

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**Caracterización del efecto de la dopamina y su metabolismo  
sobre el estrés oxidativo en el estriado**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

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

**MA. NIEVES HERRERA MUNDO**

**DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARÍA SITGES BERRONDO**

**COMITÉ TUTOR: DR. EMILIO ROJAS DEL CASTILLO  
DR. JULIO MORÁN ANDRADE**

**Diciembre 2011**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

LA PRESENTE TESIS SE REALIZÓ EN EL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y FISIOLÓGIA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, BAJO LA TUTORÍA DE LA DRA. MARÍA SITGES BERRONDO

ESTE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN FUE FINANCIADO POR EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACyT)

## AGRADECIMIENTOS

AGRADEZCO A LA DRA. MARÍA SITGES BERRONDO POR PERMITIRME REALIZAR MIS ESTUDIOS DE DOCTORADO BAJO SU DIRECCIÓN, POR TODO SU APOYO Y CONSEJOS A LO LARGO DE ESTA ETAPA Y SOBRE TODO POR CONFIAR EN MÍ PARA LA REALIZACIÓN DE ESTE PROYECTO.

AL DR. EMILIO ROJAS DEL CASTILLO Y AL DR. JULIO MORÁN ANDRADE POR SUS ATINADOS Y VALIOSOS COMENTARIOS A LO LARGO DE ESTE PROYECTO

A LAS TÉCNICAS ARACELI GUARNEROS Y A LUZ MARÍA CHIU POR SU APOYO EN EL DESARROLLO DE LA PARTE EXPERIMENTAL DE ESTE TRABAJO

# CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DE LA DOPAMINA Y SU METABOLISMO SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN EL ESTRIADO

Índice de figuras.....	5
Resumen.....	7
Abstract.....	8
Abreviaturas.....	9
<b>1. ANTECEDENTES GENERALES.....</b>	<b>10</b>
1.1 Especies reactivas de oxígeno.....	10
1.2 Estrés oxidativo.....	11
1.2.1 Reacción de Fenton.....	12
1.2.2 Cadena respiratoria mitocondrial.....	13
1.3 Ácido 3-nitropropiónico.....	15
1.3.1 Déficit conductual inducido por 3-NPA.....	17
1.4 Monoaminas cerebrales.....	18
1.4.1 Síntesis de la dopamina.....	19
1.4.2 Sistemas dopaminérgicos.....	20
1.4.3 Transportadores vesiculares de neurotransmisores.....	22
1.4.4 El transportador de dopamina.....	23
1.4.5 Monoamino-oxidasa.....	23
1.5 Vinpocetina.....	24
1.6 Tocoferol.....	25
<b>2. HIPÓTESIS.....</b>	<b>27</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
<b>4. MÉTODOS.....</b>	<b>28</b>
4.1 Obtención de sinaptosomas.....	28
4.2 Distribución de DA endógena y DOPAC en sinaptosomas.....	28
4.3 Determinación de las concentraciones de DA y DOPAC.....	30

4.4 Determinación de ROS en sinaptosomas.....	30
4.5 Determinación de la formación de productos de DA-quinona en sinaptosomas.....	32
4.6 Determinación de TBA-RS en sinaptosomas de estriado.....	34
4.7 Determinación de los niveles de catecolaminas estriales <i>ex vivo</i> .....	35
5. RESULTADOS .....	36

## ESTUDIO I.

### **Mecanismos subyacentes a la vulnerabilidad estriatal del ácido 3-nitropropiónico**

5.1.1 Comparación del efecto del 3-NPA sobre la distribución de DA y DOPAC dentro y fuera de las terminales nerviosas cerebrales.....	36
5.1.2 Efecto del 3-NPA sobre la exocitosis de DA en terminales nerviosas aisladas de estriado.....	38
5.1.3 Efecto del 3-NPA sobre la producción de ROS en terminales nerviosas aisladas de estriado y de cerebro completo.....	41
5.1.4 Efecto del 3-NPA sobre la formación de productos de DA-quinona en sinaptosomas de estriado y de cerebro completo.....	42
5.1.5 Efecto del 3-NPA a largo plazo sobre la distribución de DA y DOPAC dentro y fuera de las terminales nerviosas cerebrales bajo condiciones de reposo.....	43
5.1.6 Cambios en la concentración de catecolaminas en el estriado inducidos por el 3-NPA <i>in vivo</i> .....	45

## ESTUDIO II.

### **Vinpocetina y $\alpha$ -tocoferol atenúan el daño mediado por los cambios en DA que induce el 3-NPA en terminales nerviosas aisladas de estriado**

5.1.7 Efectos simples y combinados de vinpocetina y 3-NPA sobre la distribución de DA y DOPAC.....	48
--	----

5.1.8 Efectos simples y combinados de $\alpha$ -tocoferol y 3-NPA sobre la distribución de DA y DOPAC .....	50
5.1.9 Comparación entre el efecto de vinpocetina y $\alpha$ -tocoferol sobre el aumento de los productos de DA-quinona inducido por el 3-NPA.....	52
5.2.0 Comparación del efecto de vinpocetina y $\alpha$ -tocoferol sobre el aumento en la producción de ROS inducido por el 3-NPA.....	53
5.2.1 Comparación del efecto de vinpocetina y $\alpha$ -tocoferol sobre el aumento en la generación de TBARS inducido por el 3-NPA.....	54
6. DISCUSIÓN.....	56
6.1 Interpretación del efecto del 3-NPA sobre la distribución de DA y DOPAC en las terminales nerviosas aisladas <i>in vitro</i> .....	56
6.2 Interpretación de los cambios en el metabolismo de DA estriatal inducidos por el 3-NPA <i>ex-vivo</i> .....	61
6.3 Interpretación del efecto de vinpocetina y $\alpha$ -tocoferol sobre el daño mediado por los cambios en DA inducidos por el 3-NPA en sinaptosomas de estriado.....	63
7. CONCLUSIONES.....	69
8. BIBLIOGRAFÍA.....	70
9. ARTÍCULO PUBLICADO.....	79

## Índice de figuras

Tabla 1. Especies reactivas de oxígeno.....	11
Tabla 2. Sistemas antioxidantes.....	12
Fig 1. Cadena de transporte mitocondrial.....	15
Fig 2. Estructura química del 3-NPA.....	15
Fig 3. Sitio de acción del 3-NPA en la cadena respiratoria mitocondrial.....	17
Fig 4. Biosíntesis de la dopamina.....	20
Fig 5. Degradación de la dopamina.....	21
Fig 6. Estructura química de la vinpocetina.....	24
Fig 7. Estructura química del $\alpha$ -tocoferol.....	25
Fig 8. Principio del método para determinar la cantidad de ROS.....	31
Fig 9 Principio del método para cuantificar los aductos de DA-quinona.....	33
Fig 10 Cambios netos sobre las concentraciones de catecolaminas inducidos por el 3-NPA durante 10 min de incubación bajo condiciones de reposo.....	37
Fig 11 Cambios netos sobre las concentraciones de catecolaminas inducidos por despolarización con $K^+$ alto en ausencia y presencia de 3-NPA.....	40
Tabla 3. Efecto del 3-NPA sobre la producción de ROS en terminales nerviosas aisladas de estriado y aisladas de cerebro completo.....	41
Tabla 4. Producción de aductos quinoproteicos durante la incubación de terminales nerviosas aisladas de estriado y cerebro completo en la ausencia y presencia de 3-NPA.....	42
Fig 12 Cambios netos sobre la distribución de DA y DOPAC inducidos por el 3-NPA durante 120 min de incubación bajo condiciones de reposo.....	44
Tabla 5. Efecto del 3-NPA sobre las concentraciones de catecolaminas en homogenados de estriado <i>ex-vivo</i> .....	46
Tabla 6. Efectos simples y combinados de vinpocetina y 3-NPA sobre la distribución de DA y DOPAC en sinaptosomas de estriado .....	48

Fig 13 Efecto neto de la vinpocetina sobre los cambios en las concentraciones de DA y DOPAC totales inducidos por el 3-NPA .....	49
Tabla 7. Efectos simples y combinados de $\alpha$ -tocoferol y 3-NPA sobre la distribución de DA y DOPAC en sinaptosomas de estriado.....	50
Fig 14 Efecto neto de $\alpha$ -tocoferol sobre los cambios en las concentraciones de DA y DOPAC totales inducidos por el 3-NPA.....	51
Tabla 8. Efectos simples y combinados de vinpocetina y $\alpha$ -tocoferol sobre la formación de aductos quinoproteicos durante la incubación de terminales nerviosas aisladas de estriado son y sin 3-NPA .....	53
Tabla 9. Efectos simples y combinados de vinpocetina y $\alpha$ -tocoferol sobre el aumento en la producción de ROS inducido por el 3-NPA en terminales nerviosas aisladas de estriado.....	54
Tabla 10. Efectos simples y combinados de vinpocetina y $\alpha$ -tocoferol sobre la formación de TBA-RS inducido por el 3-NPA en terminales nerviosas aisladas de estriado .....	55
Fig 15 Mecanismos propuestos relacionados con el efecto particularmente dañino ejercido por el 3-NPA en el estriado.....	61

## Resumen

El estriado es una estructura cerebral susceptible particularmente al cambio metabólico ejercido por el ácido 3-nitropropiónico (3-NPA), una toxina que inhibe el complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial. El estriado, que recibe las terminales nerviosas de la vía nigro-estriatal, concentra la mayor cantidad de dopamina (DA) en el cerebro. La DA es metabolizada al ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) mediante la monoamino-oxidasa (MAO), una enzima que contiene un grupo disulfuro en el sitio activo. En terminales nerviosas aisladas de estriado expuestas a 3-NPA *in vitro*, aumenta la DA y disminuye al DOPAC después de 10 min de incubación, y después de 2 h además se detectó un aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS), así como un aumento en la formación de productos de DA-quinona. Estos efectos por exposición del 3-NPA resultaron en un aumento de DA extracelular después de 2 h de incubación. En homogenados de estriado de los animales que presentaron alteraciones motoras en respuesta a una inyección de 3-NPA *in vivo*, se observó un aumento de los metabolitos de DA, ácido homovanílico (HVA) y DOPAC. Con base a los resultados concluimos que, en las terminales nerviosas aisladas de estriado donde la DA está particularmente concentrada, el aumento de los ROS inducidos por el 3-NPA, oxidan a la DA y generan DA-quinonas. Estas DA-quinonas pueden formar aductos con el sitio activo de la MAO-A reduciendo su actividad. Mientras que parte de la DA que no se metabolizó a DOPAC, es utilizada para desencadenar la generación de más productos nocivos de la oxidación de DA y otra parte de la DA es liberada al medio externo, donde es metabolizada por enzimas no neuronales como son la MAO-B y la catecol-o-metil-transferasa (COMT).

