células TH-positivas

Después de los diversos tratamientos experimentales, algunos cultivos de CC se trataron para la detección simultánea de apoptosis y de inmunoreactividad a TH. Primero, los cultivos se procesaron con la técnica de TUNEL como previamente se indicó, excepto que las células no fueron contrateñidas ni montadas, sino que permanecieron en los cubreobjetos dentro de los pozos. Debido a que se empleó como cromógeno DAB, los núcleos apoptóticos se visualizaron de color café oscuro. Al término de la reacción de TUNEL, se realizaron tres lavados con PBS y se incubaron con H₂O₂ al 3% durante 10 min. Posteriormente, se siguieron los mismos pasos señalados para la inmunocitoquímica para células TH positivas, con excepción del revelado: después de incubar las células con el conjugado estreptavidina-peroxidasa (ICN Biochemical), se revelaron incubando las muestras por 10 min con la solución de 3-amino-etil carbazol: 20 mg de carbazol (Sigma),

0.5 ml de dimetilformamida (Sigma), 9.5 ml de buffer de acetato 0.5M (pH 5) y 3 gotas de H₂O₂ al 3% a temperatura ambiente. Las muestras se lavaron varias veces con agua bidestilada y se montaron sobre portaobjetos con gelatina de glicerina. De esta manera, el citoplasma de las células TH-positivas se observó de color rojo.

Análisis Estadístico

De cada grupo experimental, se eligieron al azar 10 campos bajo el microscopio y se llevó a cabo el conteo de células marcadas, células apoptóticas y cuerpos apoptóticos. El análisis estadístico se realizó con la prueba de Student – Newman – Keuls (GraphPad InStat -GraphPad software, V 2.05-) y el procesamiento gráfico se hizo con el programa de cómputo Excel (Microsoft Office v. 2000).

Experimentos in vivo

Con el objetivo de estudiar los efectos de la L-DOPA sobre las CC *in vivo*, se llevaron a cabo trasplantes de tejido cromafín en el ventrículo cerebral en ratas siguiendo el modelo animal de Parkinson con 6-OHDA.

Lesión de la vía nigroestriatal

Se siguió el modelo animal con 6-OHDA. Se emplearon ratas Wistar machos de 180 gr a 200 gr de peso corporal del bioterio de la Facultad de Medicina, UNAM. Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (64.8 mg/cc) intraperitonealmente a una dosis de 42 mg/kg. Por medio de técnica estereotáxica, los animales fueron lesionados de la vía nigroestriatal derecha, cuyas coordenadas fueron: AP=-2.8, L=-2.0, DV=-8.6 (Paxinos et al, 1998). Cada animal recibió 8µg de hidrobromuro de 6-OHDA (ICN Biochemical)

(diluidos en 4µl de solución salina 0.9% y de ácido ascórbico 0.1%) por medio de una microjeringa (Hamilton) a una velocidad de 1 µl/min. Después de vaciar el contenido, la microjeringa permaneció en el lugar por 2 min más. Posterior a la lesión, los animales se mantuvieron en un bioterio con libre acceso a comida y agua.

Conducta de giro

Después de 10 días de la lesión, los animales fueron sometidos a la prueba de giro. Se llevó a cabo en recipientes de plástico de 60 cm de diámetro y 50 cm de alto. Una vez pesadas, cada rata recibió una inyección intraperitoneal de apomorfina (0.25mg/kg). Después de tres minutos, se comenzó a contabilizar manualmente durante 30 min el número de giros completos e ininterrumpidos. Se considera que un animal lesionado satisfactoriamente del sistema nigroestriatal hace 225 giros en 30 min (Ungerstedt, U. 1973).

Transplante de CC

Se transplantó médula suprarrenal de ratas Wistar de 3 días de edad en los animales previamente lesionados. Cada rata lesionada se pesó y se anestesió bajo las mismas condiciones citadas anteriormente. Los animales se montaron en el aparato estereotáxico donde el cráneo se expuso y se trepanó para el transplante.

Una vez hecho esto, en condiciones de esterilidad, los animales de 3 días se decapitaron y a través de una incisión transversal de la región abdominal, se extrajeron ambas glándulas suprarrenales y se colocaron sobre un vidrio de reloj estéril con solución

salina. Bajo un microscopio de disección, se separó cada médula suprarrenal y se tomaron con una jeringa especialmente modificada (consistió de una jeringa esterilizada de insulina cuya aguja fue un capilar de vidrio de 2 cm de largo siliconizado y la punta afilada y pulida bajo fuego). La jeringa se montó sobre el estereotáxico (cuyas coordenadas anteroposterior y lateral estaban previamente establecidas y el tejido se transplantó en el parénquima cerebral dorsal al ventrículo lateral derecho de tal manera que el trasplante estuviera en contacto con el líquido cefalorraquídeo (el ventrículo ipsilateral a la lesión en las coordenadas AP=-0.8, L= 1.4, DV=-3.8, Paxinos et al, 1998).

Administración de L-DOPA y Antioxidantes

La dieta con los fármacos comenzó inmediatamente después del trasplante. Los animales se dividieron en tres grupos, de acuerdo con cada tratamiento: Control, L-DOPA (50 mg/kg)/carbidopa (5 mg/kg) y L-DOPA (50 mg/kg)/carbidopa (5 mg/kg) + AA (50 mg/kg). Para asegurar las dosis completas, los fármacos se administraron mezclados en 100 mg de queso en dos dosis separadas durante el día. La dieta se mantuvo por 10 días.

Inmunocitoquímica en rebanadas

Al término del tratamiento con los fármacos, cada animal transplantado fue perfundido intracardialmente de la siguiente manera: primero se introdujeron 100 ml de sol. salina para lavar durante 5 min y luego con 500 ml de fijador durante 20 min. El fijador consistió de paraformaldehído al 4% en PB 0.1M + ácido pícrico al 15% v/v. Los cerebros extraídos se recolectaron en PBS 0.1M. Con cada cerebro se hicieron cortes de 50 μ m en un microtomo de cuchilla vibrante (Leica VT1000S) bajo una solución de PBS 0.1M. Se

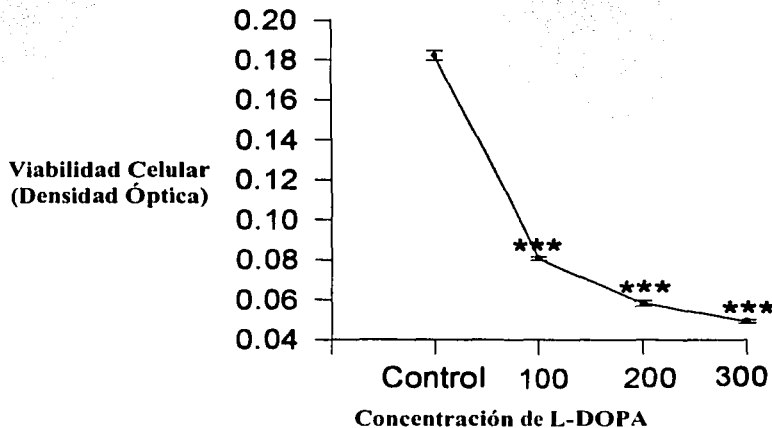
recolectaron los cortes dentro y alrededor del sitio del trasplante. Los cortes de cada grupo experimental se pasaron por una solución de bloqueo, que consistió de PBS 0.1M + 0.1 % de Triton X-100 (PBST) +20% de NGS por 1hr. A continuación, las rebanadas se incubaron con el anticuerpo primario anti-TH de conejo (Chemicon AB152) a una dilución 1:500 diluido en PBST + 1% de NGS durante 16 hrs a 4°C . A partir de aquí hasta el término de la inmunocitoquímica, todos los pasos se hicieron con agitación constante. Después de 3 lavados con PBST por 15 min, los cortes fueron incubados en el anticuerpo secundario de cabra anti-conejo en una dilución 1:50 por 1 hr a 25°C. Se continuó con un lavado con PBST por 10 min y dos más con PBS 0.1M por 10 min c/u. Durante una hora, los cortes se incubaron con el complejo estreptavidina-peroxidasa a 25°C, se lavaron 3 veces con PBS 0.1M y se revelaron exponiéndolos 3 min con DAB. Finalmente, se lavaron 3 veces con agua destilada y se montaron sobre portaobjetos y cubreobjetos (No. 1).

RESULTADOS

Resultados in vitro

1. Estimación de la viabilidad celular por MTT

Al inicio de la fase experimental, los cultivos celulares, los cuales además de CC contienen fibroblastos, células de la corteza suprarrenal y neuronas simpáticas, fueron expuestos a diferentes concentraciones de L-DOPA por 24 hrs. Se observa que desde la dosis menor, la viabilidad disminuye significativamente, aunque a dosis mayores, se acentuó el daño (fig. 4). Las dosis de 100 μM , 200 μM y 300 μM de L-DOPA disminuyeron la densidad celular a 44.32%, 32.14% y 27.2%, respectivamente.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 4. Estimación de la viabilidad de cultivos celulares por la técnica de MTT con diferentes concentraciones de L-DOPA por 24 hrs. . *** =diferencia significativa respecto al control, $p < 0.001$.

2. Efecto de la L-DOPA sobre la densidad de células TH-positivas

De los diferentes tipos celulares en los cultivos, únicamente las CC poseen la maquinaria enzimática para la producción de catecolaminas. Desde la concentración más baja de L-DOPA, se alcanzó el máximo número de degeneración de CC. La densidad de células TH-positivas fue de 24.5% en 100 μ M, 22.96% en 200, μ M y de 19.6% en 300 μ M de L-DOPA (fig. 5).

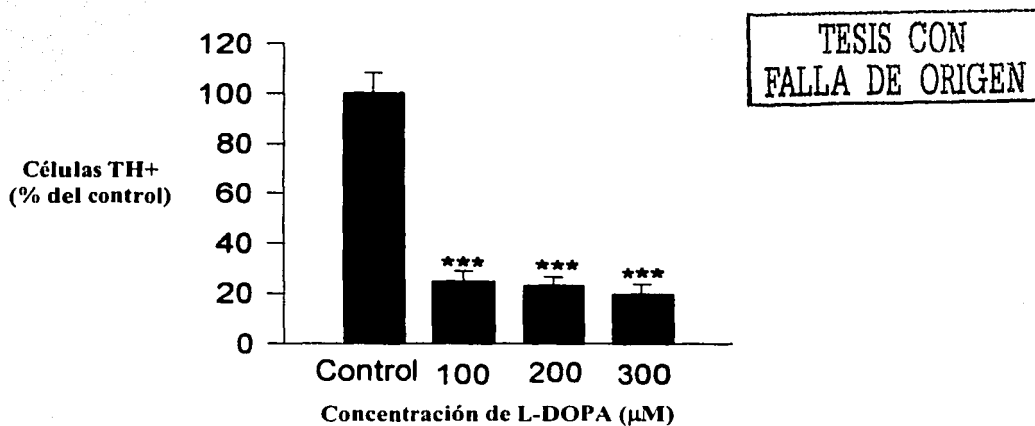


Figura 5. Porcentaje de células TH-positivas con diferentes concentraciones de L-DOPA por 24 hrs. *** =diferencia significativa respecto al control, $p < 0.001$.

En el grupo control, fue evidente que había gran cantidad de CC con una morfología neuronal con extenso crecimiento neurítico. Sin embargo, en los grupos tratados con L-DOPA, se observó que algunas CC muertas tenían características necróticas, como ruptura de membrana, vacuolas citoplásmicas y núcleo picnótico (fig. 6). No obstante, se encontraron algunas células con características relacionadas a la muerte apoptótica, como fragmentación nuclear y encogimiento del citoplasma, lo cual fue el indicio para aplicar una técnica especialmente diseñada para la detección de tal proceso.

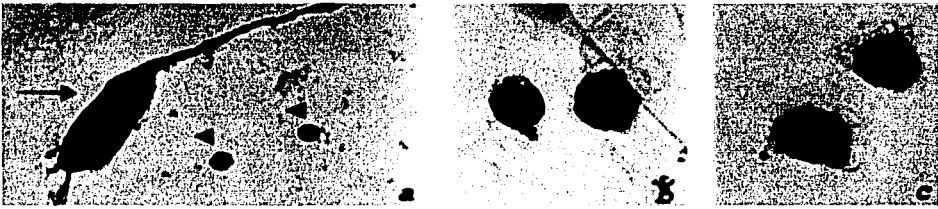


Figura 6. Fotomicrografías de células cromafines (TH-positivas) tratadas con L-DOPA 300 μ M. a) una CC normal (flecha) y dos micronúcleos (cabezas de flecha); b) CC con morfología necrótica como la ruptura de la membrana plasmática y la formación de vacuolas, c) CC con fragmentación del núcleo. Contratinción con hematoxilina. Aumento=380X.

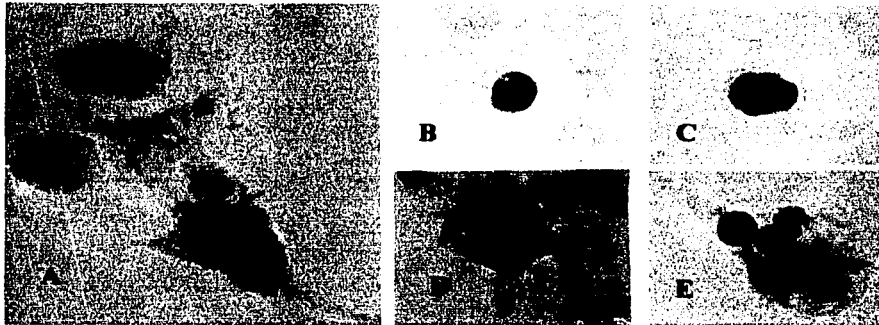


Figura 7. Características apoptóticas secuenciales en cultivo de CC por la inducción de L-DOPA 300 μ M. A) un núcleo TUNEL-positivos (café) y dos núcleos normales (verdes); B) y C) condensación de la cromatina; D) fragmentación del núcleo; E) formación de cuerpos apoptóticos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3. Características apoptóticas inducidas por L-DOPA

Se empleó la técnica de TUNEL para la detección específica de apoptosis (fig. 7). Las células sanas (morfológicamente) no revelaron marca para TUNEL y en cambio el núcleo se observó de color verde (contratinción) (fig. 7a). Con la administración de L-DOPA se pudo identificar una serie de características típicas de la muerte celular apoptótica en diversos estadios cronológicos: células con prolongaciones neuríticas y la membrana celular bien conservada pero con fragmentación del núcleo (fig. 7a), morfología típica de apoptosis temprana; células con ausencia de prolongaciones neuríticas y en las cuales el material genético fragmentado se ha condensado alrededor de la membrana nuclear (fig. 7c), dando, en ocasiones, una morfología en forma de media luna (fig. 7b); células en las cuales la envoltura nuclear se forma vesículas y por lo tanto hay fragmentación del núcleo (fig. 7d), señal de una apoptosis avanzada; finalmente, la formación de cuerpos apoptóticos, que es el resultado de la fragmentación completa del citoplasma y el núcleo celular (fig. 7e).