## **Abstract**

The striatum is a cerebral structure particularly susceptible to the metabolic challenge exerted by 3-nitropropionic acid (3-NPA), a toxin that inhibits the respiratory chain at complex II. The striatum, which receives the nerve endings of the nigro-striatal pathway, concentrates the largest amount of (DA) in the brain. DA is metabolized to 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) by monoamine oxidase (MAO), an enzyme that contains a redox-active disulfide in the active site. In striatum isolated nerve endings exposed to 3-NPA *in vitro*, DA increased and DOPAC decreased already after 10 min, and after 2 h also an increase in reactive oxygen species and DA-quinone products formation was detected. These 3-NPA-induced effects resulted in an increase in DA release after 2 h. In striatum homogenates from animals presenting motor disturbances in response to 3-NPA *in vivo*, the DA metabolites homovanilic acid and DOPAC were increased. It is concluded that in the striatum nerve endings where DA is particularly concentrated, the increase in reactive oxygen species induced by 3-NPA, oxidizes DA generating DA-quinones. These DA-quinones may form adducts with the active site of MAO type A reducing its activity. The DA not metabolized to DOPAC is both, used to unchain generation of more of the harmful DA-oxidation products and released to the external medium, where is metabolized by the non-neuronal enzymes MAO type B and catechol-O-methyltransferase.

**Keywords:** catechol-O-methyltransferase; cerebral-nerve-endings; dopamine-metabolism; dopamine-quinone-adducts; monoamine oxidase type A; monoamine oxidase type B; reactive-oxygen-species.

## ABREVIATURAS

3-NPA	Ácido 3-nitropropiónico
$\alpha$ -MPT	$\alpha$ -metil-p-tirosina
ATP	Adenosín trifosfato
COMT	Catecol-orto-metil transferasa
DA	Dopamina
DAT	Transportador de dopamina
DCF	Diclorofluoresceína
DCF-DA	Diclorofluoresceína diacetato
DOPAC	Ácido 3,4-dihidroxifenilacético
GPx	Glutación peroxidasa
GSH	Glutación
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
HVA	Ácido homovanílico
KOH	Hidróxido de potasio
KRH	Krebs Ringer Hepes
MAO	Monoamino-oxidasa
MDA	Malondialdehído
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NaOH	Hidróxido de sodio
NBT	Azul de nitrotetrazolio
PCA	Ácido perclórico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SDH	Succinato deshidrogenasa
SNC	Sistema nervioso central
SOD	Superóxido dismutasa
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBA-RS	Substancias reactivas al TBA
TH	Tirosina-hidroxilasa
VMAT	Transportador vesicular de monoaminas
VPC	Vinpocetina

## 1. ANTECEDENTES GENERALES

### 1.1 ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

Las reacciones oxidantes suelen ocurrir debido a la presencia de radicales libres. Un radical se define como un átomo o molécula que contiene uno o más electrones desapareados ([Halliwell y Gutteridge 2006](#)). Cuando un radical libre se forma, éste llega a estabilizarse rápidamente, ya sea aceptando o donando un electrón no apareado desde o hacia otra molécula o átomo. Con frecuencia, los radicales libres promueven una reacción en cadena, resultando en la transformación de un gran número de biomoléculas como ácidos nucleicos, lípidos y proteínas.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son una familia de moléculas altamente reactivas que incluyen a radicales libres; como el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y el radical hidroxilo ( $HO^{\cdot}$ ), y a especies no radicales como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) y que pueden ser convertidas fácilmente a radicales libres.

Durante mucho tiempo se creía que los radicales libres solamente causaban daño celular, pero recientemente se ha reconocido que los radicales libres son también favorables para la célula. De hecho el propio organismo los produce en cantidades moderadas para combatir ciertos tipos de virus y bacterias. Además, los radicales libres juegan un papel en la transducción de señales, en el mecanismo de defensa mostrado por el sistema inmune y en la vasodilatación del músculo liso, entre otros ([Pacher y col. 2007](#)).

Tabla 1. Especies reactivas de oxígeno

Radicales libres	No radicales
Anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ )	Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ )
Radical hidroxilo ( $HO^{\cdot}$ )	Ácido hipocloroso ( $HOCl$ )
Radical peroxilo ( $ROO^{\cdot}$ )	Peroxinitrito ( $ONOO^-$ )
Radical alcoxilo ( $RO^{\cdot}$ )	Ozono ( $O_3$ )

## 1.2 ESTRÉS OXIDATIVO

Todas las células mantienen en su entorno un estado redox característico, como resultado de un equilibrio entre las especies oxidantes y los agentes antioxidantes. Cuando ocurre una producción incontrolada de radicales libres, ya sea por una sobreproducción de éstos o por un déficit de los sistemas antioxidantes (Sies 1991; Kehrer 1993), se altera el equilibrio oxidante/antioxidante del sistema biológico, lo que lleva a la célula a un estado de estrés oxidante, resultando en un daño fisiológico y/o morfológico celular.

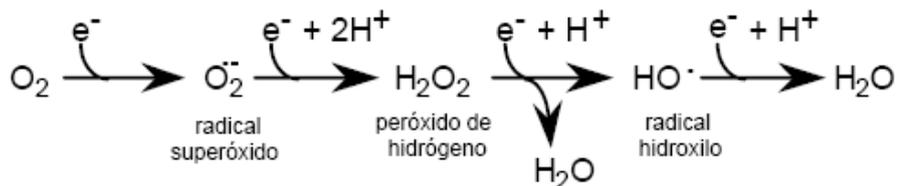
Las especies reactivas más estudiadas son las de oxígeno y/o de nitrógeno (ROS y RNS, respectivamente) y su concentración es regulada por mecanismos antioxidantes. Un agente antioxidante, es cualquier sustancia capaz de retardar o prevenir el daño oxidante generado por los radicales libres. Los sistemas de defensa antioxidante incluyen sistemas enzimáticos tales como la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa (GPx) y la catalasa (CAT). Y sistemas no enzimáticos, como las vitaminas A, C, E y glutatión (GSH), entre otros (Dorado y col. 2003).

Tabla 2. Sistemas antioxidantes

Antioxidantes Enzimáticos:	Antioxidantes No enzimáticos:
Superóxido dismutasa (SOD)	$\alpha$ -tocoferol
Glutación peroxidasa (GPx)	ácido ascórbico
Glutación transferasa (GT)	$\beta$ -caroteno
Catalasa (CAT)	Polifenoles

### 1.2.1 REACCIÓN DE FENTON

La reducción del oxígeno molecular ( $O_2$ ) a  $H_2O_2$  durante el metabolismo celular tiene lugar en sucesivas cesiones de un electrón como se presenta en el siguiente esquema:



Generación de ROS como consecuencia de la reducción parcial del  $O_2$

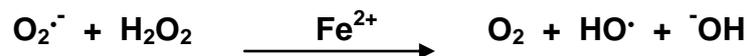
El primer producto en la reducción del  $O_2$  es el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), que es una especie poco reactiva y dismuta a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Esta reacción ocurre de manera espontánea o es catalizada por la enzima intracelular superóxido dismutasa (SOD). Cuando el  $O_2$  es reducido parcialmente por 2 electrones se forma el  $H_2O_2$ . La peligrosidad del  $H_2O_2$  radica en su capacidad de formación de otros ROS más reactivos como son el radical

hidroxilo (HO<sup>•</sup>). Si el Fe<sup>2+</sup> entra en contacto con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede iniciarse la conocida reacción de Fenton y producirse el HO<sup>•</sup>, una especie altamente reactiva que puede reaccionar con cualquier biomolécula presente en la célula.



Reacción de Fenton

Otra reacción que tiene como resultado la formación de HO<sup>•</sup>, es la reacción de Haber-Weiss, en la que el O<sub>2</sub><sup>•-</sup> reacciona con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en presencia de Fe<sup>2+</sup>.



Reacción de Haber-Weiss

### 1.2.2 CADENA RESPIRATORIA MITOCONDRIAL

En la mitocondria se estima que del 2-4% del oxígeno consumido durante el transporte de electrones no se reduce a agua por la citocromo c oxidasa, sino que se forma el anión semiquinona que puede transferir 1 ó 2 electrones al O<sub>2</sub> con la subsecuente formación de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, este a su vez, puede generar otras especies reactivas de oxígeno (Halliwell 2006).

La mitocondria contiene dos compartimentos ligados por las membranas interna y externa. En la membrana interna mitocondrial se encuentra la cadena respiratoria que está formada por proteínas que se ensamblan en complejos multiproteicos denominados I, II, III y IV.

El complejo I (NADH-deshidrogenasa) recibe los electrones del NADH y los transfiere a la coenzima-Q, la cual se desplaza libremente a través de la membrana interna mitocondrial. Durante este proceso son translocados 4 protones desde la membrana interna mitocondrial hacia el espacio intermembranal. El complejo II (succinato deshidrogenasa) es una flavoproteína que interviene además en el ciclo de los ácidos tricarbónicos y transfiere los electrones del succinato a la coenzima-Q sin la translocación de protones. El complejo III (citocromo c-coenzima Q oxido-reductasa), recibe los electrones de la coenzima Q y los transfiere al citocromo c, un transportador proteico soluble que se encuentra en el espacio intermembranal, al mismo tiempo que transloca 2 protones a través de la membrana. Por último, el complejo IV (citocromo oxidasa) acopla la oxidación del citocromo c con la reducción del  $O_2$  para producir 2 moléculas de agua, al mismo tiempo que transloca 4 protones al espacio intermembranal. Las reacciones globales de los complejos I, III y IV son exergónicas y la energía liberada en ellas crea un gradiente de protones como resultado de los protones bombeados al espacio intermembranal. Este gradiente de protones libera la energía suficiente para que tenga lugar la síntesis de ATP mediante la ATP-sintasa.

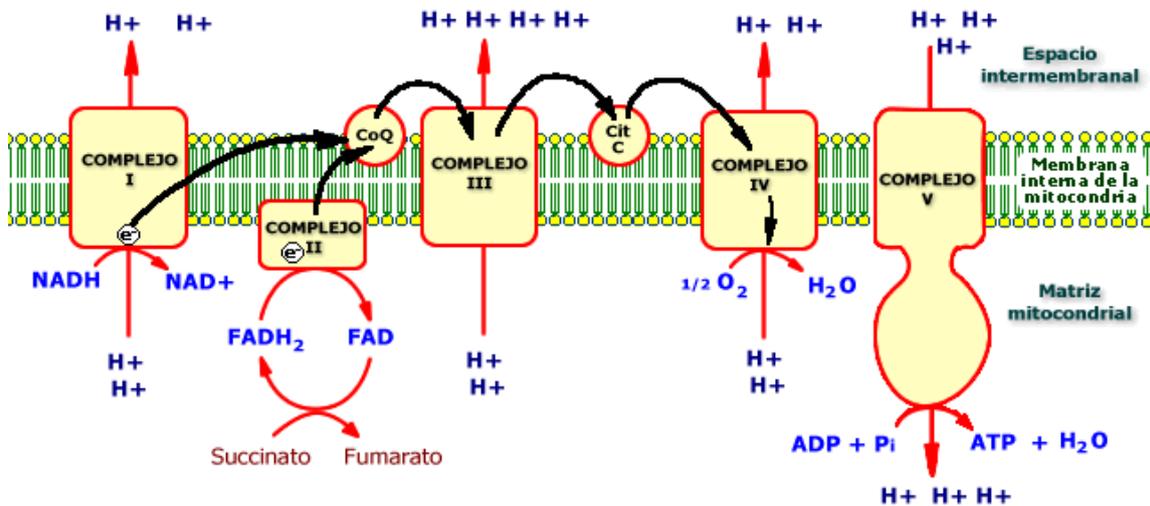


Fig. 1. Cadena de transporte mitocondrial

Existen diversos modelos experimentales para producir radicales libres y generar estrés oxidativo, uno de ellos es mediante la inhibición de uno o más complejos de la cadena de transporte de electrones.

### 1.3 ÁCIDO 3-NITROPROPIÓNICO

El ácido 3 nitropropiónico (3-NPA) es una toxina mitocondrial que causa daño oxidativo al inhibir de manera irreversible a la succinato deshidrogenasa (SDH), una enzima localizada en la membrana interna mitocondrial que actúa en el ciclo de los ácidos tricarbónicos y en el complejo II de la cadena de transporte de electrones (Alston y col. 1977; Alexi y col. 1998).

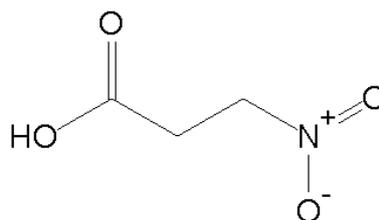
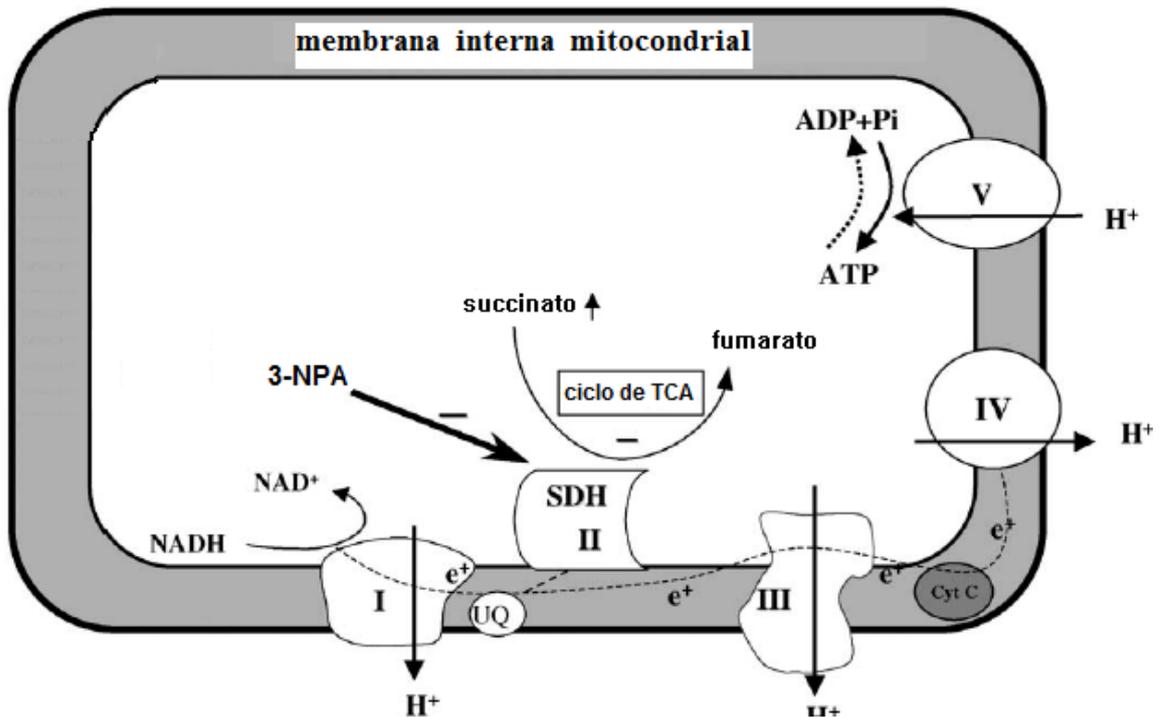


Fig. 2. Estructura química del 3-NPA

El 3-NPA al bloquear la maquinaria metabólica celular, origina en las células una disminución energética. La alteración del metabolismo energético ocurre en todas las células del cuerpo y el cerebro, sin embargo, los ganglios basales son los más severamente afectados después de una administración periférica de la toxina mitocondrial (Alexi y col. 1998).

Se ha sugerido que la administración sistémica de 3-NPA a animales, puede causar lesiones cerebrales que aparentemente involucra eventos excitotóxicos secundarios a través de la activación de receptores de glutamato (Beal y col. 1993; Schulz y col. 1996), y que son evidentes principalmente en el estriado, aunque también se han encontrado en hipocampo, tálamo y corteza cerebral (Borlongan y col. 1997). Además, la neurotoxicidad del 3-NPA no solamente involucra eventos excitotóxicos, sino que también está involucrado el estrés oxidativo. Varios reportes demuestran que una inyección sistémica o intraestriatal de 3-NPA disminuye los niveles de glutatión y genera un aumento de radicales libres, y que la degeneración estriatal puede ser atenuada bloqueando la producción de los radicales libres (Beal y col. 1993; Galpern y col. 1996, La Fontaine y col. 2000).



**Fig. 3. Sitio de acción del 3-NPA en la cadena respiratoria mitocondrial.** En la estructura de la mitocondria se encuentran los componentes de la cadena respiratoria y el sitio de inhibición del 3-NPA. En condiciones normales, los complejos I, III y IV funcionan como bombas de protones y el complejo V (ATP sintasa) es la vía dominante para la reentrada de protones dentro de la matriz mitocondrial, la cual mantiene al potencial de membrana mitocondrial y conduce a la síntesis de ATP (flecha continua). Cuando se inhibe a la succinato deshidrogenasa (SDH: complejo II) con el 3-NPA, hay un colapso del potencial de membrana mitocondrial el cual revierte la síntesis de ATP (flecha punteada) y conduce a la hidrólisis de ATP citoplasmático. Debido a que la SDH es también una enzima que participa en el ciclo de los ácidos tricarbónicos, la inhibición de la SDH también dará lugar a la elevación de succinato como se observa en la figura.

### 1.3.1 DÉFICIT CONDUCTUAL INDUCIDO POR 3-NPA

Varios estudios han descrito extensamente la neurodegeneración asociada con 3-NPA, pero la caracterización de los síntomas conductuales producidos por el 3-NPA ha sido escasa. Los primeros estudios definieron un comportamiento patológico inducido por 3-NPA en tres etapas, a saber: etapa I, somnolencia; etapa II, incoordinación de la marcha con manoteo y movimientos estereotipados; y etapa III, balanceo ventral y lateral. (Borlongan y col. 1995).

Se ha demostrado que una sola administración sistémica o administraciones repetidas de 3-NPA a ratas, resulta en lesiones de los ganglios basales con una disminución inicial en la actividad motora seguida por episodios ocasionales de hiperactividad y/o movimientos anormales (Koutouzis, y col. 1994). En estudios adicionales en ratones se ha demostrado que la administración sistémica simple repetida de 3-NPA resulta en lesiones de los ganglios basales con una disminución inicial en la actividad motora seguida por episodios ocasionales de hiperactividad y/o movimientos anormales (temblor, inclinación de la cabeza, rigidez de la cola) (Ludolph y col. 1991).

Hay evidencias que sugieren que la dopamina (DA) podría jugar un papel determinante en la formación de lesiones estriatales causadas por el 3-NPA *ex vivo* (Reynolds y col. 1998). El metabolismo de dopamina, ya sea por actividad de la MAO o por auto-oxidación, resulta en una producción de  $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$  que en conjunto con los ROS generados por la mitocondria dentro de las neuronas estriatales, promueven la muerte celular. A pesar de las altas concentraciones de DA que existen en el estriado, cada vez hay más evidencias de que la DA, o uno de sus metabolitos, podrían ser neurotóxicos (Jakel y Maragos 2000). Así mismo, las evidencias más recientes indican que la reducción de los niveles de DA con  $\alpha$ -MPT y reserpina, reduce el daño oxidante ocasionado por el 3-NPA (Villarán y col. 2008).

#### **1.4. MONOAMINAS CEREBRALES**

Las monoaminas cerebrales neurotransmisoras incluyen a las catecolaminas; DA, noradrenalina (NA), adrenalina y a la indolamina serotonina.

La DA es un neurotransmisor del grupo de las catecolaminas cerebrales que participa en la regulación de diversas funciones como la conducta motora, la emotividad y la afectividad. El principal núcleo dopaminérgico del cerebro se encuentra en la sustancia nigra pars compacta. Este núcleo envía sus proyecciones principalmente al estriado lugar donde se encuentra el mayor porcentaje de terminales nerviosas dopaminérgicas. El estriado es un núcleo que participa en la generación y selección de programas motores para iniciar el movimiento.

En el sistema nervioso central (SNC) de la rata existe un número importante de células dopaminérgicas, de 15,000 a 20,000 para cada uno de las mitades del mesencéfalo, región donde se encuentran los grupos más importantes de ellas (Cooper y col. 1996). Las neuronas dopaminérgicas y sus proyecciones pueden agruparse en 3 sistemas principales: sistemas ultracortos, sistemas de longitud intermedia y sistemas largos. Este último grupo incluye a las neuronas de la región retrorubral (A8), del área tegmental ventral (A10) y de la sustancia nigra compacta (A9), las que envían proyecciones a 3 regiones principales: el neostriado (núcleo caudado y putamen), la corteza límbica y otras estructuras límbicas. Dentro de este grupo se encuentran dos de las vías dopaminérgicas más importantes, la vía nigroestriatal y la vía mesolímbica.

#### **1.4.1 SINTESIS DE LA DOPAMINA**

La síntesis de DA tiene lugar en las terminales nerviosas dopaminérgicas donde se encuentran en alta concentración las enzimas responsables, la tirosina hidroxilasa (TH) y la L-DOPA descarboxilasa. Los trabajos de Nagatsu y Levitt (Nagatsu y col. 1964; Levitt y col. 1965), demostraron que la

hidroxilación del aminoácido L-tirosina es el punto de regulación de la síntesis de catecolaminas en el SNC y que en consecuencia la TH es la enzima limitante de la síntesis de la DA. La TH es un péptido que se encuentra presente de manera predominante en la fracción citosólica de las terminales catecolaminérgicas (Siegel 1989).