4. Formación de células apoptóticas a diferentes tiempos con L-DOPA

Para indagar el tiempo mínimo de aplicación con la L-DOPA en el cual se observe el mayor efecto en el número de células en apoptosis, algunos cultivos de CC se expusieron a distintos tiempos con L-DOPA y se estudiaron con la técnica de TUNEL. A partir de la primera hora de aplicación, el incremento en el número de células marcadas comenzó a ser significativo (fig. 8) y el número máximo de células apoptóticas se alcanzó a las 4 hrs. A partir de este experimento, este tiempo continuó aplicándose.

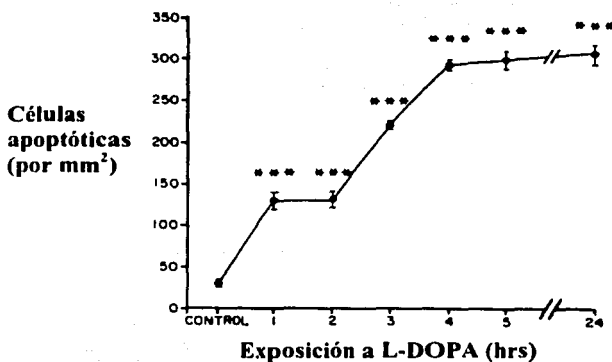


Figura 8. Formación de células con características apoptóticas a diferentes tiempos de exposición a 300 μ M de L-DOPA. *** =diferencia significativa respecto al control, $p < 0.001$. $n = 12$.

5. Efecto del C₆₀ y AA sobre la densidad de células TH-positivas por la toxicidad de L-DOPA.

Debido a que en la toxicidad de la L-DOPA participa el estrés oxidativo generado a través de su oxidación, su efecto podría revertirse con la aplicación de antioxidantes. Para ello, se eligió al AA, ampliamente usado en varios experimentos de cultivo celular por su capacidad alta capacidad antioxidante. Por otro lado, debido a sus características antioxidantes, los fulerenos están atrayendo la atención de diversos grupos de investigación por sus posibles aplicaciones en la biomedicina. Sin embargo, no se conocen por completo sus propiedades en sistemas biológicos; incluso, se ha observado que bajo ciertas condiciones pueden actuar como oxidantes (Kamat et. al, 2000). Por esto, resultó interesante analizar su comportamiento en el modelo de la L-DOPA en CC y además, compararlo con el del AA.

La aplicación de C₆₀ (100 μ M) o de AA (200 μ M) por 4 hrs no modificó la densidad de CC respecto de los cultivos sin droga alguna (fig. 9). En estos tres grupos, fue

muy notorio el desarrollo extensivo de prolongaciones neuríticas en las CC (fig. 11). En contraste, 50 μM de L-DOPA durante el mismo lapso fue suficiente para reducir significativamente el número de CC. Además, las prolongaciones neuríticas desaparecieron por completo. Sin embargo, como se puede comparar con la fig. 4, la toxicidad con la dosis de 50 μM fue menor al de las dosis aplicadas en experimentos anteriores con dosis de 100 μM , 200 μM o 300 μM . La exposición de C_{60} atenuó el daño causado por la L-DOPA a niveles similares a los del AA o de los controles, no sólo en la densidad celular, sino en la morfología de las CC.

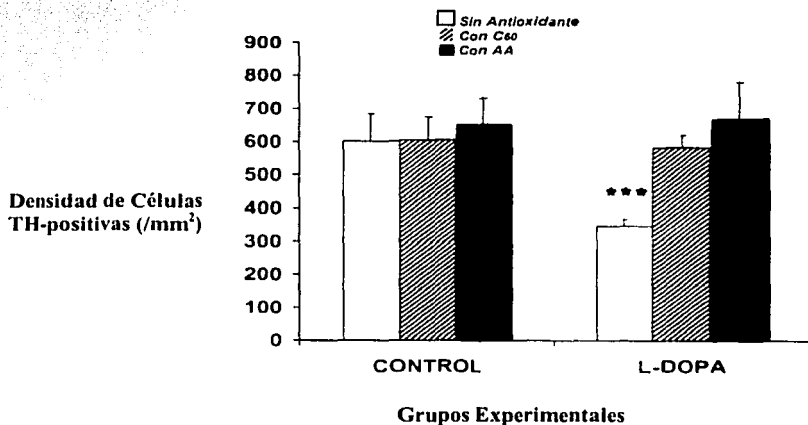


Figura 9. Densidad de células TH-positivas en los distintos grupos experimentales. L-DOPA 50 μM , C_{60} 100 μM , AA 200 μM . *** =diferencia significativa respecto al control, $p < 0.001$. $n = 10$.

6. Efecto de los antioxidantes sobre la muerte apoptótica de CC por L-DOPA

Con las primeras observaciones de muerte apoptótica en nuestros cultivos (punto 3 de resultados), los cuales, como fue mencionado anteriormente, contienen otros tipos celulares además de CC, se diseñó el experimento de doble inmunocitoquímica para células

TH-positivas + TUNEL-positivas con el objetivo de observar el proceso apoptótico específicamente sobre las CC. Existió un número constante de CC que murieron por apoptosis sin la aplicación de droga alguna ($77 \pm 16/\text{mm}^2$) (fig. 10). La administración de C_{60} ($100 \mu\text{M}$) o de AA ($200 \mu\text{M}$) por 4 hrs no modificó el número de eventos apoptóticos significativamente ($93 \pm 6/\text{mm}^2$ y $88 \pm 18/\text{mm}^2$, respectivamente). No obstante, la presencia de L-DOPA $50 \mu\text{M}$ durante el mismo lapso incrementó drásticamente la formación de cuerpos apoptóticos ($232.84 \pm 24.7/\text{mm}^2$) ($n = 10$). Tanto el C_{60} ($100 \mu\text{M}$) como el AA ($200 \mu\text{M}$) disminuyeron el número de CC apoptóticas inducidas por la L-DOPA a niveles semejantes a los controles ($100 \pm 22/\text{mm}^2$ y $96 \pm 24/\text{mm}^2$, respectivamente). Estos resultados confirmaron aquellos observados previamente con la inmunocitoquímica para la detección de la TH.

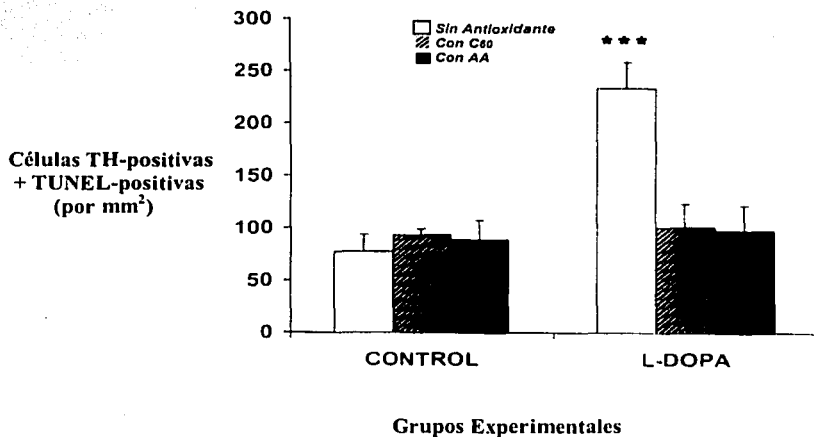


Figura 10. Densidad de núcleos apoptóticos de CC en cultivo tratados con L-DOPA y antioxidantes durante 4 hrs . L-DOPA $50 \mu\text{M}$, C_{60} $100 \mu\text{M}$, AA $200 \mu\text{M}$.
*** =diferencia significativa respecto al control, $p < 0.05$. $n = 12$.

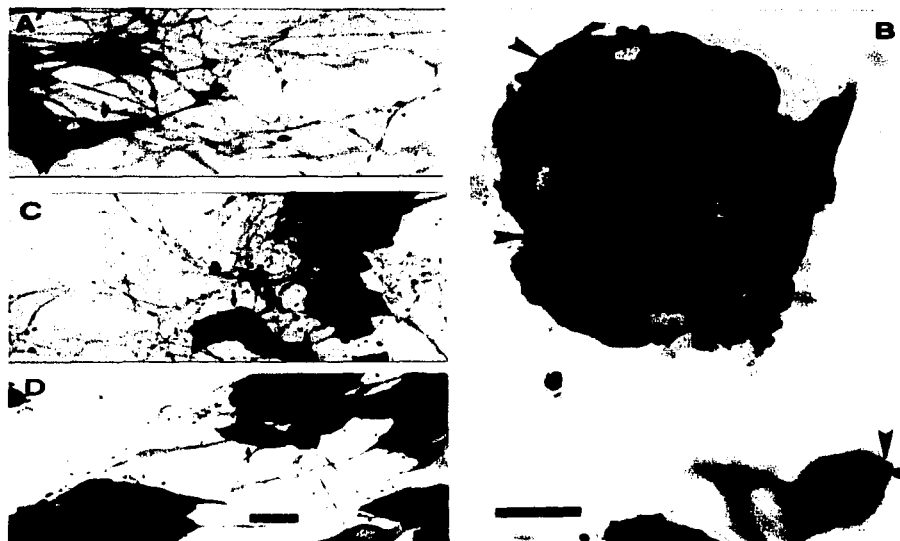


Figura 11. Fotomicrografías de doble marcaje en cultivo para células TH-positivas y TUNEL-positivas bajo los diferentes tratamientos con 4 hrs de exposición. Los núcleos apoptóticos se observan de color café oscuro y las células TH-positivas con citoplasma rojo. A) Cultivo Control con CC extensivas prolongaciones neuríticas y núcleos claros (no apoptóticos); B) Cultivos con L-DOPA 50 μ M por 4 hrs en los que las CC se observan redondas y desaparece la red neurítica. Los núcleos apoptóticos se señalan con flechas y un asterisco muestra una célula expulsando su núcleo. C) Cultivos con L-DOPA 50 μ M + C₆₀ 100 μ M y D) Cultivos con AA 200 μ M, en los que la morfología es semejante al de los controles. Barra=20 μ m.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

7. Especificidad de la toxicidad por L-DOPA sobre las CC

Con la finalidad de analizar si la L-DOPA lesiona de igual manera a las CC que a los demás tipos celulares de los cultivos, se cuantificó el número de células apoptóticas sin marca a TH y se comparó con la densidad de células TH-positivas + TUNEL-positivas (Tabla 1).

	Total de células TH-positivas (n_T)	Células TH+ y TUNEL + (n_A)	Fracción n_A/n_T (%)	Células TH- y TUNEL +
Control	602±81	77±16	12.41	32±6
C ₆₀	605±69	93±6	14.30	27±5
AA	650±79	88±18	13.53	31±6
L-DOPA	347±20	233±25	67.14	30±4
L-DOPA + C ₆₀	580±88	100±22	17.24	27±5
L-DOPA + AA	667±111	96±24	14.39	27±6

Tabla 1. Comparación morfológica entre los diversos grupos experimentales (promedio± error medio/mm²).

El número de células TH negativas, es decir, células no cromafines, que experimentaron apoptosis fue mucho menor el de CC apoptóticas y no se encontró diferencia significativa entre los diferentes grupos experimentales (tabla 1, última columna)

Resultados *in vivo*

1. Conducta de giro

Después de más de 10 días a partir de la lesión con 6-OHDA, los animales fueron inyectados con apomorfina (0.25 mg/kg) para la cuantificación del número de giros. Únicamente los animales que giraron más de 225 veces en 30 min contralateralmente a la lesión fueron tomados en cuenta para el trasplante. Se contaron los giros ininterrumpidos y cerrados. Nunca se observó algún giro cerrado ipsilateral a la lesión en todos los animales para trasplantar.

2. Transplante

El tiempo tomado para la cirugía, desde la anestesia del animal hasta la inyección de las CC y la sutura del cuero cabelludo, siempre fue de 25 - 30 min. De manera similar, el lapso transcurrido desde la decapitación de los animales donadores (de 3 días) hasta la inyección del tejido transplantado en ningún caso superó los 4 min. (después de ese tiempo, el tejido fue desechado).

3. Efecto de la L-DOPA y los antioxidantes en el tejido suprarrenal transplantado

Después de 10 días de tratamiento, los animales de los tres grupos (Control, L-DOPA y L-DOPA + AA) se sacrificaron, se perfundieron y se obtuvieron cortes de la región del transplante.

En los grupos control, el lugar del transplante es identificado fácilmente ya que como se puede observar en la fig. 12, el tejido transplantado sobresale del parénquima cerebral del animal receptor, dorsal del ventrículo lateral, con abundante marca de células TH-positivas y una trayectoria (cicatriz) desde la superficie cerebral hasta el lugar del injerto debido a la aguja. Incluso parece que el tejido transplantado se unió al parénquima que lo rodea. La morfología de las CC fue variada, siendo en ocasiones redonda pero en otras se observaron prolongaciones citoplasmáticas.

De manera totalmente opuesta, en los cortes del grupo tratado únicamente con L-DOPA durante el mismo lapso no se encontró marca TH-positiva en ningún animal (fig. 13). En su lugar, se observó en el sitio del transplante solamente una cicatrización tisular

con detritos celulares y la trayectoria de la aguja. No se observó marca de células TH-positivas.

En los animales tratados con L-DOPA + AA por 10 días, fig. 14, se observó gran densidad de células TH-positivas. El tejido de médula suprarrenal parece estar totalmente unido al parénquima circunvecino e incluso se observaron algunas CC con pequeñas prolongaciones neuríticas.

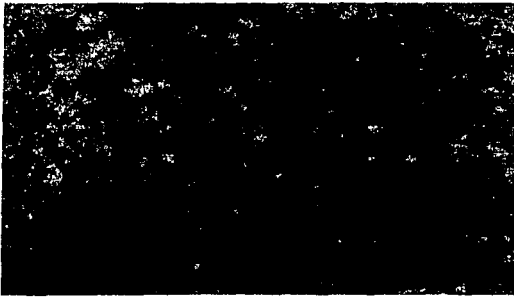
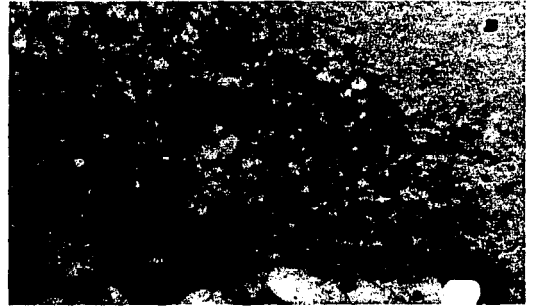


Figura 12. Fotomicrografías de rebanadas cerebrales del grupo Control en el sitio del trasplante donde se observan CC con inmunorreactividad a TH. A) 4X, barra=100 μ M; B) 10X, barra=100 μ M; C) 20X, barra=50 μ M

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

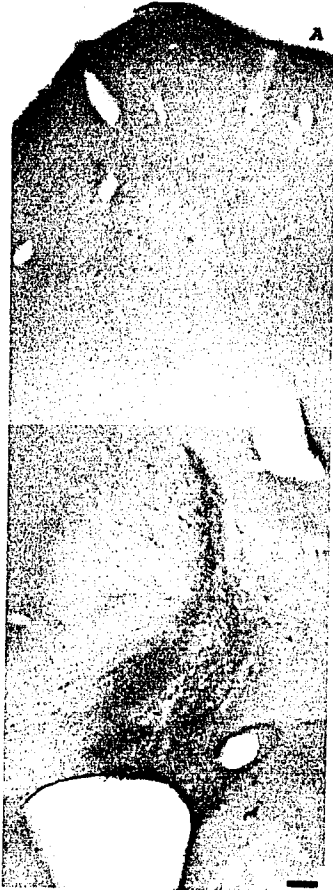


Figura 13. Fotomicrografías de rebanadas cerebrales del grupo tratado con L-DOPA. No se observa inmunorreactividad a TH y en cambio sí detritos celulares. A) 4X, B) 10X. Barra=100 μ M.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

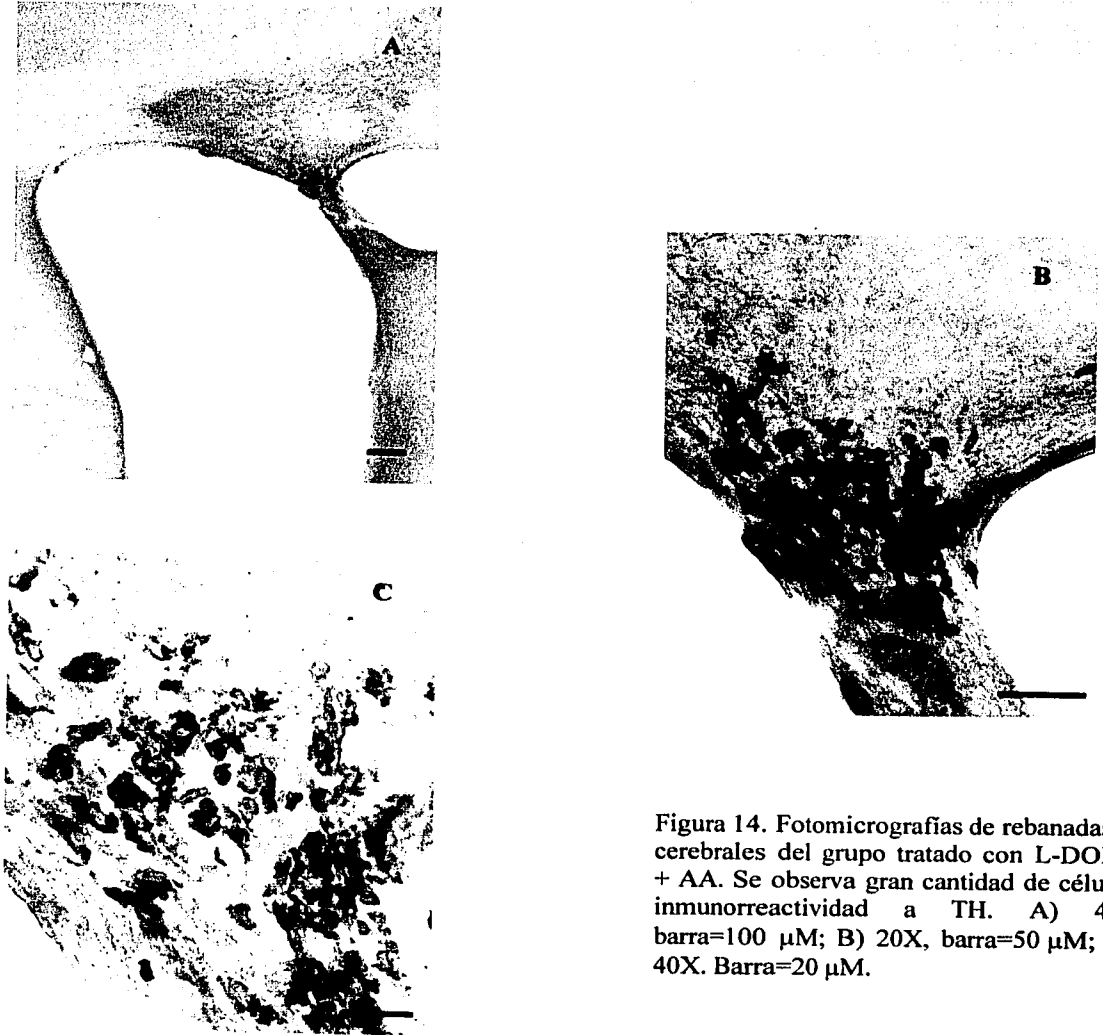


Figura 14. Fotomicrografías de rebanadas cerebrales del grupo tratado con L-DOPA + AA. Se observa gran cantidad de células inmunorreactividad a TH. A) 4X, barra=100 μ M; B) 20X, barra=50 μ M; C) 40X. Barra=20 μ M.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DISCUSIÓN

La terapia más empleada y que mejores resultados ha brindado para controlar los síntomas de la EP ha sido desde hace décadas el tratamiento a base de L-DOPA, debido a su capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica y ser metabolizada a DA dentro de las terminales sinápticas de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc. Sin embargo, después de un tratamiento prolongado, sus efectos benéficos van disminuyendo y aparecen otros síntomas relacionados con el fármaco e independientes de la enfermedad.

Debido a que llegando a este estado los pacientes quedan totalmente inhabilitados y con una calidad de vida deficiente, y a falta de otra estrategia farmacológica, se pensó en el trasplante catecolaminérgico como una bomba endógena que estuviese liberando DA. Si bien el trasplante de tejido mesencefálico embrionario representa una mejoría en muchos casos, sus desventajas evitaron que se continuara desarrollando. Otra alternativa fue el autotrasplante de CC de tejido suprarrenal (un ser humano puede sobrevivir sin problemas con sólo una glándula suprarrenal). Después de llevarse a cabo en varias partes del mundo, su empleo se volvió controvertido debido a los resultados contradictorios que se reportaban por diferentes grupos de investigadores, en la mayoría de los cuales reportaban baja sobrevida del tejido transplantado e incluso su degeneración. Sin embargo, en todos los casos, la L-DOPA continuó siendo administrada después del trasplante con la idea de ir disminuyendo la dosis conforme el trasplante empezase a funcionar adaptándose a su nuevo ambiente. Debido a que la dosis de L-DOPA administrada es aquella en la que se mejoran los síntomas, las concentraciones y los intervalos de tiempo fueron diferentes para cada paciente. Este hecho, junto con el conocimiento que a la L-DOPA en ciertas

condiciones se le involucraba con fenómenos de toxicidad, indujo a cuestionarse si la L-DOPA pudiese estar interviniendo, entre otros factores, en la baja viabilidad del trasplante bajo las condiciones mencionadas.

El primer paso fue, entonces, indagar si la L-DOPA afectaba la densidad celular en cultivo con concentraciones (100 μM , 200, μM y 300 μM) que en otros trabajos inducían lesión principalmente a las células catecolaminérgicas. Los cultivos realizados contenían, además de CC, células TH-negativas, como fibroblastos, neuronas colinérgicas y células de la corteza suprarrenal, por lo que nos permitieron estudiar si las CC, catecolaminérgicas, tenían una vulnerabilidad específica hacia la L-DOPA. Al comparar los resultados en los que se midió la viabilidad de todo el conjunto de células (técnica del MTT) con las CC (TH-positivas), se encontró que la población de CC se afectaba en mayor grado que el resto del cultivo (con 100 μM de L-DOPA, la densidad de CC disminuyó al 24.5% -fig. 5- mientras que de la de todo el conjunto solamente al 44.32% -fig. 4-). Es decir, se requieren menores dosis de L-DOPA para inducir toxicidad a las CC que a células no catecolaminérgicas, lo cual tiene similitud con la vulnerabilidad que se reporta para ciertos tipos de neuronas catecolaminérgicas. Esto sugiere que podría requerirse menor tiempo de exposición al fármaco (respecto a otros tipos celulares) para provocar un daño en las CC.

Otra manera en que resultaría interesante estudiar el daño por la L-DOPA sería observando la inducción de muerte por apoptosis, un proceso activo controlado por la célula involucrada con características morfológicas muy típicas y que la distinguen de la muerte necrótica (morfológicamente, en la necrosis hay edema citoplásmico y mitocondrial,

ruptura de membranas y liberación de los componentes celulares, causando inflamación).

El papel de los radicales libres en la inducción de la apoptosis se ha demostrado en gran cantidad de estudios *in vitro*, en donde el estrés oxidativo se ha producido por diversos agentes, como por ejemplo, con radiación ultravioleta (Zamzami et. al, 1995), con drogas quimioterapéuticas (Gorman et. al, 1997), por el factor de necrosis tumoral- α (Suzuki et. al, 1998) o con L-DOPA sobre células PC-12 (Walkinshaw et. al, 1995).

En nuestros experimentos, con la aplicación de L-DOPA (100 μ M, 200, μ M o 300 μ M) se observaron los diversos estados cronológicos por los que transcurre una célula que muere por apoptosis: condensación de la cromatina, vesiculación y la consecuente fragmentación del núcleo, fragmentación del citoplasma y finalmente la formación de cuerpos apoptóticos (Kerr et. al, 1972). Además, las prolongaciones neuríticas de las CC se contrajeron debido al efecto tóxico de la L-DOPA. Ya que el inicio de la apoptosis, manifestación primaria de la toxicidad, se presenta obviamente antes de que se pueda observar una disminución de la densidad celular en los cultivos, se indagó el tiempo mínimo de exposición a la L-DOPA en que se encontraba el mayor número de células apoptóticas. Este lapso fue de 4 hrs y, por consiguiente, fue el tiempo de exposición que se empleo para los siguientes experimentos en cultivo.

El hecho de que la concentración de L-DOPA en líquido cefalorraquídeo es de 25 μ M a 100 μ M en pacientes bajo tratamiento del fármaco y, por otro lado, el que observásemos que la concentración de 100 μ M de L-DOPA disminuía la densidad de células TH-positivas a un punto máximo en el cuál mayores concentraciones ya no

modificaban tal densidad (fig. 5), se decidió bajar la dosis a 50 μM , equivalente a la dosis clínica. Cabría esperar que la reducción tanto en la concentración de L-DOPA como en el tiempo de su exposición disminuiría el efecto tóxico en las CC. Así, se encontró que 50 μM de L-DOPA por 4 hrs disminuyó la densidad de células TH-positivas en un 42.35% (fig. 9), mientras que 100 μM de L-DOPA durante 24 hrs lesionó el 75.5% de ellas (fig. 5).

El efecto preventivo de la toxicidad por L-DOPA de los antioxidantes C_{60} y AA fue evidente. No sólo la densidad celular de CC fue similar al de los controles (fig. 9), sino también la morfología. En los grupos control, L-DOPA + C_{60} y L-DOPA + AA, muchas de las CC mostraron un citoplasma alargado o elíptico con abundante red de prolongaciones neuríticas recorriendo en ocasiones largas distancias (fig. 11). En cambio, en el grupo con únicamente L-DOPA (50 μM) se observó que las CC adquieren una morfología redonda y una retracción y desaparición completa de prolongaciones neuríticas.

El efecto protector de los antioxidantes C_{60} y AA también se comprobó al demostrar que ambos previnieron la muerte apoptótica de las CC, el tipo celular más vulnerable a la L-DOPA en los cultivos. Sin la aplicación de droga alguna, hubo un número constante de CC apoptóticas en los cultivos, y este número no se modificó con la aplicación de AA o C_{60} (fig. 10), lo que una vez más indicó que ambos antioxidantes por si solos, a las concentraciones empleadas, no afectan la viabilidad de las CC. Sin embargo, la L-DOPA provocó que, además de disminuir la densidad de CC a casi la mitad, el 67.14% de éstas se encontraron en un proceso de apoptosis. En estos experimentos, observamos también alteraciones del citoplasma y desaparición de prolongaciones neuríticas. Esto coincide con

estudios en los que se demuestra que durante la muerte celular apoptótica existe, entre otros procesos, un reacomodo de los componentes del citoesqueleto por la acción de ciertas proteínas citoesqueléticas que involucra una retracción de neuritas (Schwartzman et. al, 1993; Shelton et. al, 2001).

Al igual que aconteció con la densidad celular, tanto el C₆₀ como el AA previnieron la inducción de la muerte apoptótica, con un número de eventos apoptóticos similares a los controles.

El hecho de que ambos antioxidantes, C₆₀ y AA, funcionaran para revertir el daño por L-DOPA confirma que tal toxicidad es causada por un incremento en la formación de radicales libres durante la oxidación del fármaco. Por los resultados *in vitro*, el efecto del C₆₀ previniendo la toxicidad de la L-DOPA igualó a la capacidad antioxidante del AA, molécula ampliamente usada en diversos paradigmas de estrés oxidativo.