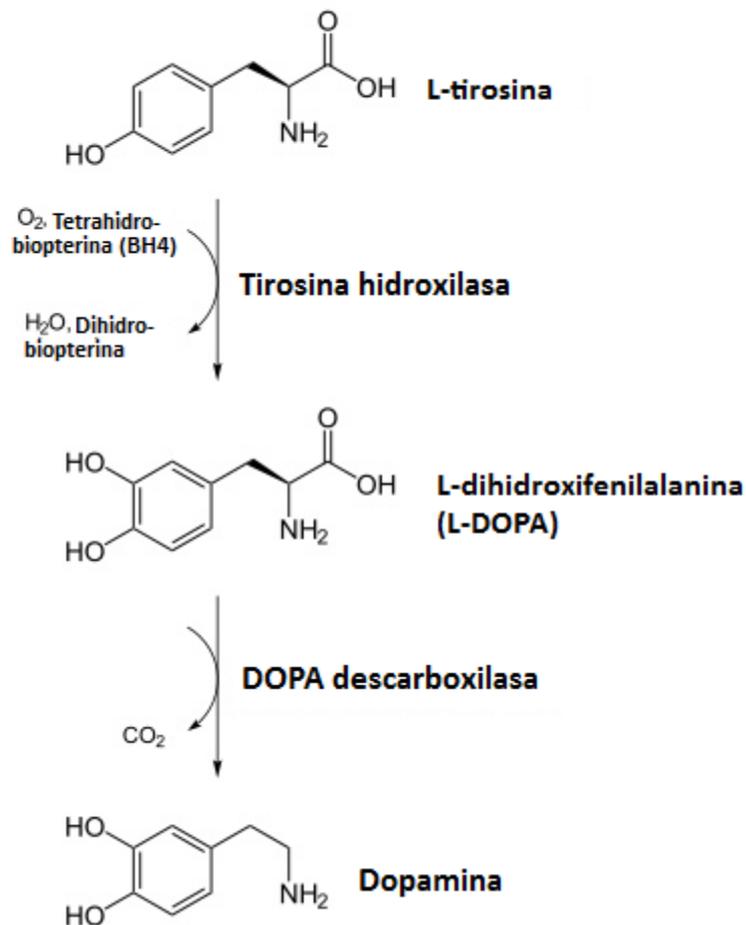


Fig. 4. Biosíntesis de la dopamina

#### 1.4.2 SISTEMAS DOPAMINÉRGICOS

Existen mecanismos que regulan de manera muy precisa la síntesis y liberación de las catecolaminas. En las terminales dopaminérgicas el

neurotransmisor es sintetizado en el citoplasma de donde puede ser liberado directamente al espacio sináptico o bien ser transportado al interior de las vesículas sinápticas para ser liberado por exocitosis. La DA recapturada es convertida por la enzima monoamino-oxidasa (MAO), en particular por la forma A, presente en el interior de la terminal nerviosa, en ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) que es liberado al exterior de la terminal para ser convertido en ácido homovanílico (HVA) por la enzima catecol-O-metiltransferasa (COMT). En el cerebro de la rata el principal metabolito de la DA es el DOPAC. Así, la formación de DOPAC puede utilizarse como indicador de la actividad dopaminérgica en la rata.

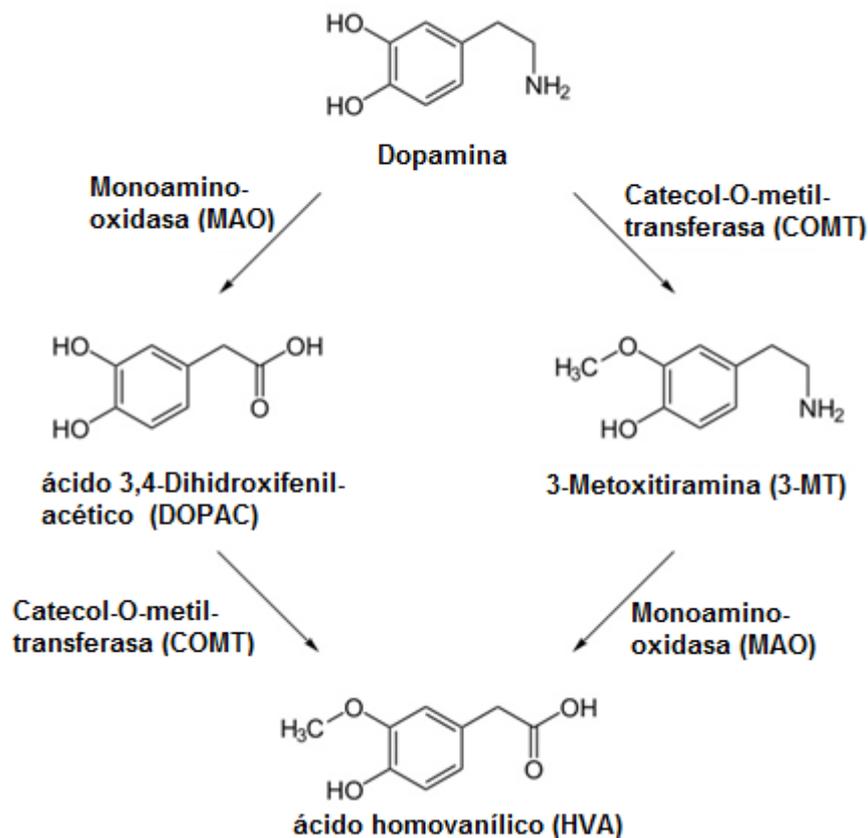


Fig. 5. Degradación de la dopamina

### 1.4.3 TRANSPORTADORES VESÍCULARES DE NEUROTRANSMISORES

Todos los neurotransmisores clásicos son almacenados en las vesículas sinápticas. Los transportadores vesiculares de neurotransmisores son las proteínas de la membrana de las vesículas sinápticas responsables del almacenamiento de los neurotransmisores dentro de las mismas. Dentro de los transportadores vesiculares, el de monoaminas (VMAT) es el mejor caracterizado. Las vesículas sinápticas que tienen VMAT, también tienen una bomba de  $H^+$  vesicular (ATPasa de  $H^+$ ) similar a la que se encuentra presente en los lisosomas y otros organelos. La ATPasa genera un gradiente de pH que usa el VMAT para transportar a la monoamina neurotransmisora, su estequiometría es de 2  $H^+$  por molécula de monoamina transportada.

Los neurotransmisores almacenados en las vesículas sinápticas son liberados al espacio sináptico por el proceso de exocitosis, que involucra la fusión de las vesículas sinápticas con la membrana plasmática de la terminal. En la terminal sináptica no estimulada existe una fracción de vesículas sinápticas con neurotransmisor en las cercanías de las zonas activas de la membrana sináptica preparadas para la exocitosis. La despolarización por un potencial de acción estimula la entrada de  $Ca^{2+}$  que inicia el proceso excitotico. Las vesículas sinápticas empleadas en la exocitosis una vez que descargan su neurotransmisor al medio externo son reemplazadas por vesículas de reserva y las membranas de las vesículas sinápticas que se fusionaron a la membrana pre-sináptica son recapturadas por endocitosis (Bauerfeind y col. 1996).

#### **1.4.4 EL TRANSPORTADOR DE DOPAMINA**

El transportador de DA (DAT) es una molécula proteica de la membrana de las neuronas dopaminérgicas que funciona en el transporte de DA y que está en la superficie membranal de dichas neuronas. El DAT se encarga de recapturar la DA una vez que es liberada al medio externo en la terminal sináptica. La captura de DA por el DAT es un proceso altamente selectivo para DA y es dependiente de  $\text{Na}^+$ , de  $\text{Cl}^-$  y es óptimo a  $37^\circ\text{C}$ .

El mecanismo de acción propuesto para el funcionamiento del DAT es un mecanismo aleatorio, secuencial y de multisubstratos para el DAT del estriado. La DA ó el  $\text{Na}^+$  (2 iones) se enlazan al DAT en una secuencia aleatoria, este paso es seguido por el enlace del ión cloro ( $\text{Cl}^-$ ). Después el DAT acarrea la DA al interior de la neurona. Se ha mostrado que por cada molécula de DA transportada son co-transportados 2 iones  $\text{Na}^+$  y 1 ión  $\text{Cl}^-$ .

#### **1.4.5 MONOAMINO-OXIDASA**

La monoamino-oxidasa (MAO) es una enzima que cataliza la desaminación oxidativa de diferentes aminas biogénicas como son; la dopamina, serotonina y noradrenalina en el sistema nervioso central y en tejidos periféricos (Sablin y Ramsay 1998). Por lo tanto, la MAO juega un papel crítico en la regulación de la actividad normal del SNC. Los dos subtipos de MAO, llamadas MAO-A y MAO-B, se localizan en la membrana mitocondrial externa y poseen un cofactor FAD unido covalentemente a un residuo de cisteína. Mientras que la MAO-A tiene una alta afinidad por el substrato serotonina (5-HT) y es específicamente inhibida por clorgilina, la MAO-B tiene una mayor afinidad por la feniletilamina (PEA) y es selectivamente inhibida por el deprenil. La DA es principalmente

metabolizada por la MAO-A, pero también puede ser metabolizada por la MAO-B en una menor eficiencia (Ma y col. 2004).

Existen evidencias de que dos residuos de cisteína se encuentran presentes en el sitio activo de la MAO (Sablin y Ramsay 1998), y que estas cisteínas son importantes para la actividad catalítica de la MAO (Wu y col. 1993).

### 1.5 VINPOCETINA

Por otro lado, la vinpocetina (VPC, ethyl apovincamine-22-oate), un derivado sintético del alcaloide vincamina que proviene de las hojas de la planta Vincapervinca (Vinca minor), es un fármaco nootrópico con alto potencial neuroprotector que se ha usado ampliamente contra disfunciones cerebrovasculares (Araki y col. 1990).

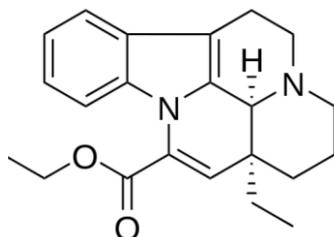


Fig. 6. Estructura química de la VPC

Interesantemente, se ha demostrado que en terminales nerviosas aisladas de estriado, la vinpocetina disminuye la concentración de DA y aumenta la de su principal metabolito, el DOPAC, de manera dependiente de la dosis (Trejo y col. 2001). También, se ha demostrado que la vinpocetina a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  protege a las células del daño excitotóxico inducido por glutamato en un cultivo de neuronas cerebrocorticales (Miyamoto y col. 1989), además de ser altamente efectiva contra la peroxidación de lípidos y la formación de ROS inducidos por el complejo oxidante ascorbato/ $\text{Fe}^{2+}$  en sinaptosomas

cerebrocorticales (Santos y col. 2000). Asimismo, se ha demostrado su capacidad como atrapador de radicales hidroxilo generados por la reacción de Fenton (Pereira y col. 2000), y se ha observado que la actividad antioxidante de vinpocetina es similar a la del  $\alpha$ -tocoferol (Oláh y col. 1990). La vinpocetina además reduce la acumulación de lisofosfolípidos en las membranas plasmáticas del cerebro e inhibe la acumulación de dienos conjugados bajo condiciones experimentales de isquemia cerebral aguda en ratas, de manera más eficiente que el  $\alpha$ -tocoferol (Vishnevskii y col. 2009). Además, se ha demostrado que la vinpocetina bloquea la inhibición de los complejos II, III y IV de la cadena respiratoria mitocondrial y disminuye la acumulación de ROS que induce el péptido  $\beta$ -amiloide en células PC12 (Pereira y col. 2000).