Para determinar que L-DOPA afecta en mayor medida a las CC que al resto de las células presentes en los cultivos, se contabilizó también el número de células con marca de apoptosis que fueron negativas a TH. Se encontró en todos los casos que mucho menos células TH negativas fueron afectadas por concentraciones clínicas de L-DOPA, lo que confirma que las células catecolaminérgicas son más vulnerables a la L-DOPA que otros tipos celulares.

Con la demostración de que la L-DOPA *in vitro* produce toxicidad específicamente sobre las CC y que tal efecto puede ser contrarrestado por el uso de antioxidantes, se indagó si esto mismo podría suceder *in vivo*, para lo cual se empleó el modelo animal de EP con 6-

OHDA. Se examinó la viabilidad de las CC transplantadas en el hemisferio ipsilateral a la lesión, cuyo estriado ya no recibía la estimulación de DA de la SNpc y que presentaba una supersensibilización de receptores DAérgicos. El trasplante en bloque se colocó en el cuerpo calloso inmediatamente dorsal al ventrículo lateral, de tal manera que no estuviese en el ventrículo libremente pero sí en contacto con el líquido cefalorraquídeo.

Después de 10 días de la cirugía, se observó inmunorreactividad a TH en el sitio transplantado en el grupo control, donde las CC conservaron su morfología redonda. Con el tratamiento de L-DOPA, a dosis equivalentes a las tomadas por pacientes con trasplante de médula suprarrenal, no se encontró señal alguna de células TH-positivas. Por el contrario, se encontraron restos celulares y una extensa cicatrización, las cuales son señales de muerte celular del tejido transplantado. Debido a que la única variable respecto al control fue la administración del fármaco, resultó claro que tal degeneración observada se debió a una toxicidad inducida por la L-DOPA. La toxicidad por L-DOPA *in vivo* ha sido observada anteriormente. Usando ratas con lesión unilateral de la vía nigroestriatal (con 6-OHDA), se estudió el efecto del tratamiento crónico con L-DOPA sobre las células DAérgicas que aún sobreviven a la lesión (Blunt et. al, 1993); se encontró que el tratamiento con L-DOPA aumentó el daño en el lado ipsilateral a la lesión, mientras que no alteró el número de neuronas DAérgicas en el lado intacto. En otro trabajo, se investigó si la L-DOPA a dosis clínicas incrementaba la producción de radicales libres en animales denervados con 6-OHDA. Si bien el tratamiento agudo con L-DOPA no tuvo efectos negativos, la administración repetida de la droga aumentó significativamente la producción de HO[•] en el estriado lesionado (Ishida et. al, 2000). También se han observado evidencias de un incremento en la formación de radicales libres por la administración de L-DOPA

(enfermos sin tratamiento con L-DOPA no mostraron tal incremento) en tejido sanguíneo de pacientes con EP (Martignoni et. al, 1999).

Por nuestros resultados se desprende la idea de que, si bien la L-DOPA no tiene efectos tóxicos en animales intactos o en el hemisferio no lesionado en el modelo de 6-OHDA (ni tampoco en seres humanos sin la EP con tratamiento prolongado con L-DOPA - sujetos mal diagnosticados-) (Chase, 1998), parece si haberlo, en el animal, cuando el sistema neuronal ha sido previamente alterado y donde el equilibrio oxidante-antioxidante pueda estar comprometido (la 6-OHDA, como la L-DOPA, incrementa la producción de radicales libres).

En nuestros experimentos, la adición de AA a la aplicación de L-DOPA protegió a las células TH-positivas de dicha toxicidad. Las CC parecieron integrarse al parénquima cerebral del animal huésped. Aún más, la densidad de CC aparentemente se mantiene al de los animales controles y en algunas ocasiones incluso se observó que su morfología, con prolongaciones neuríticas, es similar a los controles, por lo que se puede afirmar que el AA protege funcionando como atrapador de radicales libres producidos por la L-DOPA.

CONCLUSIONES

Al igual que otras líneas celulares catecolaminérgicas, la L-DOPA afectó principalmente a las CC de la médula suprarrenal. En cultivo, dosis clínicas del fármaco afectaron la morfología celular, redujeron la red de prolongaciones neuríticas, disminuyeron considerablemente la viabilidad celular e indujeron muerte celular tanto necrótica como apoptótica. El uso del C₆₀, administrado inmediatamente después de la exposición a la L-DOPA, previno el daño causado por la formación de radicales libres. Su efecto fue similar al del AA, ampliamente utilizado como agente antioxidante. Los experimentos anteriores proveen de nueva información para su potencial aplicación *en* modelos animales y, posiblemente, en la medicina.

Por otro lado, la administración de L-DOPA al animal (con lesión nigroestriatal) inmediatamente después de la cirugía de trasplante de CC al parénquima cerebral, indujo un daño dramático al tejido transplantado al grado en que no se observó la presencia de células TH-positivas. Sin embargo, la coadministración de ácido ascórbico previno completamente la toxicidad inducida por la L-DOPA. Incluso las condiciones del trasplante en estos animales pareció superar al de los animales control (sin ninguna droga).

Estas observaciones pueden tener consecuencias importantes. Aunque el trasplante de tejido suprarrenal en pacientes con la EP ya no se lleva a cabo desde hace algunos años, es evidente que los trasplantes al SNC continuarán con el desarrollo de nuevas técnicas y el empleo de nuevas líneas como las células troncales o células modificadas genéticamente. En el caso de la EP, se busca que estas líneas celulares nuevas funcionen como una bomba

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

que suple de DA en lugar de las células de la SNpc originales. En vista de la propensión bien documentada de la L-DOPA hacia células catecolaminérgicas, su toxicidad demostrada en el presente trabajo deberá tomarse en cuenta para las futuras técnicas de trasplante.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

REFERENCIAS

- Agid Y, Javoy-Agid F, Ruberg M. 1987. Biochemistry of neurotransmitters in Parkinson's disease. *Mov. Disord*, 2: 166-230.
- Arai R, Karasawa N, Geffard M, Nagatsu T, Nagatsu I. 1994. Immunohistochemical evidence that central serotonin neurons produce dopamine from exogenous L-DOPA in the rat, with reference to the involvement of aromatic L-amino acid decarboxylase. *Brain Res*, 667: 295-299.
- Backlund E. O, Granberg P. O, Hamberger B, Knutsson E, Martensson A, Sedvall G. 1985. Transplantation of adrenal medullary tissue to striatum in parkinsonism. First clinical trials. *J. Neurosurg*, 62:169-173.
- Barbeau A. 1961. Dopamine and basal ganglia disease. *Arc. Neurol*, 4: 97-102.
- Becker J. B, Freed W. J. 1988. Neurochemical correlates of behavioral changes following intraventricular adrenal medulla grafts: Intraventricular microdialysis in freely moving rats. *Prog. Brain Res*, 78: 527-533.
- Becker J. B, Curran E. J, Freed W. J. 1990. Adrenal medulla graft induced recovery of function in an animal model of Parkinson's disease: possible mechanisms of action. *Can. J. Psychol*, 44:293-310.
- Bertler A, Rosengren E. 1959. Occurrence and distribution of catecholamines in brain. *Acta Physiol. Scand*, 47: 350-361.
- Björklund A, Stenevi U, Svendgaard N. 1976. Growth of transplanted monoaminergic neurons into the adult hippocampus along the perforant path. *Nature*, 262: 787-790.
- Black V. A. 1992. The adrenal gland. En: *Cell and Tissue Biology, a text book of histology* (Weiss L, Eds.), pp. 1037-1065.
- Blunt S. B, Jenner P, Marsden C. D. 1993. Suppressive effect of L-DOPA on dopamine cells remaining in the ventral tegmental area of rats previously exposed to the neurotoxin 6-hydroxydopamine. *Mov. Disord*, 8: 129-33.
- Burke R. E. 1999. Parkinson's disease. En: *Cell death and diseases of the nervous system*. (Humana Press Eds.), pp: 459-475.
- Cadet J. L, Brannock C. 1998. Free radicals and the pathology of brain dopamine systems. *Neurochem. Int*, 32: 117-131.

Carlsson A, Lindquist M, Magnusson T, Waldeck B. 1958. On the presence of 3-hydroxytyramine in brain. *Science*, 127: 471-472.

Chalmers G. R, Fisher L. J, Nijijima K, Patterson P. H, Gage F. H. 1995. Adrenal chromaffin cells transdifferentiate in response to basic fibroblast growth factor and show directed outgrowth to a nerve growth factor source in vivo. *Exp. Neurol*, 133: 32-42.

Chase T. N, Fabbrini G, Juncos J. L, Mouradian M. M. 1990. Motor response complications with chronic levodopa therapy. *Adv. Neurol*, 53: 377-381.

Chase T. 1998. Levodopa therapy: consequences of the nonphysiologic replacement of dopamine. *Neurol* 50 (Suppl 5): S17-S25.

Ciccone C. D. 1998. Free-radical toxicity and antioxidant medications in Parkinson's disease. *Phys. Ther*, 78: 313-319.

Corona-Morales A. A, Castell A, Zhang L. 2000. L-DOPA-induced neurotoxic and apoptotic changes on cultured chromaffin cells. *NeuroReport*, 11: 503-506.

Cotzias G. C, Van Woert M. H, Schiffer L. M, 1967. Aromatic amino acids and modification of parkinsonism. *N. Engl. J. Med*, 276: 374-379.

Cotzias G. C, Papavasiliou P. S, Gellene R. 1968. Experimental treatment of parkinsonism with L-DOPA. *Neurology*, 18: 276-277.

Coyle J. T, Schwarcz R. 1976. Lesion of striatal neurons with kainic acid provides a model for Huntington's chorea. *Nature*, 263: 244-246.

Curtin J. F, Donovan M, Cotter T. G. 2002. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J. Immunol. Methods*, 265: 49-72.

Doucet G. P, Murata P, Brundin P, Bosler O, Mons N, Geffard M, Ouimetm C. C, Björklund A. 1989. Host afferents into intrastriatal transplants of fetal ventral mesencephalon. *Exp. Neurol*, 106: 1-19.

Doupe A. J, Landis S. C, Patterson P. H. 1985. Environmental influences in the development of neural crest derivatives: glucocorticoids, growth factors, and chromaffin cell plasticity. *J. Neurosci*, 5: 2119-2142.

Druker-Colín R. 1989. En: *Encyclopedia of Neuroscience*, Adelman G. (Ed.) Birkhauser Press. Suppl. 1: 133-135.

Dugan L. L, Sensi S. L, Canzoniero L. M, Handran S. D, Rothman S. M, Lin T. S. 1995. Mitochondrial production of reactive oxygen species in cortical neurons following exposure to N-methyl-D-aspartate. *J. Neurosci*, 15: 6377-6388.

- Dugan L. L, Gabrielsen J. K, Yu S. P, Lin T. S, Choi D. W. 1996. Buckminsterfullerenol free radical scavengers reduce excitotoxic and apoptotic death of cultured cortical neurons. *Neurobiol. Dis.*, 3: 129-135.
- Dugan L. L, Turetsky D. M, Du C, Lobner D, Wheeler M, Almlı C. R, Shen C. K. 1997. Carboxyfullerenes as neuroprotective agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 94: 9434-9439.
- Dunnett S. B, Björklund A, Stenevi U, Iversen S. D. 1981. Behavioural recovery following transplantation of substantia nigra in rats subjected to 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. I. Unilateral lesions. *Brain Res.* 215: 147-161.
- Dunnett S. B, Whishaw I. Q, Rogers D. C, Jones G. H. 1987. Dopamine-rich grafts ameliorate whole body motor asymmetry and sensory neglect but not independent limb use in rats with 6-OHDA lesions. *Brain Res.* 415: 63-78.
- Fisher L. J, Young S. J, Tepper J. M, Groves P. M, Gage F. H. 1991. Electrophysiological characteristics of cells within mesencephalon suspension grafts. *Neuroscience*, 40: 109-122.
- Freed W. J, Morihisa J. M, Spoor H. E, Hoffer B. J, Olson L, Seiger A, Wyatt R. J. 1981. Restoration of dopaminergic function by grafting of fetal rat substantia nigra to the caudate nucleus: long-term behavioral, biochemical and histochemical studies. *Ann. Neurol.* 8: 510-519.
- Freed W. J. 1983. Functional brain tissue transplantation: reversal of lesion - induced rotation by intraventricular substantia nigra and adrenal medulla grafts, with a note on intracranial retinal grafts. *Biol. Psychiatry*, 18: 1205-67.
- Ganong W. F. 2002. Médula y corteza suprarrenales. En: *Fisiología médica*. pp. 389-415. Manual Moderno, México.
- Garthwaite J, Charles S. L, Chess-Williams R. 1988. *Nature*, 336: 385-388.
- Gerlach M, Riederer P. 1996. Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. *J. Neural. Transm.* 103: 987-1041.
- Gorman A, McGowan A, Cotter T. G. 1997. Role of peroxide and superoxide anion during tumour cell apoptosis. *FEBS Lett.* 4004: 27-33.
- Graham D. G. 1978a. Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones. *Mol. Pharmacol.* 14: 633-643.
- Graham D. G, Tiffany S. M, Bell W. R. Jr, Gutknecht W. F. 1978b. Autoxidation versus covalent binding of quinones as the mechanism of toxicity of dopamine, 6-hydroxydopamine, and related compounds toward C1300 neuroblastoma cells *in vitro*. *Mol. Pharmacol.* 14: 644-653.