## 1.6 TOCOFEROL

Por su parte, el  $\alpha$ -tocoferol es un componente esencial del mecanismo de defensa celular contra oxidantes endógenos y exógenos (Wang y Quinn 1999).

La reacción antioxidante del  $\alpha$ -tocoferol es de tipo no enzimática y rápida.

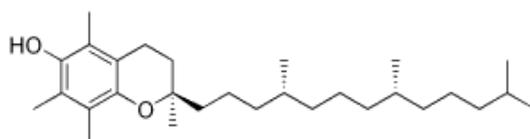


Fig. 7. Estructura química del  $\alpha$ -tocoferol

El  $\alpha$ -tocoferol es uno de los principales antioxidantes liposolubles, que puede prevenir la propagación de las reacciones en cadena de la peroxidación de lípidos al atrapar los radicales peroxilo y alcoxilo (Cardoso y col. 1998).

Además, se ha demostrado que el  $\alpha$ -tocoferol es un compuesto antioxidante eficaz contra el estrés oxidativo inducido por paraquat, un donador de  $O_2^{\cdot-}$ , en cultivos primarios de neuronas estriatales de rata (Osaka y col. 2003), además de reducir parcialmente el daño oxidativo inducido por el 3-NPA *ex-vivo* en hipocampo de ratas (Rodríguez-Martínez y col. 2004).

Hay evidencias que sugieren que la presencia de DA podría jugar un papel importante en la formación de las lesiones estriatales y facilitar el daño oxidativo por 3-NPA preferencialmente en el estriado, sin embargo, se desconoce el mecanismo por el que el 3-NPA causa daño oxidativo principalmente en el estriado. Por lo tanto, en el presente proyecto empleamos un diseño experimental que nos permitió medir los cambios en la distribución de DA y su principal metabolito, el DOPAC, en terminales nerviosas cerebrales, con el propósito de profundizar acerca del mecanismo de acción mediante el que el 3-NPA causa un mayor daño en el estriado y cuál es el papel que juega la DA en el daño oxidativo inducido por la toxina.

## **2. HIPÓTESIS**

Como en el estriado se encuentra la mayor concentración de dopamina y el 3-NPA genera un aumento en la producción de radicales libres, al inhibir el transporte de electrones en el complejo II, entonces este aumento de ROS va a propiciar la oxidación de la DA a DA-quinonas (u otro metabolitos más tóxicos), que a su vez podrían inhibir a otros complejos de la cadena de transporte de electrones, exacerbando así el daño oxidativo.

## **3. OBJETIVOS**

Los objetivos del presente trabajo son:

- Investigar cuál es el papel que juega la dopamina en el daño oxidativo inducido por el 3-NPA en terminales nerviosas aisladas de estriado.
- Estudiar el efecto del 3-NPA sobre el estrés oxidativo y la formación de DA-quinonas en sinaptosomas de estriado
- Investigar cuales son los cambios en la distribución de dopamina que produce la administración sistémica de 3-NPA *ex-vivo*.
- Finalmente, con los resultados obtenidos proponer un posible mecanismo de acción mediante el que el 3-NPA produce daño oxidativo preferencialmente en el estriado.

## 4. MÉTODOS

### 4.1 Obtención de sinaptosomas

Los estriados disecados de 4 ratas macho o el cerebro completo (sin cerebelo) de una rata macho de la cepa Wistar (250-300 g), se colocaron inmediatamente en una solución fría de sacarosa isotónica 0.32 M (1:10 peso/vol) y se homogenizaron (6 golpes a 2000 rpm). Las suspensiones resultantes se centrifugaron a 1500 x g por 10 min, y los sobrenadantes obtenidos de esta centrifugación se centrifugaron durante otros 20 min a 9000 x g, para obtener la fracción sinaptosomal cruda, P2. Los pellets resultantes conteniendo las terminales nerviosas (sinaptosomas) aisladas de estriado o de cerebro completo se resuspendieron en un buffer de HEPES (KRH) oxigenado. La composición del KRH es en mM: 127 NaCl, 1.18 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3.73 KCl, 1 CaCl<sub>2</sub>, 1.18 MgSO<sub>4</sub>, 20 HEPES y 5.6 dextrosa, pH 7.4, burbujeado con una mezcla de O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>.

### 4.2 Distribución de DA endógena y DOPAC en sinaptosomas

Los sinaptosomas de estriado o de cerebro completo de rata (sin cerebelo) (fracción P2) suspendidos en 500 µl de KRH conteniendo 464±24 µg ó 947±36 µg de proteína sinaptosomal, respectivamente, se pre-incubaron durante 5 min a 37°C antes de exponerlas a las diferentes condiciones experimentales a ser investigadas, posteriormente se incubaron a 37°C durante 10 ó 120 min en ausencia o en presencia de 3-NPA (5 mM) en condiciones de reposo o bajo condiciones despolarizantes con una concentración K<sup>+</sup> 30 mM (K<sup>+</sup> alto). La composición del buffer con K<sup>+</sup> alto es la misma que el KRH excepto que una concentración equimolar de NaCl se reemplazó por una de KCl 30 mM. Al final

del periodo de incubación, los sinaptosomas expuestos a las diferentes condiciones experimentales se centrifugaron a 12, 000 g por 5 min. Los sobrenadantes resultantes de esta centrifugación (conteniendo la DA y el DOPAC liberados) se transfirieron a viales limpios que contenían una alícuota de una mezcla de ácido perclórico (PCA)/EDTA para obtener 0.1 M y 0.1 mM final respectivamente, y se almacenaron a -40°C para el análisis posterior. Los pellets resultantes se resuspendieron en 500 µl de una solución de 0.1 M PCA/ 0.1 mM EDTA pH 1.4 y se mezclaron vigorosamente en vortex. Estas condiciones drásticas garantizan la descarga completa de catecolaminas (DA y DOPAC) que estuvieran dentro de los sinaptosomas. Con la finalidad de estandarizar las concentraciones de catecolaminas por mg de proteína sinaptosomal, la suspensión mezclada en el vortex conteniendo los sinaptosomas rotos se centrifugó. Los pellets obtenidos se resuspendieron en 1 ml de solución de NaOH 5 mM y se utilizaron para determinar la cantidad de proteína por el método de Lowry, los sobrenadantes resultantes de esta centrifugación, conteniendo las catecolaminas que se encontraban dentro de cada muestra de sinaptosomas, se guardaron a -40°C para el análisis posterior. Las muestras conteniendo las catecolaminas liberadas y retenidas se inyectaron en el sistema HPLC dentro de la semana siguiente después del experimento. Los resultados se expresaron como la concentración de catecolamina (DA o DOPAC) en pmol/mg de proteína sinaptosomal. La liberación de DA endógena se refiere al balance entre la DA liberada y la DA recapturada en 10 min. La DA total (o el DOPAC total) se refiere a la suma de la DA (o DOPAC) liberada más la DA (o DOPAC) retenida en una alícuota de sinaptosomas expuestos a una condición experimental específica.

### 4.3 Determinación de las concentraciones de DA y DOPAC

Se inyectaron 20 µl de las muestras conteniendo catecolaminas en PCA/EDTA directamente en el sistema HPLC de Waters para el análisis. El sistema HPLC consiste de una bomba de suministro (modelo 600), un inyector Rheodyne, una columna analítica (Resolve, C18, 150 x 3.9 mm de diámetro interno, tamaño de partícula de 5 µm, controlado a 30°C) y un detector electroquímico (modelo DECADE), con carbón vidriado usado a un voltaje de +0.8 V contra un electrodo de Ag/AgCl de referencia (rango 1 nA). Una fase móvil compuesta de 50 mM de ácido orto-fosfórico / 50 mM de buffer de ácido cítrico, pH 3.1 ajustado con KOH, conteniendo metanol 5% (v/v), ácido octanosulfónico 100 mg/l y 20 mg/l EDTA, a una tasa de flujo de 1 ml/min, se utilizó para la elusión de las catecolaminas. Las concentraciones de DA y DOPAC en las muestras experimentales se calcularon con curvas de calibración obtenidas de la inyección de concentraciones crecientes de un estándar externo, que contenía una mezcla de monoaminas.

### 4.4 Determinación de ROS en sinaptosomas

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) se midieron con una técnica fluorescente con diacetato de diclorofluoresceína (DCF-DA) (Ali y col. 1992). El DCF-DA es un compuesto permeable que difunde fácilmente a las células acumulándose mayoritariamente en el citosol. Una vez dentro de las células el DCF-DA es deacetilado por esterasas endógenas a DCF-H, que es una molécula menos permeable a la célula, y convertido por las especies reactivas presentes en el citoplasma a DCF, una molécula fluorescente que puede ser cuantificada fácilmente mediante fluorescencia (Halliwell y Whiteman 2004).