- Growdon J. H, Corkin S, Rosen T. J. 1990. Distinctive aspects of cognitive dysfunction in Parkinson's disease. *Adv. Neurol*, 53: 365-376.
- Hansen J, Gash D. M. 1994. Adrenal medulla in neural grafting and neural plasticity. *Microsc. Res. Tech*, 29: 155-160.
- Hornykiewicz O. 1966. Dopamine (3-hydroxytyramine) and brain function. *Pharmacol. Rev*, 18, 925-964.
- Hornykiewicz O. 1974. The mechanisms of action of L-DOPAmine in Parkinson's disease. *Life Sci*, 15: 1249-1259.
- Hurtig H, Joyce J, Sladek J. J, Trojanowsky J. Q. 1989. Postmortem analysis of adrenal medulla to caudate autograft in a patient with Parkinson's disease. *Ann. Neurol*, 25: 607-614.
- Ishida Y, Hashiguchi H, Todaka K, Ishizuka Y, Mitsuyama Y. 2000. Repeated administration of high dose levodopa enhances hydroxyl radical production in the rat striatum denervated with 6-hydroxydopamine. *Neurosci. Lett*, 18: 33-36.
- Jankovic J, Grossman R, Goodman C, Pirozzolo F, Schneider L, Zhu Z, Scardino P, Garber A. J, Jhingran S. G, Martin S. 1989. Clinical, biochemical and neuropathologic findings following transplantation of adrenal medulla to the caudate nucleus for treatment of Parkinson's disease. *Neurology*, 39: 1227-1234.
- Jellinger K. 1990. New developments in the pathology of Parkinson's disease. *Adv. Neurol*, 53: 1-16.
- Jenner P, Brin M. 1998. Levodopa neurotoxicity. *Neurology*, 50 (Suppl 6): S39-S43.
- Kalir H. H, Mytilineou C. 1991. Ascorbic acid in mesencephalic cultures: effects on dopaminergic neuron development. *J. Neurochem*, 57: 458-464.
- Kamat J. P, Devasagayam T. P. A, Priyadarsini K. I, Mohan H. 2000. Reactive oxygen species mediated membrane damage induced by fullerene derivatives and its possible biological implications. *Toxicology*, 155: 55-61.
- Kerr J. F, Wyllie A. H, Currie A. R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 26: 239-257.
- Kopin I. J. 1993. Parkinson's disease: past, present and future. *Neuropsychopharmacology*, 9: 1-12.
- Lai C. T, Yu P. H. 1997. Dopamine- and L-beta-3,4-dihydroxyphenylalanine hydrochloride (L-DOPA)-induced cytotoxicity towards catecholaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells. Effects of oxidative stress and antioxidative factors. *Biochem. Pharmacol*, 53: 363-372.

- Lang A. E. 2000. Surgery for Parkinson's disease. *Arch. Neurol*, 57: 1118-1125.
- Lund R. D, Hawschka S. D. 1976. Transplanted neural tissue develops connections with host rat brain. *Science*, 193: 582-584.
- Madrazo I, Drucker-Colín R, Díaz V, Martínez-Mata J, Torres C, Becerril J. J. 1987. Open microsurgical autograft of adrenal medulla to the right caudate nucleus in two patients with intractable Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med*, 316: 831-834.
- Madrazo I, Franco-Bourland R, Ostrosky-Solis F, Aguilera M, Cuevas C, Alvarez F, Magallon E, Zamorano C, Morelos A. 1990. Neural transplantation (auto-adrenal, fetal nigral and fetal adrenal) in Parkinson's disease: the Mexican experience. *Prog. Brain Res*, 82: 593-602.
- Marshall J. F. 1979. Somatosensory inattention after dopamine-depleting intracerebral 6-OHDA injections: spontaneous recovery and pharmacological control. *Brain Res*, 177: 311-324.
- Martignoni E, Blandini F, Desideri S, Pacchetti C, Mancini F, Nappi G. 1999. Peripheral markers of oxidative stress in Parkinson's disease. The role of L-DOPA. *Free Radic. Biol. Med*, 27: 428-437.
- Melamed E, Offen D, Shirvan A, Djaldetti R, Barzilai A, Ziv I. 1998. Levodopa toxicity and apoptosis. *Ann. Neurol*; 44(suppl 1):S149-S154.
- Mena MA, Pardo B, Paino CL, de Yebenes JG. 1993. Levodopa toxicity in foetal rat midbrain neurones in culture: modulation by ascorbic acid. *Neuroreport*; 4: 438-440.
- Mink J. W. 1999. Basal Ganglia. En: *Fundamental neuroscience* (M. J. Zigmond, F. E. Bloom, J. L. Roberts, S. C. Landis, L. R. Squire, Eds.), pp. 951-972. Academic Press, San Diego, EUA.
- Molinoff P. B, Axelrod J. 1971. Biochemistry of catecholamines. *Ann. Rev. Biochem*, 40: 465-500.
- Ng L. K. Y, Chase T. N, Colburn R. W, Kopin I. J. 1970. L-DOPA-induced release of cerebral monoamines. *Science*, 170: 76-77.
- Nguyen-Legros J, Harnois C, Di Paolo T, Simon A. 1993. The retinal dopamine system in Parkinson's disease. *Clin. Vision. Sci*, 8: 1-12.
- Notter M. F, Gupta M, Gash D. M. 1986. Neuronal properties of monkey adrenal medulla in vitro. *Cell Tissue Res*, 986: 69-76.
- Offen D, Ziv I, Sternin H, Melamed E, Hochman A. 1996. Prevention of dopamine-induced cell death by thiol antioxidants : possible implications for treatment of Parkinson's disease. *Exp. Neurol*, 141: 32-39.

- Olanow C. W. 1993a. A radical hypothesis for neurodegeneration. *TINS*, 11: 439-444.
- Olanow C. W. 1993b. MAO-B inhibitors in Parkinson's disease. *Adv. Neurol*, 60: 666-671.
- Olanow C. W, Kordower J. H, Freeman T. B. 1996. Fetal nigral transplantation as a therapy for Parkinson's disease. *TINS*, 19: 102-109.
- Olson L. 1970. Fluorescence histochemical evidence for axonal growth and secretion from transplanted adrenal medullary tissue. *Histochemie*, 22: 1-7.
- 23- Olson L, Seiger A, Freedman R, Hoffer B. J. 1980. Chromaffine cells can innervate brain tissue: evidence from intraocular double grafts. *Exp. Neurol*, 70: 414-426.
- Papavasiliou P. S, Cotzias G. C, Duby S. E, Steck A. J, Fehling C, Bell M. A, 1972. Levodopa in parkinsonism: potentiation of central effects with a peripheral inhibitor. *N. Engl. J. Med*, 286: 8-14.
- Pardo B, Mena M. A, Fahn S, García de Yébenes J. 1993. Ascorbic acid protects against levodopa-induced neurotoxicity on a catecholamine-rich human neuroblastoma cell line. *Mov. Disord*, 8: 278-284.
- Pardo B, Mena M. A, Casajeros M. J, Paino C. L, de Yébenes J. G. 1995. Toxic effects of L-DOPA on mesencephalic cell cultures: protection with antioxidants. *Brain Res*, 682: 133-143.
- Paxinos G, Watson C. 1998. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, San Diego, EUA.
- Picardo M, Passi S. 1997. Free radicals. En: Skin immune system (SIS). (J. D. Bos, Ed.), pp. 207-226. CRC Press, Florida, EUA.
- Pletscher A, da Prada M, Steffen H, Lutold B, Berneis K, H. 1973. Mechanisms of catecholamine accumulation in adrenal chromaffin granules. *Brain Res*, 23: 317-326.
- Puccini P, Brooks D. J, Björklund A. 1999. Dopamine release from nigral transplants visualized in vivo in a Parkinson's patient. *Nat. Neurosc*, 2: 1137-1140.
- Schimidt R. H, Inguar M, Lindvall O, Stenevi U, Björklund A. 1982. Functional activity of substantia nigra grafts reinnervating the striatum neurotransmitter metabolism and (14C) 2-deoxy-D-glucose autoradiography. *J. Neurochem*, 38: 737-748.
- Schoenberg B. S. 1987. Environmental risk factors for Parkinson's disease: The epidemiological evidence. *Can. J. Neurol. Sci*, 14: 407-413.

Schwartzman R. A, Cidlowski J. A. 1993. Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr. Rev*, 14: 133-151.

Shelton S. B, Johnson G. V. 2001. Tau and HMW Tau phosphorylation and compartmentalization in apoptotic neuronal PC12 cells. *J. Neurosci Res*, 66: 203-213.

Sian J, Youdim M. B. H, Riederer P, Gerlach M. 1999. Neurotransmitters and disorders of the basal ganglia. En: *Basic Neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects*. (G. J. Siegel, B. W. Agranoff, R. W. Albers, S. K. Fisher, M. D. Uhler, Eds.), pp. 917-948. Lippincott-Raven Publishers, New York, EUA.

Slater T, F, Sawyer B, Sträuli U. 1963. Studies on succinate-tetrazolium reductase systems. III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. *Biochim. Biophys. Acta*, 77: 383-393.

Sotelo C, Alvarado-Mallart R. M. 1991. The reconstruction of cerebellar circuits. *TINS*, 14: 50-55.

Snyder Y. E, Yoon C, Flax J. D, Macklis J. D. 1997. Multipotent neural precursors can differentiate toward replacement of neurons undergoing targeted apoptotic degeneration in adult mouse neocortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 11663-11668.

Spencer J. P, Jenner A, Aruoma O. I, Evans P. J, Kaur H, Dexter D. T, Jenner P, Lees A. J, Marsden D. C, Halliwell B. 1994. Intense oxidative DNA damage promoted by L-DOPA and its metabolites. Implications for neurodegenerative disease. *FEBS Lett*, 353: 246-250.

Struppler A, Erbel F, Velho F. 1978. An overview on the pathophysiology of Parkinsonian and other pathological tremors. *Prog. Clin. Neurophysiol*, 5: 114-128.

Suzuki Y, Ono Y, Hirabayashi Y. 1998. Rapid and specific reactive oxygen species generation via NADPH oxidase activation during Fas-mediated apoptosis. *FEBS Lett*, 425: 209-212.

Ungerstedt U. 1971. Striatal dopamine release after amphetamine or nerve degeneration revealed by rotational behavior. *Acta Physiological Scandinavia (Suppl. 367)*: 49-68.

Unsicker K. 1993. Adrenal chromaffin cells: paradigm in neural growth factor and development cell biology. *J. Anat*, 183: 207-221.

Walkinshaw G, Waters C. M. 1995. Induction of apoptosis in catecholaminergic PC12 cells by L-DOPA. Implications for the treatment of Parkinson's disease. *J Clin Invest*, 95: 2458-2464.

Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Zanin C, Vayssiere J. L, Petit P. X. 1995. Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. *J. Exp. Med*, 181: 1661-1672.

Zhang L, Zhou L, Vega-González A, Mendoza D, Drucker-Colín R. 1997. ELF magnetic fields promote neurite varicosity formation and cell excitability in cultured chromaffin cells. *Comp. Biochem. Physiol.* C118: 295-299.

Zhang L, Zhou L, Martínez-García M, Mendoza D, Drucker-Colín R. 1998. Effects of short-term and subchronical application of fullerene C₆₀ compound on guinea pig isolated myocyte electrical activity and rat chromaffin cell differentiation and proliferation. *Fullerene Science and Technology* 6: 815 - 825.

Zhang L, Castell A, Ávila E, Drucker-Colín R, Escobar A. 2000. Immunocytochemical, ultrastructural and neurochemical evidences on synaptogenesis and dopamine release of rat chromaffin cells co-cultured with striatal neurons. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 59: 170-174.

Ziv I, Melamed E, Nardi N, Luria D, Achiron A, Offen D, Barzilai A. 1994. Dopamine induces apoptosis-like cell death in cultured chick sympathetic neurons - a possible novel pathogenic mechanism in Parkinson disease. *Neurosci. Lett.* 170: 136-140.

L-DOPA-induced neurotoxic and apoptotic changes on cultured chromaffin cells

Aleph A. Corona-Morales, Andrés Castell¹ and Limei Zhang^{CA}

Departamentos de Fisiología, ¹Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF 04510, México

^{CA}Corresponding Author

Received 10 November 1999; accepted 3 December 1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Acknowledgements: This study was supported by grants IN104598 from DGAPA-UNAM and PROADU-SEP from the Mexican Government. We wish to thank Professor R. Drucker-Colin and Dr Y. López-Vidal for allowing the use of the tissue culture laboratory and ELISA reader for MTT test, F. Carbajal, B. Hernández-Téllez, M. Herrera, D. Millán for their technical assistance and Professor Philip Maini (Oxford University) for his valuable assistance in reviewing the manuscript.

Adrenal chromaffin cell (ACC) transplantation has been considered as one of the therapeutic strategies for Parkinson disease (PD). This strategy involves the administration of L-DOPA, although in reduced doses, to ACC-transplanted patients. Using cytochemical and morphological methods, we examined the effects of clinically applicable concentrations of L-DOPA on

cultured chromaffin cells. We found an increase of cell death in both necrotic and apoptotic patterns. These data suggest that therapeutic preventive measures during ACC transplantation processes for PD should be taken. *NeuroReport* 11:503-506 © 2000 Lippincott Williams & Wilkins.

Key words: Apoptosis; Chromaffin cells; L-DOPA; MTT; Neurotoxicity; Parkinson's disease; Tyrosine hydroxylase; TUNEL

INTRODUCTION

Parkinson's disease (PD) is characterized by a loss of dopamine nigrostriatal neurons. Its core symptoms (tremor, rigidity and bradykinesia) are the direct consequence of an insufficiency of transynaptic dopamine and are manifested when the striatal level of the transmitter amine is depleted by $\geq 70\%$ [1]. The origin of this neurodegeneration still remains unclear. However, it is believed that enhanced oxidative stress is a major component in the pathogenesis of nigral cell death in PD [2]. L-Dihydroxyphenylalanine (L-DOPA or levodopa), through its decarboxylation to dopamine, remains the most effective drug for symptom treatment for PD, but its neurotoxic effects have also been reported on several neural tissues. L-DOPA has the ability to generate reactive oxygen species that increase the oxidative stress (for a review see [3]).