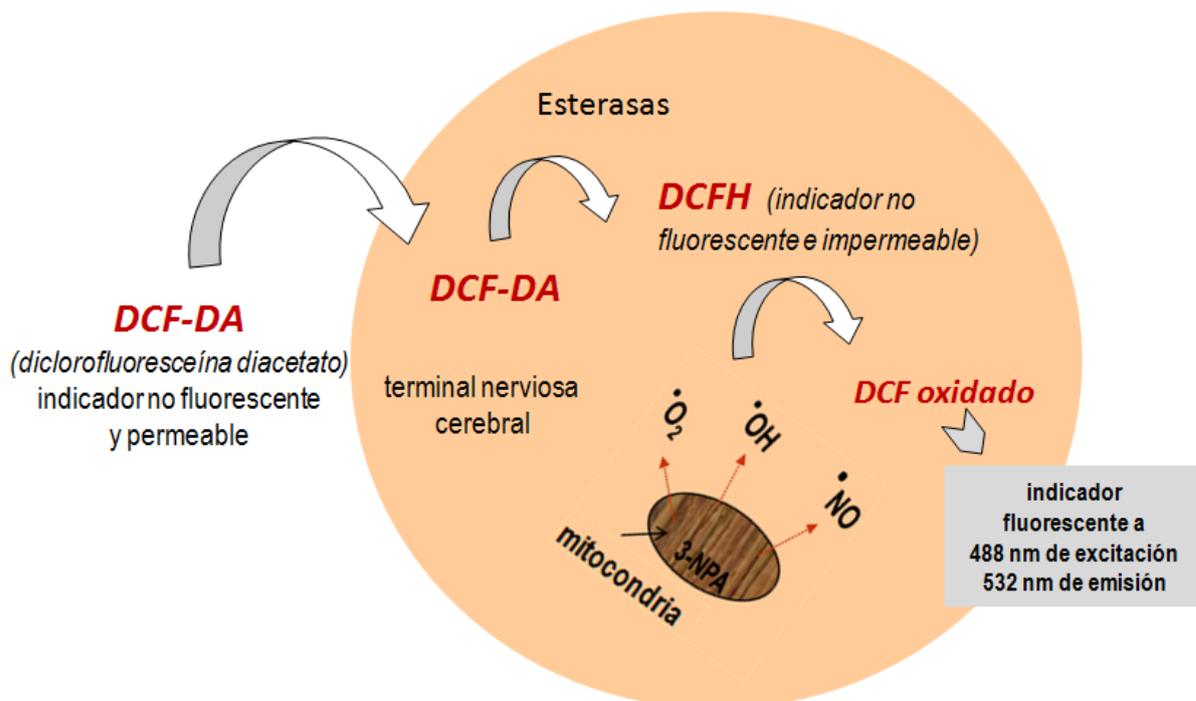


Fig. 8. Principio del método para determinar la cantidad de ROS

Se tomaron alícuotas (1.5 ml) de terminales nerviosas aisladas de estriado suspendidas en KRH ( $657 \pm 58 \mu\text{g/ml}$ ) o de cerebro completo (sin cerebelo) suspendidas en KRH ( $2996 \pm 56 \mu\text{g/ml}$ ) y se incubaron en la presencia o ausencia de 3-NPA (5 mM) durante 2 h a  $37^\circ\text{C}$ , en un baño de agua con agitación. Después del periodo de incubación, se tomó una alícuota de 100  $\mu\text{l}$  de cada tubo para determinar la cantidad de proteína por el método de Lowry. El volumen remanente (1400  $\mu\text{l}$ ) se mezcló con 100  $\mu\text{l}$  de una solución de DCF-DA 75  $\mu\text{M}$  (para obtener una concentración final de 5  $\mu\text{M}$ ), posteriormente se incubaron las muestras en la oscuridad durante 1 h a  $37^\circ\text{C}$ . Finalmente las muestras se centrifugaron a 6000 g por 10 min y el sobrenadante resultante de la centrifugación se utilizó para medir la señal fluorescente de DCF en un espectrómetro Perkin-Elmer LS50 a una longitud de onda de excitación de 488

nm y 532 nm de emisión. La concentración de DCF final se calculó por interpolación de los valores experimentales en una curva estándar de DCF incubada en paralelo con las muestras experimentales. Los resultados se expresaron como pmoles de DCF/mg de proteína sinaptosomal.

#### **4.5 Determinación de la formación de productos de DA-quinona en sinaptosomas**

Los productos de DA quinona se detectaron mediante la reducción del reactivo azul de nitrotetrazolio (NBT) (Paz y col. 1991). La oxidación de DA a pH fisiológico es lenta, pero en presencia de radicales libres se acelera la formación de DA-quinonas (DA-Q). Estas DA-Q se unen al grupo tiol de las proteínas presentes en las terminales nerviosas aisladas cerebrales, formando aductos quinoproteicos. Finalmente el NBT es oxidado en presencia de éstos aductos (DA-Q-SH) resultando en NBT reducido, que nos da una estimación de la cantidad de aductos quinoproteicos formados de manera indirecta, que cuantificamos mediante una señal fluorométrica.

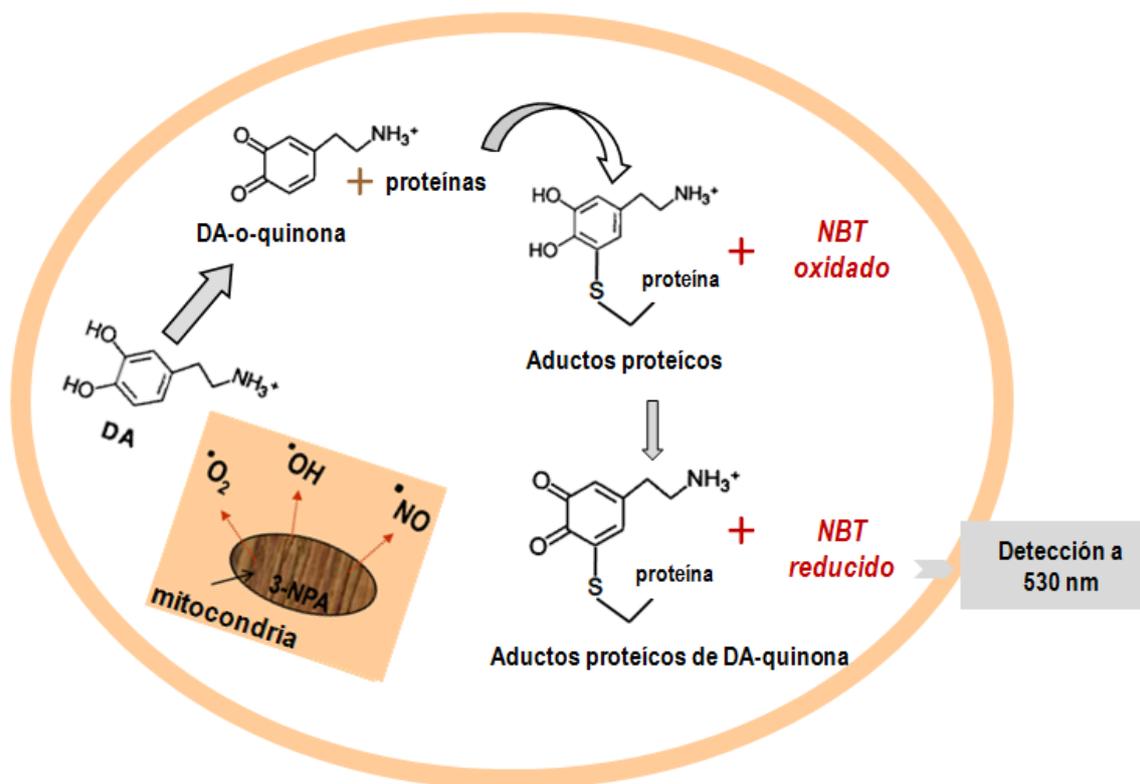


Fig. 9. Principio del método para cuantificar los aductos de DA-quinona

Alícuotas (700  $\mu$ l) de terminales nerviosas aisladas de estriado o de cerebro completo (sin cerebelo) se suspendieron en KRH (520 $\pm$ 29  $\mu$ g/ml y 2330 $\pm$ 80  $\mu$ g/ml, respectivamente) y se incubaron en la ausencia (grupo control) o en la presencia de 3NPA (5 mM) durante 2 h a 37 $^{\circ}$ C en un baño de agua con agitación. Después de este periodo de incubación, las muestras se centrifugaron a 12, 000 g por 10 min. El sobrenadante que resultó de esta centrifugación se eliminó y el pellet que contenía a las terminales nerviosas aisladas de estriado o de cerebro completo se resuspendieron en 1 ml de buffer frío de fosfatos 50 mM, pH 7.4. De cada muestra se tomó una alícuota de 100  $\mu$ l del pellet resuspendido y se utilizó para determinar la cantidad de proteína por el método de Lowry. El volumen remanente (900  $\mu$ l) se diluyó con un volumen igual del reactivo NBT (900  $\mu$ l) (que contenía 0.32 mM de NBT en glicinato de potasio 2 M a pH 10). La mezcla de la reacción se incubó en la

oscuridad durante 1 h a temperatura ambiente (22°C). Al final de la incubación, las muestras se centrifugaron a 12, 000 g por 10 min. La absorbencia del sobrenadante resultante de esta centrifugación se registró a 530 nm en un espectrofotómetro (modelo UNICO, Dayton, NJ, USA).

#### **4.6 Determinación de TBA-RS en sinaptosomas de estriado**

Las sustancias reactivas al ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS) se detectaron por el ensayo de TBA descrito por [Pérez-De la Cruz y col. \(2006\)](#) con pequeñas modificaciones. Este método se utiliza para determinar la peroxidación de lípidos mediante la cuantificación del cromógeno formado a través de la reacción del TBA con malondialdehído (MDA), un producto final de la peroxidación lipídica.

Brevemente, alícuotas (1 ml) de terminales nerviosas aisladas de estriado suspendidas en KRH ( $963 \pm 30 \mu\text{g/ml}$ ) se incubaron en la ausencia o presencia de 3NPA (5 mM) durante 2 h a 37°C en un baño de agua con agitación. Después de la incubación, una alícuota de 100  $\mu\text{l}$  se separó para determinar la cantidad de proteína por el método de Lowry. El volumen remanente (900  $\mu\text{l}$ ) de sinaptosomas de estriado suspendidos en KRH se mezcló con un volumen igual (900  $\mu\text{l}$ ) del reactivo de TBA (que contenía 375 mg TBA, 15 g de ácido tricloroacético y 2.5 ml de HCl concentrado disueltos en 100 ml de agua) y se incubaron durante 30 min en un baño de agua en ebullición. Después de este tiempo las muestras se pusieron en hielo durante 10 min y posteriormente se centrifugaron a 12, 000 g durante 15 min. La densidad óptica de los sobrenadantes que se obtuvieron de esta centrifugación se midió en un espectrofotómetro de la marca UNICO a una longitud de 532 nm. La

concentración final de los TBA-RS se calculó mediante la interpolación de los valores experimentales en una curva estándar de MDA incubada en paralelo con las muestras experimentales. Los resultados se expresaron como nmoles de MDA/mg de proteína sinaptosomal.

#### **4.7 Determinación de los niveles de catecolaminas estriales *ex-vivo***

En este set de experimentos se utilizaron 8 ratas macho de la cepa Wistar. La mitad de los animales recibieron una inyección intraperitoneal de solución salina (grupo control) y la otra mitad recibió 3-NPA (50 mg/kg i.p.). Los animales que después de 90 min de la inyección de 3-NPA no presentaban alguna alteración motora, se les administró una dosis adicional de 3-NPA (20 mg/kg i.p.) para evidenciar las alteraciones conductuales. Todos los animales se decapitaron dentro de las 2 primeras horas después de la inyección de solución salina o de 3-NPA, se disecó el estriado y se homogenizó en una mezcla de PCA/EDTA. Los homogenados de estriado se centrifugaron posteriormente a 14000 g por 10 min. Los sobrenadantes resultantes de esta centrifugación se transfirieron a viales limpios y se inyectaron en el sistema HPLC de Waters para el análisis de catecolaminas. Los pellets resultantes se utilizaron para determinar la cantidad de proteína por el método de Lowry.

## 5. RESULTADOS

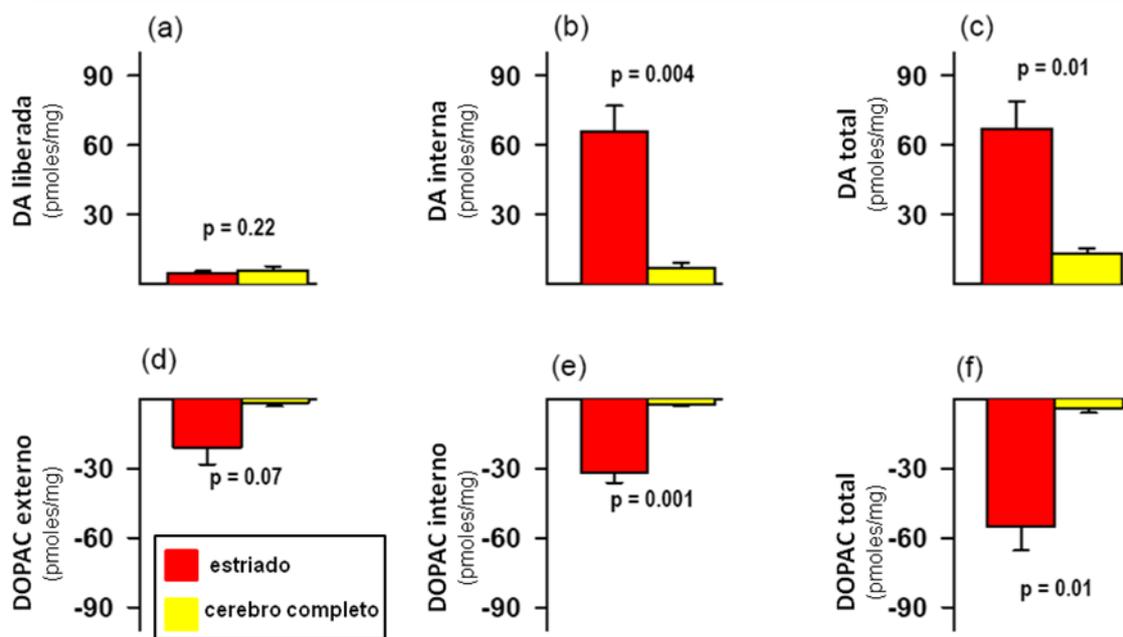
### ESTUDIO I.

#### 5.1.1 Comparación del efecto del 3-NPA sobre la distribución de DA y DOPAC dentro y fuera de las terminales nerviosas aisladas de estriado o aisladas de cerebro completo.

Los cambios netos producidos por el 3-NPA sobre las concentraciones de DA y DOPAC dentro y fuera de las terminales nerviosas aisladas de estriado y de cerebro completo en condiciones de reposo durante 10 min de incubación se compararon. Los cambios netos se refieren a las concentraciones de catecolaminas bajo una condición experimental específica menos el valor del control respectivo. La liberación basal de DA aumentó ligeramente sobre los valores control, tanto en las terminales nerviosas aisladas de estriado como en las aisladas de cerebro completo expuestas al 3-NPA por 10 min (Fig. 10a). Sin embargo, el marcado aumento en la concentración de DA interna producida por el 3-NPA durante 10 min de incubación en los sinaptosomas de estriado, contrasta con el modesto aumento en la concentración de DA interna producida por el 3-NPA durante 10 min en los sinaptosomas de cerebro completo (Fig. 10b). Interesantemente, el aumento en la DA observado particularmente en sinaptosomas de estriado inducido por el 3-NPA, se acompañó por una disminución en la concentración de DOPAC, tanto fuera como dentro de las terminales nerviosas aisladas (Figs. 10d y 10e).

Las concentraciones de DA y DOPAC en las terminales nerviosas aisladas de estriado es aproximadamente 5 veces mayor que las concentraciones en las terminales nerviosas aisladas de cerebro completo; alrededor de 400

(sinaptosomas de estriado) y 80 (sinaptosomas de cerebro completo) pmoles/mg de proteína sinaptosomal.



**Fig.10. Cambios netos sobre las concentraciones internas y externas de DA y DOPAC inducidos por el 3-NPA durante 10 min bajo condiciones de reposo.** Sinaptosomas de estriado (barras rojas) o de cerebro completo (barras amarillas) se incubaron (37°C) por 10 min en: un buffer de HEPES oxigenado en ausencia y presencia de 3-NPA (5 mM). La incubación se detuvo por centrifugación. Las muestras conteniendo las catecolaminas liberadas o retenidas se prepararon para análisis por HPLC. Los cambios netos en (a) DA liberada, (b) DA retenida, (c) DA total, (d) DOPAC externo, (e) DOPAC interno y (f) DOPAC total, se refiere a la concentración de las catecolaminas en presencia de 3-NPA menos el valor de la concentración del control respectivo (p.ej. obtenido en paralelo en sinaptosomas incubados sin 3-NPA). Los datos son expresados en pmoles de DA (barras superiores) o DOPAC (barras inferiores) por mg de proteína sinaptosomal. Los resultados son la media  $\pm$  ESM de los valores de 10 preparaciones sinaptosomales de estriado y 4 de cerebro completo. La significancia estadística entre el cambio neto de las catecolaminas inducido por el 3-NPA en sinaptosomas de estriado y cerebro completo se indica en cada gráfica.

### 5.1.2 Efecto del 3-NPA sobre la exocitosis de DA en terminales nerviosas aisladas de estriado

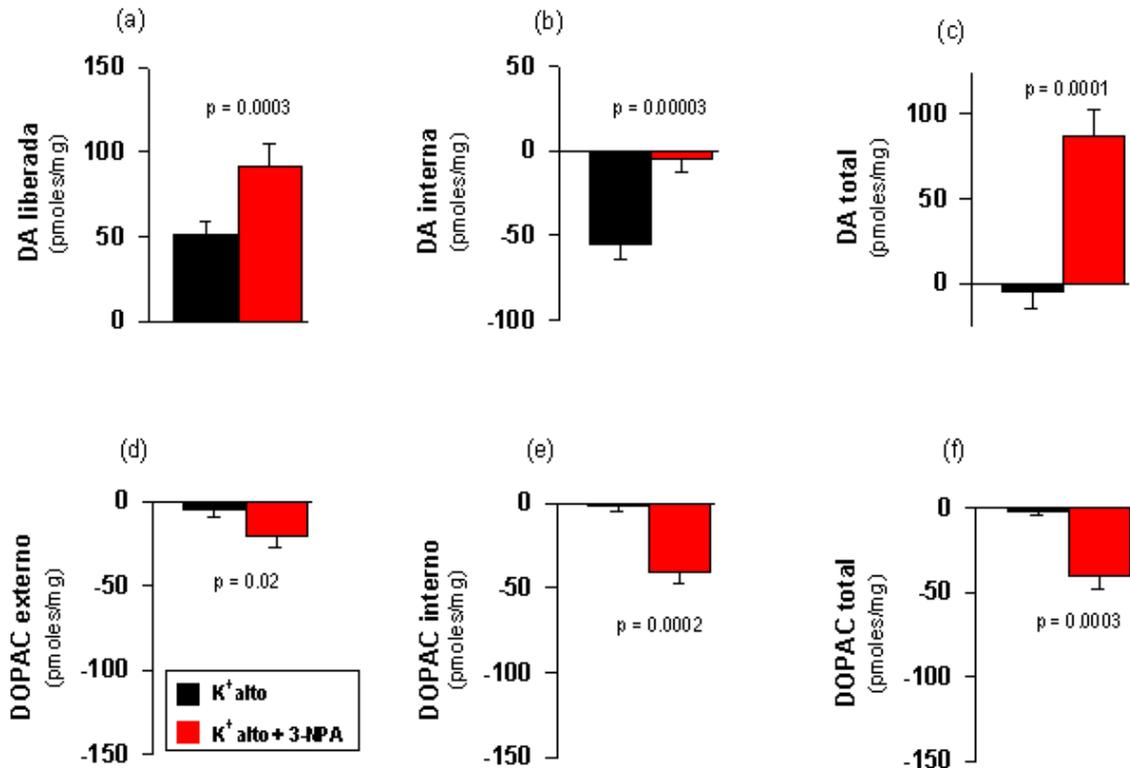
Se investigó el efecto del 3-NPA sobre la distribución de DA y DOPAC bajo condiciones de despolarización con  $K^+$  alto (30 mM) en terminales nerviosas aisladas de estriado durante una incubación de 10 min.

La concentración de DA externa ( $74 \pm 6$  pmoles/mg de proteína sinaptosomal) en las terminales nerviosas aisladas de estriado incubadas con una concentración de  $K^+$  alto (30 mM), es 3 veces más alta que la concentración de DA en las terminales nerviosas incubadas bajo condiciones de reposo ( $20 \pm 1$  pmoles/mg de proteína sinaptosomal). Contrariamente, la concentración de DA interna en las terminales nerviosas aisladas de estriado incubadas con  $K^+$  alto ( $363 \pm 33$  pmoles/mg de proteína sinaptosomal) es más baja que la concentración de DA interna en las terminales nerviosas aisladas de estriado incubadas en condiciones de reposo ( $420 \pm 30$  pmoles/mg de proteína sinaptosomal). Dado que la DA liberada al medio externo se perdió dentro de los sinaptosomas, la concentración de DA total en los sinaptosomas despolarizados con  $K^+$  alto permaneció sin cambios con respecto a los sinaptosomas no despolarizados. Los cambios netos producidos con  $K^+$  alto (es decir, menos los valores control basales) sobre la DA liberada, la interna y la total, se muestran en las barras negras de las figuras 11a, 11b y 11c, respectivamente.

Interesantemente, el 3-NPA potenció la liberación de DA inducida por  $K^+$  alto: la liberación neta de DA por  $K^+$  alto fue de  $54 \pm 7$  pmoles/mg de proteína sinaptosomal, para el 3-NPA fue de  $4.5 \pm 1.0$  pmoles/mg de proteína sinaptosomal y para  $K^+$  alto en la presencia de 3-NPA fue de  $102 \pm 12$

pmoles/mg de proteína sinaptosomal. Los cambios netos producidos por  $K^+$  alto en combinación con 3-NPA sobre la DA liberada y la DA interna se muestran en las barras cafés de las figuras 10a y 10b, respectivamente. Dado que la disminución en la concentración de DA interna producida por  $K^+$  alto no se produjo con  $K^+$  alto en combinación con 3-NPA (Fig. 11b), la concentración total de DA aumentó en los sinaptosomas despolarizados en la presencia de 3-NPA (barra café en la Fig. 11c).

De acuerdo con hallazgos previos en sinaptosomas de estriado (Trejo y col. 2001), la concentración de DOPAC no se modifica por despolarización con  $K^+$  alto; en la figura 11, las barras negras de la parte inferior muestran la concentración neta de DOPAC (menos el valor control) en sinaptosomas expuestos a alto  $K^+$ . Sin embargo, en sinaptosomas despolarizados con  $K^+$  alto y expuestos simultáneamente a 3-NPA, se produjo nuevamente una disminución de DOPAC. Las barras café de las figuras 11d, 11e y 11f indican los cambios netos ejercidos por  $K^+$  alto en combinación con 3-NPA sobre las concentraciones externas, internas y totales de DOPAC, respectivamente.