Grafting of adrenal chromaffin cells (ACC), which undergo neuronal transdifferentiation [4] and increase their dopamine production in the presence of striatal neurons (SN) *in vitro* [5,6], has also been used as a therapeutic strategy [7,8]. The observed clinical results have been controversial and post-mortem pathological studies have shown important cell death in the transplants [9,10]. One important feature is that post-transplanted patients were continuously given L-DOPA in order to diminish the PD symptoms [11], while it is supposed that the ACC graft is trying to settle in the host brain. Therefore, we thought it of interest to study the toxic effects of L-DOPA on ACC,

which could play an important role in transplant cell death.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture: Ten-day-old male Wistar rats were very quickly beheaded and the adrenal glands removed. Medullary tissue was isolated from the glands by careful dissection and chromaffin cells were dissociated by collagenase digestion [12]. The dissociation solution used was calcium-free Spinner Salts Solution (SSS) supplemented with bovine serum albumin (1 mg/ml) plus deoxyribonuclease I (15 μ g/ml). Tissue fragments were triturated gently with a fire-polished siliconized Pasteur pipette. The resulting cell suspension was centrifuged at 800 r.p.m. for 10 min, and washed twice. Cell count was carried out using a hemocytometer. Each gland yielded nearly 200 000 cells and the cell viability was $>95\%$ as tested with trypan blue 0.4%. Cells were plated on multiwell NUNC culture plates previously coated with poly-L-lysine (mol. wt 30 000–70 000) at a density of 10^5 cells/ml in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum, 4.5 μ g/ml insulin, 100 U/ml penicillin, 100 U streptomycin and 2.5 μ g/ml fungizone. Cultures were kept in a humidified chamber at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Culture media were changed every 72 h. After 4 days in culture, cells were exposed to L-DOPA at doses of 100, 200 or 300 μ M. The following procedures were performed after 24 h of L-DOPA exposure.

MTT assay: We assessed cell viability by the reduction of the tetrazolium salt MTT into blue formazan by mitochondrial dehydrogenases [13]. Cells were seeded in 96-multiwell plates containing 100 μ l DMEM. After 24 h exposure to L-DOPA, 10 μ l of MTT stock solution (5 mg/ml in phosphate buffer saline, PBS), were added to each well. Plates were incubated for 3 h at 37°C, then this solution was discharged and the blue formazan product was solubilized with 0.04 M HCl in isopropanol. The plates were read on an ELISA reader at a wavelength of 570–630 nm to measure the optical density (o.d.).

Immunocytochemistry and morphological analysis: ACC cultures were examined morphologically by immunocytochemistry (avidin–biotin–peroxidase method) to determine the density of tyrosine hydroxylase (TH)-positive cells in the different experimental groups. The following chemicals were used: rabbit anti-TH antibody (1:2000, Chemicon), biotinylated goat anti-rabbit IgG (ICN) and a complex avidin–biotin–peroxidase system (ICN). The detailed procedure has been described elsewhere [6]. For the morphological quantitative study, TH-positive cells from six ACC cultures were evaluated using a microscopy with an ocular grid, calibrated with a micrometer and with a $\times 40$ objective. Ten fields of each culture were randomly chosen and positively stained cells were counted.

Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end-labeling (TUNEL): The cultures were fixed in 4% paraformaldehyde in 0.1 M PBS pH 7.4 for 10 min, then washed with Tris buffer saline (TBS). Cells were incubated for 5 min with 2 mg/ml proteinase K 1:100 in 10 mM Tris pH 8.0 at room temperature and then rinsed with TBS three times for 5 min each. Endogenous peroxidase was inactivated by covering the cultures with 3% H₂O₂ for 5 min at room temperature. Cells were washed with TBS and pre-incubated in TdT equilibration buffer (1:5 with dH₂O) for 10–30 min at room temperature, followed by addition of TdT (3 μ l TdT in 57 μ l TdT labelling reaction mix) at 37°C for 1.5 h. The reaction was stopped by rinsing with TBS once and with stop buffer (0.5 M EDTA, pH 8) for 5 min at room temperature. After this, cells were incubated with blocking buffer (4% BSA in PBS) for 10 min at room temperature and then with peroxidase–streptavidin conjugate diluted with blocking buffer (1:50) in a humidified chamber for 30 min at room temperature. Samples were rinsed in TBS and incubated with DAB solution at room temperature for 10–15 min. Finally, cultures were washed with dH₂O, counterstained with methyl green for 5 min at room temperature and mounted on a glass coverslip.

Statistical analysis: The Student–Newman–Keuls test was used for statistical analysis of the experimental data using GraphPad InStat (GraphPad software, V 2.05).

RESULTS

We observed a dose-dependent negative effect produced by L-DOPA exposure on ACC culture survival utilizing both MTT test and immuno-positive cell counting. Figure 1A shows a remarkable, dose-dependent reduction in MTT conversion, reflecting reduction of total number of surviv-

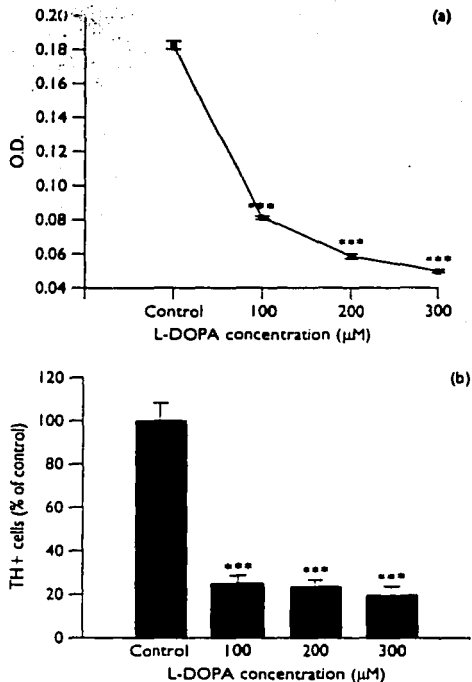


Fig. 1. Effect of L-DOPA on cultured chromaffin cells after 4 days of treatment. (a) Viability estimated by MTT assay. (b) Percentage of TH positive survival at the different treatments. ***Significantly different from control, $p < 0.001$.

ing cells. The experimental groups exposed to L-DOPA at doses of 100, 200 or 300 μ M had the following percentage of survival: 44.32%, 32.14% and 27.20% respectively, which were significantly different ($p < 0.01$) from the control (100%). The TH-positive cell densities of the three experimental groups were significantly reduced to 24.50%, 22.96% and 19.60% with of control (Fig. 1B).

It was evident that some chromaffin cells identified by TH-immunostaining died by necrosis which presented membrane rupture, formation of cytoplasmic vacuoles and picnotic nuclei (Fig. 2B). Other chromaffin cells from the L-DOPA treated cultures showed morphological characteristics related to apoptosis, such as cytoplasmic shrinkage and nuclear fragmentation (Fig. 2C), and intra- and extracellular chromatin fragments that represent micronuclei (Fig. 2A).

In order to confirm the presence of the apoptotic cell death which occurred in chromaffin cell cultures exposed to L-DOPA, TUNEL staining was performed. Sensitive and specific reaction was observed in cells showing typical apoptotic morphology (Fig. 3). However, some necrotic cells were identified by the presence of cytoplasmic vacuoles which were negative to TUNEL nucleus staining.

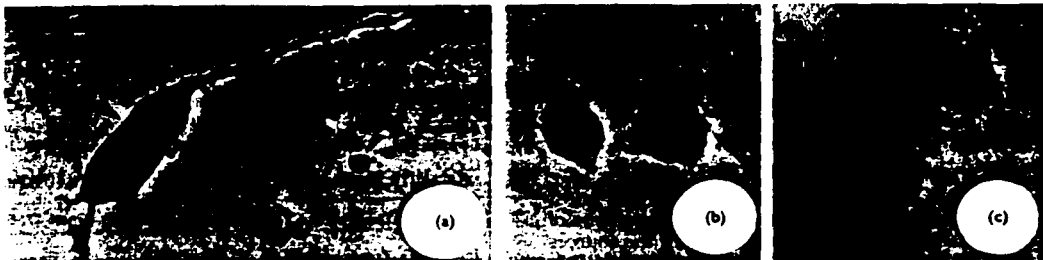


Fig. 2. Photomicrographs of TH immunoreactive ACC treated with L-DOPA. (a) Normal chromaffin cell (arrow) and two micronuclei (arrowheads). (b) Necrotic chromaffin cells with plasmatic membrane rupture and formation of numerous vacuoles. (c) Chromaffin cells with nuclear fragmentation. Counterstained with haematoxylin. Magnification: $\times 380$.

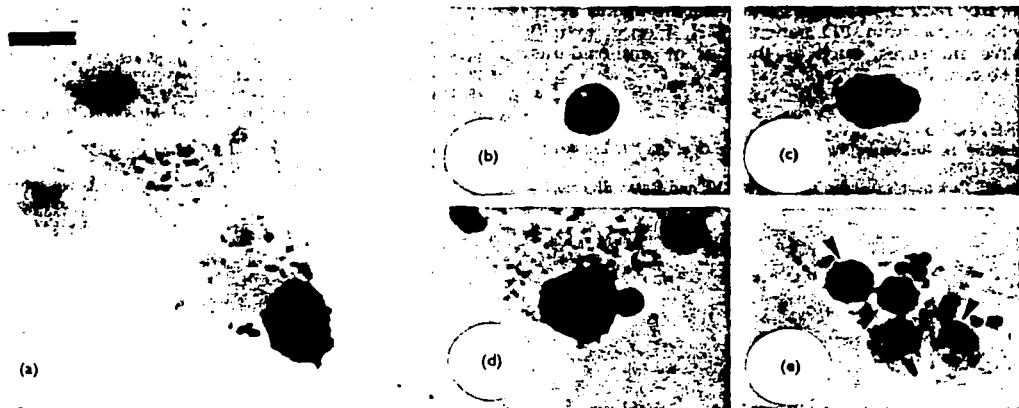


Fig. 3. TUNEL staining showing apoptotic changes induced by L-DOPA. (a) Normal nuclei (counterstained with methyl green) and a TUNEL-positive nucleus with DNA fragmentation (brown) characteristic of early apoptosis. (b,c) Chromatin condensation with peripheral crescent pattern in apoptotic cells. (d) Nuclear blebbing which results in a nuclear fragmentation. (e) Apoptotic bodies (arrowheads). Magnification: $\times 960$.

DISCUSSION

For decades, L-DOPA has been the most frequently used treatment for controlling the symptoms of PD. Although its toxicity has been studied in several cell culture systems [14–16], the toxic effects on adrenal chromaffin cells have not been previously reported. Because adrenal medullary tissue has been used as transplant material in PD treatment [7–11] it was of interest to determine these toxic effects. The main findings of these experiments were that on applying clinically used doses of L-DOPA to cultured chromaffin cells, ACC survival was remarkably decreased and by morphological studies, both necrotic and apoptotic cell death were detected. It is well known that auto-oxidation of L-DOPA generates a large variety of cytotoxic free radicals including hydroxyl and superoxide radicals, semiquinones, quinones and H_2O_2 [3,17]. When free radical production exceeds the defence mechanisms, such as catalase, glutathione peroxidase, superoxide dismutase, cells can suffer irretrievable damage [2].

We observed a greater decrease in cell survival using the TH-positive cell counting than by the MTT method (24.5% vs 44%) at 100 μM . This difference implies that the ACC were more susceptible to L-DOPA toxicity than other cell types in that culture, since the MTT test assays the survival of all cell populations, including fibroblasts and some adrenal cortical cells. This enhanced susceptibility of ACC to the L-DOPA could be due to its ability to enzymatically oxidise DA, which results in increased production of free radicals [18].

There is also evidence that L-DOPA can induce programmed cell death in neuronal and non-neuronal cultures [19,20]. In those studies, L-DOPA-induced apoptosis was inhibited by antioxidants, implying that this phenomenon could be due to the increased oxidative stress produced by auto-oxidation of L-DOPA. In our experiments, we observed both necrotic and apoptotic morphological changes after exposure to the drug. With all experimental concentrations we tested, the drug produced typical apoptotic

patterns: condensation and margination of chromatin with cell shrinkage, nuclear fragmentation and separation of the cellular contents into membrane-bounded apoptotic bodies [21]. Experiments, both *in vitro* and *in vivo*, aimed at finding suitable anti-oxidants for adrenal chromaffin cells are currently being carried out.

CONCLUSION

This report presents evidence that L-DOPA, the most commonly prescribed drug for alleviating the symptoms of PD, is toxic to adrenal chromaffin cells, one of the sources for PD treatment by transplantation. This toxicity, probably yielded by oxidative stress, is mediated by both necrotic and apoptotic processes. These data suggest the continuing prescription of this drug to ACC transplanted PD patients, could be one of the responsible factors of the low success rate of the ACC survival, since there are significantly lower levels of free radical scavengers and reducing agents in the substantia nigra from PD patients [22]. Hence, toxicity preventive measures, such as the use of anti-oxidants, should be considered.

REFERENCES

1. Bernheimer H, Birkmayer W, Hornykiewicz O *et al.* *J Neurol Sci* 20, 415-455 (1973).
2. Burke RE. Parkinson's disease. In: Koliatsos VE and Ratan RR eds. *Cell*

Death and Disease of The Nervous System. New Jersey: Humana Press, 1999: 459-475.

3. Jenner PG and Brin MF. *Neurology* 50 (suppl 6), S39-S43 (1998).
4. Chalmers GR, Fisher LJ, Nijijima K, *et al.* *Exp Neurol* 133, 32-42 (1986).
5. Zhang L, Blanco C, Escobar A *et al.* *Arch Pharm* 358 (suppl 2), R558 (1998).
6. Zhang L, Castell A, Avila ME *et al.* *J Neuropathol Exp. Neurol* (in press).
7. Backlund EO, Granberg PO, Hamberger B *et al.* *J Neurosurg* 62, 169-173 (1985).
8. Madrazo I, Drucker-Colin R, Diaz V *et al.* *N Engl J Med* 316, 831-834 (1987).
9. Hirsch EC, Duychaerts C, Jovoy-Agud F *et al.* *Ann Neurol* 27, 676-682 (1990).
10. Lindvall O. *Trends Neurosci* 14, 379-384 (1991).
11. Drucker-Colin R, Verdugo-Diaz L, Morgado-Valle C *et al.* *Arch Med Res* 30, 33-39 (1999).
12. Waymire JC, Bennet F, Boehme R *et al.* *J Neurosci Methods* 7, 329-351 (1983).
13. McGahon AJ, Martin SJ, Bissonnette RP *et al.* The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis *in vitro*. In: Schwartz LM and Osborne BA, eds. *Cell Death*. San Diego: Academic Press, 153-185.
14. Lai C and Yu PH. *Biochem Pharmacol* 53, 363-372 (1997).
15. Mena MA, Pardo B, Paino CL *et al.* *NeuroReport* 4, 438-440 (1993).
16. Spencer J, Jenner A, Aruoma OI *et al.* *FEBS Lett* 353, 246-250 (1994).
17. Graham DG. *Mol Pharmacol* 14, 633-643 (1978).
18. Olanow CV. *Trends Neurosci* 16, 439-444 (1993).
19. Ziv I, Zilkha-Falb R, Offen D *et al.* *Movement Disorders* 12, 17-23 (1997).
20. Walkinshaw G and Waters CM. *J Clin Invest* 95, 2458-2464 (1995).
21. Stewart B. *J Natl Cancer Inst* 86, 1286-1295 (1994).
22. Pery TL, Godin DV and Hansen S. *Neurosci Lett* 33, 305-310 (1982).

Fullerene C₆₀ and Ascorbic Acid Protect Cultured Chromaffin Cells Against Levodopa Toxicity

Aleph A. Corona-Morales,¹ Andrés Castell,² Alfonso Escobar,³ René Drucker-Colín,⁴ and Limei Zhang^{1*}

¹Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México,

México D.F., México

²Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de

México, México D.F., México

³Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México

⁴Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México,

México D.F., México

Adrenal chromaffin cell (ACC) transplants, alone or combined with levodopa treatment, were used in attempted therapy for Parkinson's disease (PD). In a previous study, we demonstrated that levodopa caused chromaffin cell death either by necrosis or by apoptosis in cell culture. Here we report the beneficial effect of a water-soluble derivative of fullerene C₆₀ (a novel molecule with potent antioxidant properties) and of ascorbic acid when applied to chromaffin cell cultures exposed to levodopa. Both antioxidants remarkably increase the ACC survival and prevent cell death, including apoptosis. Although ACC transplants are not currently considered as an option for PD treatment, these observations should help in exploring the possibilities of preventing the neurotoxicity generated by levodopa and in envisaging new strategies for PD treatment by combining the clinical use of levodopa and potent antioxidants. Chemical properties of fullerene related to biological uses are discussed.

© 2002 Wiley-Liss, Inc.

Key words: neurotoxicity; apoptosis; Parkinson's disease; tyrosine hydroxylase, TUNEL

Adrenal chromaffin cells (ACC) are members of the neural crest-derived sympathoadrenal lineage, postganglionic sympathetic neurons that have lost their cytoplasmic projections during development and become secretory cells, mainly releasing epinephrine (EP) and norepinephrine (NE) into the blood vessels (Ganong, 2001). The ACCs also possess the biochemical machinery to produce and release dopamine (DA), and, under certain circumstances, the DA production could exceed the EP and NE production (Zhang et al., 2000). Transplantation of adult ACC had been used as a therapeutic approach for Parkinson's disease (PD) in an effort to restore the DA deficit in the neostriatum resulting from dopaminergic neuron death in the compact zone of the substantia nigra (SN) and

the secondary degeneration of the nigrostriatal pathway (Lang, 2000; Dunnett et al., 2001).

Recently, we observed enhanced DA release from ACC in striatal neurons and ACC cocultures and reported immunocytochemical and ultrastructural evidence of synaptogenesis between both types of cells (Zhang et al., 2000). However, there were clear-cut differences in the clinical results of ACC transplantation (Madrazo et al., 1987; Hirsch et al., 1990; Lang, 2000). Most of the pathologic evidence showed little chromaffin cell survival, probably because of the complex interactions between graft tissue and neurotrophic factors, inflammatory cytokines, host brain immune response, and exogenous pharmacological agents.

In recent years, there has been a growing acceptance of the hypothesis that oxidative stress contributes to the underlying degeneration of nigral dopaminergic neurons in PD (Blum et al., 2001). It is well known that L-dihydroxyphenylalanine (levodopa; L-DOPA), the most important drug for the treatment of PD, by itself or by means of its dopamine metabolite, can induce oxidative stress (Graham et al., 1978; Graham, 1978; Jenner and Brin, 1998). Therefore, the clinical use of levodopa is a subject of concern in ACC-transplanted patients, insofar as it might contribute to the poor ACC graft survival. Recently, we have demonstrated that levodopa induces chro-

Contract grant sponsor: DGAPA-UNAM; Contract grant number: IN104598; Contract grant number: IN200300; Contract grant number: PROADU-SEP-2000-09-001-011; Contract grant sponsor: Mexican Government.

AQ: 2

*Correspondence to: Dr. Limei Zhang, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México 04501 D.F., México. E-mail: limei@servidor.unam.mx

Received 10 June 2002; Revised 1 August 2002; Accepted 5 August 2002

Published online 00 Month 2002 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/jnr.10456

maffin cell death by necrosis and/or apoptosis in cell culture (Corona-Morales et al., 2000). Therefore, it is of interest to determine whether this levodopa-induced ACC death could be counteracted by antioxidants.

Nanospheres of carbon, known as fullerenes (C_{60} , C_{70} , C_{80} , ... C_{200}), have attracted attention regarding their biological properties since their discovery in 1985 (Kroto et al., 1985), and there has been increasing interest in their possible application in biomedicine. Carboxyfullerenes are polar derivatives of C_{60} , the smallest fullerene molecule, with a diameter of 7 Å, and reportedly possess the ability to enter lipid membranes, working as potent neuroprotective agents that scavenge free radicals and inhibit cell death from oxidative stress (Dugan et al., 2001). In an earlier study (Zhang et al., 1998), we found that Fullerenes exert no toxic effect on ACC cultures, although more recent work shows a surprising photoinduced oxidative membrane damage (Kamat et al., 2000).

We have examined the effects of combined application of carboxylfullerene with clinically applicable doses of levodopa to determine the ACC survival rates and cell death after exposure to these chemicals. Results were compared with the combined application of levodopa with ascorbic acid (AA), a water-soluble vitamin widely used as an antioxidant agent (Krisinsky, 1992).

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture

The ACCs were obtained from 3-day-old Wistar rats and were cultured according to methods previously described (Corona-Morales et al., 2000). Animals were treated in accordance with the standards put forth in the NIH *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. In brief, chromaffin cells were isolated from adrenal medullae and dissociated by collagenase digestion (CLS-1; Worthington, Freehold, NJ). Cells were plated on four-well Nunc culture plates with plastic coverslips (Terninox 13 mm round; Nunc, Inc., Naperville, IL). The cell plating density was 250,000 cells per well containing 250 μ l of culture medium—Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco, Grand Island, NY) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS; Gibco), 4.5 μ g/ml insulin, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, and 0.25 μ g amphotericin B as antimycotic (Sigma, St. Louis, MO). Cultures were kept in a humidified incubator at 37°C in a 5% CO_2 atmosphere. Culture media were changed every 72 hr.

Drug Application

Drugs were applied on the tenth day of culture over 4 hr (time interval determined by the experiment represented in Fig. 4). Levodopa and AA were purchased from Sigma, and Tris(dicarboxymethylene)fullerene- C_3 (C_{60}) was provided by Alexis Bio-Chemicals (San Diego, CA). For determination of chromaffin cell densities, two experimental groups were separated: a control group and a group with 50 μ M levodopa. This dose was chosen taking into account the reported clinically applicable concentrations, between 25 and 100 μ M (Walkinshaw and Waters, 1995). Each group was further divided into three subgroups: without antioxidant, with 200 μ M AA (Pardo

et al., 1993), and with 100 μ M C_{60} (Dugan et al., 1996). The application of antioxidant was immediately followed by the application of levodopa using a temporal interval of less than 1 min. To examine the effects of these two antioxidant drugs on the levodopa toxicity concerning apoptotic nucleus formation, 50 μ M levodopa was applied together with 200 μ M AA or 100 μ M C_{60} in the same time pattern described above. For determination of the temporal process of apoptotic nucleus formation, 300 μ M levodopa was applied to each well. The reaction was stopped by washing and fixing the sample at different time intervals for further enzymatic histochemistry testing.

Apoptosis Detection

For apoptosis detection, a terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end-labeling (TUNEL) assay (Promega, Madison, WI) was carried out. ACC cultures on glass coverslips treated with different drug schemes were fixed with 4% paraformaldehyde (Merck, Darmstadt, Germany) in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) at room temperature (RT) for 20 min. After fixation, cultures were rinsed twice with Tris-buffered saline (TBS); incubated with 2 mg/ml of proteinase K diluted 1:1,000 in 10 mM Tris buffer, pH 8, for 5 min at RT; and washed three times with TBS for 5 min each. After incubation with 3% H_2O_2 for 10 min at RT and rinsing with TBS, cultures were preincubated with terminal deoxynucleotidyl transferase equilibration buffer (TdT buffer) for 30 min at RT, followed by incubation with a TdT mix reaction (3 μ l of TdT enzyme and 57 μ l of TdT buffer containing biotinylated deoxynucleotides) for 1.5 hr at 37°C. The reaction was stopped by rinsing once with TBS, and then with 0.5 M EDTA, pH 8, for 5 min at RT. After this procedure, cultures were rinsed with blocking buffer [4% bovine serum albumin in phosphate-buffered saline (PBS)] for 10 min at RT and incubated with streptavidin-peroxidase conjugate in a humidified chamber for 1 hr at 37°C. Finally, the cultures were rinsed with PBS, and the activity of peroxidase was visualized by incubating the cultures with diaminobenzidine (DAB) solution [5 μ g of 3,3'-diaminobenzidine (Sigma) in 10 ml of 0.5 M Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing 0.01% H_2O_2] for 5 min at RT. Cultures were counterstained with methyl green for 5 min and mounted with synthetic resin on glass slides.

Double Staining for Tyrosine Hydroxylase Immunoreactivity and Apoptosis

ACC cultures treated with different drug schemes were processed for apoptosis detection assay as described above. Nuclei of apoptotic cells were visualized with DAB. After apoptosis assay, cultures were rinsed three times with PBS, incubated with 3% H_2O_2 for 10 min to block residual peroxidase activity, rinsed twice with PBS, and blocked with 20% normal goat serum (NGS; Zymed, South San Francisco, CA) and 0.1% Triton X-100 in PBS (Sigma). Cultures were incubated overnight with rabbit anti-tyrosine hydroxylase (TH) antibody (1:2,000; Chemicon, Temecula, CA) at 4°C in PBS with 0.1% Triton X-100 (PBS-T) plus 1% NGS. After being rinsed several times with PBS-T, cells were incubated with biotinylated goat anti-rabbit IgG (ICN Biochemical, Costa Mesa, CA) for 1 hr at 37°C, washed with PBS, and treated with streptavidin-

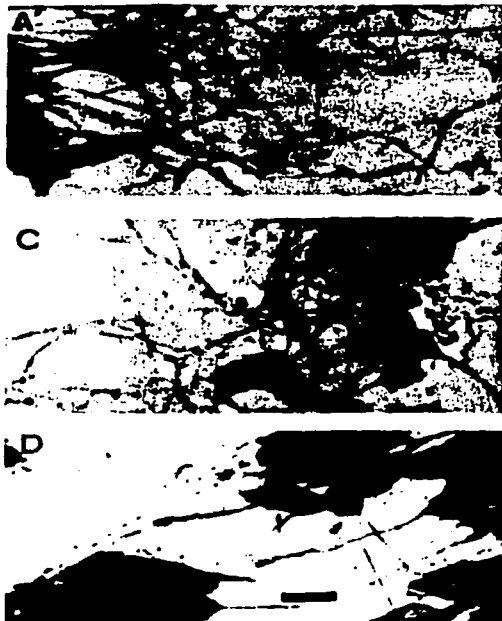


Fig. 1. Double staining for TH and apoptosis in ACC cultures. Nuclei of apoptotic cells were observed to be dark brown (DAB) and normal nuclei were observed to be clear in TH-positive (red) cells. A: ACC control culture showing cells with an extensive neurite outgrowth pattern and clear nuclei. In contrast (B), ACC treated only with 50 μ M L-DOPA for 4 hr showed a cluster of rounded cells loosing their



extended neurites. The presence of apoptotic nuclei is indicated by arrowheads. Asterisk indicates a TH⁺ cell expelling a nuclear fragment. In C (50 μ M L-DOPA plus μ M C₆₀ 100 for 4 hr) and D (50 μ M L-DOPA plus 200 μ M AA for 4 hr), ACC showed patterns similar to those of the cells shown in A (arrows). Scale bar = 20 μ m.

peroxidase conjugate (ICN Biochemical). Peroxidase activity was visualized by incubating the samples with 3-amino-ethyl carbazol solution [20 mg of carbazol (Sigma), 0.5 ml of dimethylformamide (Sigma), 9.5 ml of 0.5 M acetate buffer, pH 5, and 3 drops of 3% H₂O₂] as a chromogen for 10 min at R.T. Cultures were rinsed several times with distilled water and mounted with glycerin jelly on glass slides. There was no counterstaining with anilines, so nuclei of apoptotic cells were observed dark (DAB), and normal nuclei were observed clear in TH-positive (red) cells.

Data Analysis

Ten fields from each specimen were randomly chosen, and the positively stained cells/nuclei/apoptotic bodies were counted from each experiment. Statistical analysis (Student-Newman-Keuls test) and graph processing were performed with GraphPad InStar 2.05 and Microsoft Excel 2000. Data are presented as means \pm standard error of the mean (SEM).

RESULTS

ACC in the control groups showed typical neuronal morphologies with extensive neurite outgrowth after

10 days under culture conditions (Fig. 1A). In the group F1 treated with 50 μ M levodopa alone, brief exposure to the drug of 4 hr was enough to produce remarkable cell damage, which included neurite retraction and formation of apoptotic nuclei as shown in Figure 2B. In contrast, in F2 the groups treated with levodopa in combination with either carboxyfullerene or AA, the neuronal morphologies appeared to be well preserved (Fig. 1C,D). TH-positive cell densities in different experimental groups are shown in Figure 2. In the group undergoing levodopa application without antioxidant, the decrease of TH⁺ ACCs was significantly different from that in all other groups, whereas, in the groups undergoing combined application of levodopa plus AA/C₆₀, there were no significant differences in TH⁺ ACCs densities from the control.

Figure 3 shows some typical apoptotic features revealed F3 by TUNEL staining in cultures treated with levodopa. These morphological characteristics include DNA fragmentation, shrinking nucleus, nuclear blebbing resulting in nuclear fragmentation, chromatin condensation with a crescent moon pattern, and presence of apoptotic bodies.