**Fig.11. Cambios netos sobre las concentraciones internas y externas de DA y DOPAC inducidos por despolarización con  $K^+$  alto en ausencia y presencia de 3-NPA en terminales nerviosas aisladas de estriado.** Se incubaron sinaptosomas de estriado (37°C) por 10 min en: un buffer de HEPES oxigenado en ausencia y presencia de 3-NPA (5 mM) o en KRH modificado con  $K^+$  alto (30 mM) en ausencia o presencia de 3-NPA. Las barras negras se refieren al cambio en la concentración de catecolaminas inducido por  $K^+$  alto menos el valor del control respectivo (obtenido en sinaptosomas incubados en KRH). Las barras rojas se refieren al cambio en la concentración de catecolaminas inducido por  $K^+$  alto en la presencia de 3-NPA menos el valor del control respectivo (obtenido en sinaptosomas incubados en KRH con 3-NPA). Los datos son expresados en pmoles de la catecolamina indicada por mg de proteína sinaptosomal. Los resultados son la media  $\pm$  ESM de los valores de 8 experimentos en preparaciones independientes. La significancia estadística entre los cambios inducidos por  $K^+$  alto en ausencia y presencia de 3-NPA se indica en cada gráfica.

### 5.1.3 Efecto del 3-NPA sobre la producción de ROS en terminales nerviosas aisladas de estriado y de cerebro completo

El método fluorescente con DCF-diacetato, que detecta la producción de ROS y es comúnmente usado como un índice de estrés oxidante, se realizó en terminales nerviosas aisladas de estriado y de cerebro completo de rata incubadas en la presencia y ausencia de 3-NPA (5 mM) durante 2 h bajo condiciones de reposo.

A juzgar por el producto fluorescente formado por la oxidación de DCFH, la producción de ROS (estandarizado por mg de proteína sinaptosomal) es de 4 veces más alta en los sinaptosomas de estriado que en los sinaptosomas de cerebro completo. La presencia de 3-NPA en el medio de incubación incrementó aun más la producción de los ROS, tanto en sinaptosomas de estriado como en sinaptosomas de cerebro completo. Sin embargo, el aumento neto de ROS inducido por el 3-NPA es más alto en los sinaptosomas de estriado que en los sinaptosomas de cerebro completo (tabla 3).

*Tabla 3. Efecto del 3NPA sobre la producción de ROS en terminales nerviosas aisladas de estriado y de cerebro completo*

terminales nerviosas aisladas de	condición experimental	ROS <sup>§</sup>	cambio neto por 3NPA
estriado <sup>€</sup>	<i>control</i>	117 ± 8	
	<i>3-NPA</i>	163 ± 14 <sup>**</sup>	85 ± 11
cerebro completo <sup>¥</sup>	<i>control</i>	26 ± 2	
	<i>3-NPA</i>	42 ± 3 <sup>*</sup>	16 ± 4

<sup>§</sup> Los ROS son expresados en pmoles de DCF/mg de proteína sinaptosomal

<sup>\*\*</sup>  $P \leq 0.002$  entre el grupo control y sinaptosomas de estriado en presencia de 3-NPA

<sup>\*</sup>  $P \leq 0.01$  entre el grupo control y sinaptosomas de cerebro completo en presencia de 3-NPA

<sup>€</sup> Los resultados son la media ± ESM de 5 experimentos independientes en sinaptosomas de estriado

<sup>¥</sup> Los resultados son la media ± ESM de 4 experimentos independientes en sinaptosomas de cerebro completo

#### 5.1.4 Efecto del 3-NPA sobre la formación de productos de DA-quinona en sinaptosomas de estriado y de cerebro completo

El efecto del 3-NPA sobre la formación de productos DA-quinonas se midió en terminales nerviosas aisladas de estriado y de cerebro completo a 530 nm usando una modificación del método NBT/glicinato (Paz y col. 1991) descrito en la sección de métodos.

La cantidad de aductos quinoproteicos formados durante una incubación larga (2 h) en sinaptosomas de estriado bajo condiciones de reposo es aproximadamente 8 veces mayor que la cantidad de aductos quinoproteicos formados en los sinaptosomas de cerebro completo, además esta cantidad de aductos se incrementa aún más por la presencia de 3-NPA en el medio de incubación, particularmente en los sinaptosomas de estriado (tabla 4). En la última columna de la tabla 4 se observa que el aumento neto en la formación de aductos quinoproteicos inducido por el 3-NPA es 10 veces mayor en sinaptosomas de estriado que en sinaptosomas de cerebro completo.

*Tabla 4. Producción de aductos quinoproteicos en terminales nerviosas aisladas de estriado y de cerebro completo en presencia y ausencia de 3-NPA*

terminales nerviosas	condición	productos	cambio neto
aisladas de	<i>experimental</i>	de DA-quinona <sup>§</sup>	del 3-NPA
estriado <sup>€</sup>	<i>control</i>	0.190 ± 0.023	
	<i>3-NPA</i>	0.312 ± 0.039 <sup>**</sup>	0.122 ± 0.018
cerebro completo <sup>¥</sup>	<i>control</i>	0.023 ± 0.001	
	<i>3-NPA</i>	0.035 ± 0.003 <sup>*</sup>	0.012 ± 0.003

<sup>§</sup> Los productos de DA-quinona son expresados como la absorbancia a 530 nm/mg de proteína sinaptosomal

<sup>\*\*</sup>  $P \leq 0.0001$  entre el grupo control y sinaptosomas de estriado en presencia de 3-NPA

<sup>\*</sup>  $P \leq 0.02$  entre el grupo control y sinaptosomas de cerebro completo en presencia de 3-NPA

<sup>€</sup> Los resultados son la media ± ESM de 5 experimentos independientes en sinaptosomas de estriado

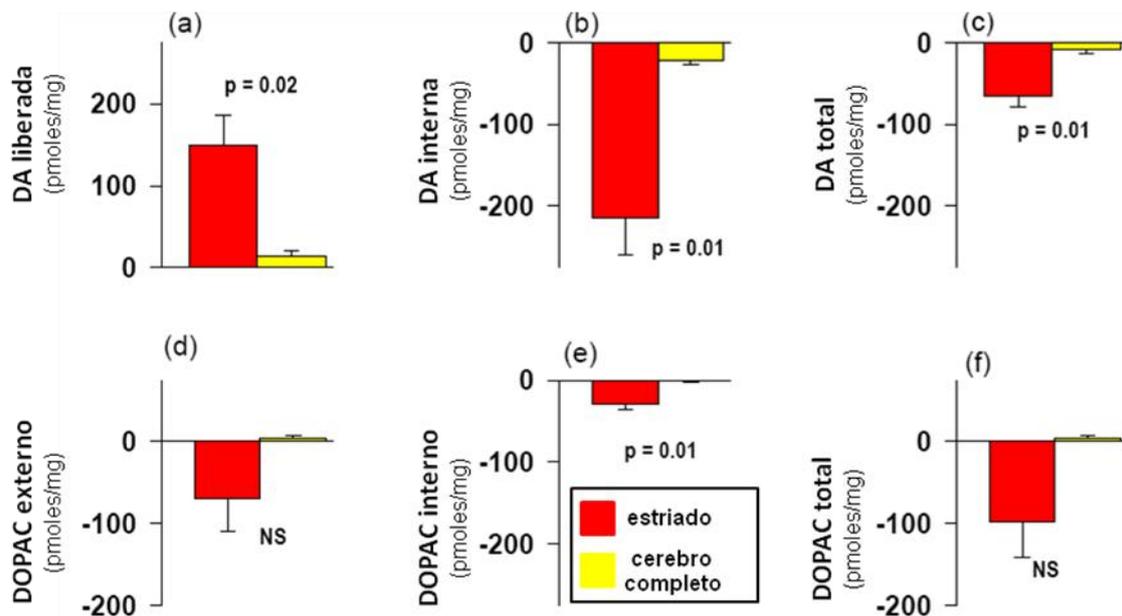
<sup>¥</sup> Los resultados son la media ± ESM de 4 experimentos independientes en sinaptosomas de cerebro completo

### **5.1.5 Efecto del 3-NPA a largo plazo sobre la distribución de DA y DOPAC dentro y fuera de las terminales nerviosas aisladas de estriado y de cerebro completo bajo condiciones de reposo**

En comparación con los cambios netos ejercidos por el 3-NPA sobre la distribución de catecolaminas en las terminales nerviosas aisladas de estriado durante 2 h (barras rojas), los cambios netos ejercidos por el 3-NPA sobre la distribución de catecolaminas en las terminales nerviosas aisladas de cerebro completo fueron muy pequeños (barras amarillas en la Fig. 12).

Los cambios netos en la distribución de DA ejercidos por el 3-NPA en las terminales nerviosas aisladas de estriado durante 2 h se observan en las gráficas superiores de la figura 12. Estos cambios contrastan con los cambios netos ejercidos por el 3-NPA durante 10 min de incubación. Por ejemplo, el aumento en la liberación de DA observado en sinaptosomas estriatales expuestos al 3-NPA durante 2 h (Fig. 12a), contrasta con el modesto aumento en la liberación de DA ejercido por el 3-NPA durante 10 min (Fig. 10a), y la disminución en la concentración de DA interna observada en sinaptosomas estriatales expuestos al 3-NPA durante 2 h (Fig. 12b) contrasta con el marcado aumento en la concentración de DA interna producido por el 3-NPA después de 10 min de incubación (Fig. 10b).

Interesantemente, aunque la concentración de DA total disminuyó incluso después de 2 h de exposición al 3-NPA (Fig. 12c), la disminución en la concentración de DOPAC total observado en las terminales nerviosas aisladas de estriado después de 10 min de exposición al 3-NPA (Fig 10f) se sigue observado después de 2 h de exposición al 3-NPA (Fig. 12f).



**Fig. 12. Cambios netos sobre la distribución de DA y DOPAC inducidos por el 3-NPA después de 120 min de incubación bajo condiciones de reposo.** Se incubaron sinaptosomas de estriado (barras rojas) y de cerebro completo (barras amarillas) (37°C) durante 120 min en: un buffer de HEPES oxigenado en ausencia y presencia de 3-NPA (5 mM). En la gráfica se observan los cambios netos inducidos por el 3-NPA menos el valor de la concentración del control respectivo (p.ej. obtenido en paralelo en sinaptosomas incubados sin 3-NPA) de: (a) DA liberada, (b) DA retenida, (c) DA total, (d) DOPAC externo, (e) DOPAC interno y (f) DOPAC total, durante 2 h. Los datos son expresados en pmoles de DA (barras superiores) o DOPAC (barras inferiores) por mg de proteína sinaptosomal. Los resultados son la media  $\pm$  ESM de los valores de 4 preparaciones sinaptosomales de estriado o de cerebro completo. La significancia estadística entre el cambio neto de las catecolaminas inducido por el 3-NPA en sinaptosomas de estriado y cerebro completo se indica en cada gráfica.

### 5.1.6 Cambios en la concentración de catecolaminas en el estriado se acompañan de alteraciones motoras inducidos por el 3-NPA *in vivo*

Dos de los cuatro animales inyectados con 3-NPA (50 mg/kg, i.p.) presentaron signos muy marcados de daño motor dentro de los primeros 30 min después de haber recibido la inyección de 3-NPA. En los otros dos animales administrados con 