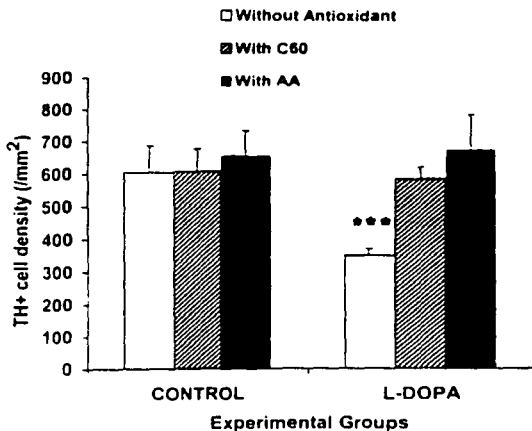


Fig. 2. TH-immunoreacted cell densities in different experimental groups: control groups and groups treated with 50 μM levodopa. Combined applications are indicated by hatched bars (with 100 μM of carboxyfullerene) and solid bars (with 200 μM of ascorbic acid); open bars indicate no antioxidants. ***Significantly different from control (Student-Newman-Keuls test) at $P < 0.001$ ($n = 10$).

The time course of apoptosis formation as a function of the levodopa exposure time is shown in Figure 3. The increase in TUNEL-stained nuclei began to show significance within 1 hr of levodopa exposure and reached the maximal level after 4 hr of exposure. These results indicate that the presence of levodopa in the culture medium triggers almost immediately apoptotic processes on ACC.

The results from experiments detecting apoptotic formation indicate that the densities of apoptotic nuclei are related to the drug application scheme and that they are inversely correlated with the TH⁺ cell densities. A dose of 50 μM levodopa produced a density of apoptotic nuclei of 232.84 ± 24.7 (TUNEL⁺ bodies per mm^2 ; $n = 10$). For the two groups with combined application of levodopa (50 μM) plus C₆₀ (100 μM) or plus AA (200 μM), we found only 93.14 ± 5.85 (TUNEL⁺ bodies per mm^2) and 88.23 ± 18.8 (TUNEL⁺ bodies per mm^2), respectively. These findings confirm that the addition of antioxidant agents counteracts the deleterious effect exerted by levodopa on the cultured ACC. Groups treated with AA or C₆₀ showed no significant differences from the control (Fig. 5).

DISCUSSION

Toxicity of both L-DOPA and DA has been extensively demonstrated in catecholaminergic cells in vitro, where they can suffer autoxidation with the consequent production of reactive oxygen species (ROS), semiquinones, and quinones that cause cell damage, resulting in necrotic and apoptotic death. However, levodopa is able

to exert toxicity by itself, and DA formation is not required, because the inhibition of aromatic amino acid decarboxylase does not prevent cell toxicity (Han et al., 1996; Masserano et al., 1996; Basma et al., 1995; Jenner and Brin, 1998). On the other hand, AA protects cells in vitro against levodopa toxicity by preventing formation and/or removal of free radicals (Pardo et al., 1993). Similarly, water-soluble carboxylic C₆₀ compounds have been demonstrated to possess strong antioxidant potential and to exert neuroprotection against excitotoxic and apoptotic death of cultured cortical neurons (Dugan et al., 1996) and in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis (Dugan et al., 1997). Our findings show that the levodopa-induced ACC survival reduction is avoided by both antioxidant agents. The increase in TH⁺ cell density correlates with the decrease in cellular apoptosis. The graph shown in Figure 5 clearly depicts the protective effect of carboxyfullerene on tissue culture, maintaining integrity of ACC against the increased rate of apoptosis induced by levodopa. The association of levodopa plus carboxyfullerene immediately decreases the levodopa-induced apoptosis, similarly to the protective effect of AA.

The results of the present in vitro study suggest that striatal grafted ACC may not survive levodopa given in the immediate posttransplant period without the help of effective antioxidant agents. This is supported by observations showing that fetal SN grafts do not survive the cytotoxicity of oxidative stress generated by levodopa and its metabolites in vivo (Yurek et al., 1991).

Although the carboxyfullerene C₆₀ used in this study has been reported to be an unusually potent scavenger of ROS in solution (Dugan et al., 1997), the absence of systematic studies demonstrating its viability for human use and its cost make it difficult to use as a therapeutic agent at present. However, this study opens the possibility of studying fullerene compounds as pharmacological agents with potent antioxidant properties.

There are recent reports (Ajayan et al., 2002) that similar fullerene compounds react explosively when exposed to potent sources of light in an oxygen-rich atmosphere. This means that these forms of carbon are ready to take oxygen and burn, because of the dramatic conditions in which they are synthesized. This might explain the photoinduced damage by fullerenes reported elsewhere. However, spherical fullerenes and C₆₀ do not show this curious photoinduced ignition. This means only that, at present, there is much to be learned about the chemistry of these peculiar molecules, and their extreme oxidative powers could be used in therapy in many different ways once this knowledge is mastered. Systematic experiments like that presented here should be extremely useful for that purpose.

In conclusion, carboxyfullerene administered immediately after levodopa treatment efficiently avoids ACC death in vitro induced by levodopa, the drug of choice for PD patients. The ability of carboxyfullerene to circumvent the cell death caused by oxidative stress is as strong as that of AA, a well-established and widely used water-soluble antioxidant. Thus, the results reported here provide new

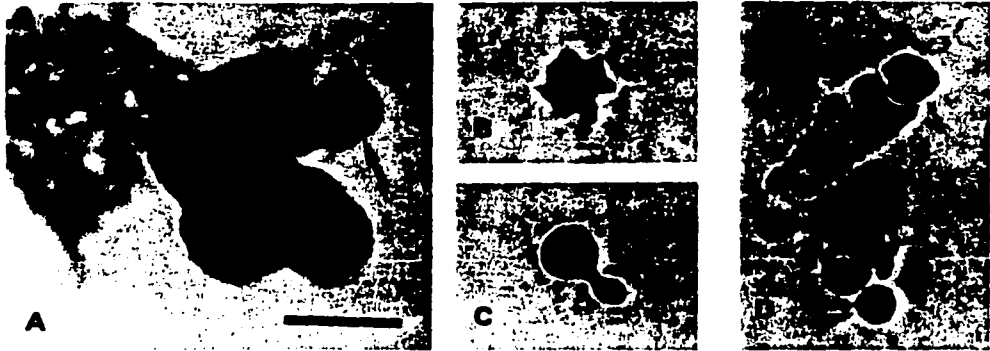


Fig. 3. TUNEL staining of ACC showing typical apoptosis features, such as DNA fragmentation (A): the apoptotic nucleus is indicated with an arrow, and normal nuclei are counterstained with methyl green; shrinking nucleus (B); nuclear blebbing resulting in nuclear fragmentation (C); and chromatin condensation with crescent moon pattern (D; arrow) and apoptotic bodies (arrowheads).

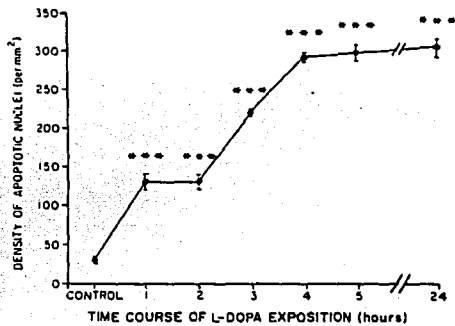


Fig. 4. Temporal apoptotic formations in ACC cultures with 300 μ M levodopa application. ***Significantly different from control at $P < 0.001$ ($n = 12$).

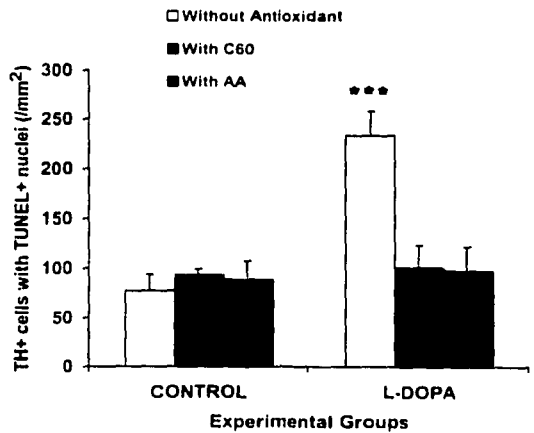


Fig. 5. Apoptotic nuclei density in different experimental groups: control groups and groups treated with levodopa (50 μ M). Hatched bars indicate groups with 100 μ M carboxyfullerene, and solid bars indicate groups with 200 μ M ascorbic acid; open bars indicate no antioxidants. ***Significantly different from all other groups at $P < 0.001$ ($n = 12$).

insights into the basic properties and interactions with other elements of fullerene C₆₀ and its derivatives as well as their potential application in biomedicine. Further studies in animal models, especially in vivo, are needed to determine the neuroprotective mechanism and the possible toxicity before therapeutic applications should be generally considered. Anatomical and functional analysis of the effects of application of C₆₀ and AA in hemiparkinsonian rat ACC transplanted with and without levodopa treatment is currently being carried out.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to F. Pasos, B. Hernández-Téllez, and M.E. Ávila for their technical assistance; Prof. R.A. Barrio (Instituto de Física, UNAM) for useful comments;

and Prof. Dr. Milton Ettinger, Director of the Minnesota Regional Sleep Disorder Center (Hennepin County Medical Center, Minneapolis, MN) for his most valuable help in reviewing the manuscript.

REFERENCES

Ajayan PM, Terrones M, de la Guardia A, Huc V, Grobert N, Wei BQ, Lezec H, Ramanath G, Ebbesen TW. 2002. Nanotubes in a flash ignition and reconstruction. Science 296:705.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

- Basma AN, Morris EJ, Niclas WJ, Gella HM. 1995. L-DOPA cytotoxicity to PC 12 cells in culture is via its auto-oxidation. *J Neurochem* 64:825-832.
- Blum D, Torch S, Lambeng N, Nissou M, Benabid AL, Sadoul R, Verna JM. 2001. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Progr Neurobiol* 65:135-172.
- Corona-Morales AA, Castell A, Zhang L. 2000. L-DOPA-induced neurotoxic and apoptotic changes on cultured chromaffin cells. *Neuroreport* 11:503-506.
- Dugan LL, Gabrielsen JK, Yu SP, Lin TS, Choi DW. 1996. Buckminsterfullerene free radical scavengers reduce excitotoxic and apoptotic death of cultured cortical neurons. *Neurobiol Dis* 3:129-135.
- Dugan LL, Turensky DM, Du C, Lobner D, Wheeler M, Almi CR, Shen CK, Luh TY, Choi DW, Lin TS. 1997. Carboxyfullerenes as neuroprotective agents. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:9434-9439.
- Dugan LL, Lovett EG, Quick KL, Lotharius J, Lin TT, O'Malley KL. 2001. Fullerene-based antioxidants and neurodegenerative disorders. *Parkinsonism Rel Disord* 7:243-246.
- Dunnett SB, Bjorklund A, Lindvall O. 2001. Cell therapy in Parkinson's disease—stop or go? *Nat Rev Neurosci* 2:365-369.
- Ganong WF. 2001. Review of medical physiology, 20th ed. San Francisco: McGraw-Hill, p 346-348.
- Graham DG. 1978. Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones. *Mol Pharmacol* 14:633-643.
- Graham DG, Fitzany SM, Bell WR Jr, Gutknecht WF. 1978. Autoxidation versus covalent binding of quinones as the mechanism of toxicity of dopamine, 6-hydroxydopamine, and related compounds toward C1300 neuroblastoma cells in vitro. *Mol Pharmacol* 14:644-653.
- Han SK, Mvithneou C, Cohen G. 1996. L-DOPA up-regulates glutathione and protects mesencephalic culture against oxidative stress. *J Neurochem* 66:501-510.
- Hirsch EC, Duyckaerts C, Javoy-Agid F, Hauw JJ, Agid Y. 1990. Does adrenal graft enhance recovery of dopaminergic neurons in Parkinson's disease? *Ann Neurol* 27:676-682.
- Lang AE. 2000. Surgery for Parkinson disease: a critical evaluation of the state of the art. *Arch Neurol* 57:1118-1125.
- Jenner PG, Brin MF. 1998. Levodopa neurotoxicity: experimental studies versus clinical relevance. *Neurology* 50(Suppl 6):S39-S43.
- Kamat JP, Devasagayam TPA, Priyadarini KI, Mohan H. 2000. Reactive oxygen species mediated membrane damage induced by fullerene derivatives and its possible biological implications. *Toxicology* 153:55-61.
- Krinsky NI. 1992. Mechanism of action of biological antioxidants. *Proc Soc Exp Biol Med* 200:248-254.
- Kroto HW, Heath JR, O'Brien SC, Curl RF, Smalley RE. 1985. C₆₀ Buckminsterfullerene. *Nature* 318:162-163.
- Madrazo I, Drucker-Colin R, Diaz V, Martinez-Mata J, Torres C, Becerril JJ. 1987. Open microsurgical autograft of adrenal medulla to the right caudate nucleus in two patients with intractable Parkinson's disease. *N Engl J Med* 316:831-34.
- Masserano JM, Gong L, Kulaga H, Backer I, Wyatt RJ. 1996. Dopamine induces apoptotic cell death of a catecholaminergic cell line derived from the central nervous system. *Mol Pharmacol* 50:1309-1315.
- Pardo B, Mena MA, Casajeros MJ, Paino CL, De Tebenes JG. 1993. Toxic effects of L-DOPA on mesencephalic cell cultures: protection with antioxidants. *Brain Res* 682:133-143.
- Walkinshaw G, Waters CM. 1995. Induction of apoptosis in catecholaminergic PC12 cells by L-DOPA. Implications for the treatment of Parkinson's disease. *J Clin Invest* 95:2458-2464.
- Yurek DM, Steece-Collier K, Collier TJ, Sladek JR Jr. 1991. Chronic levodopa impairs the recovery of dopamine agonist-induced rotational behavior following neural grafting. *Exp Brain Res* 86:97-107.
- Zhang L, Zhou L, Martinez-Garcia M, Mendoza D, Drucker-Colin R. 1998. Effects of short-term and subchronical application of fullerene C₆₀ compound on guinea pig isolated myocyte electrical activity and rat chromaffin cell differentiation and proliferation. *Fullerene Sci Technol* 6:815-825.
- Zhang L, Castell A, Ávila ME, Drucker-Colin R, Escobar A. 2000. Immunocytochemical, ultrastructural and neurochemical evidences on synaptogenesis and dopamine release of rat chromaffin cells co-cultured with striatal neurons. *J Neuropathol Exp Neurol* 59:170-174.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN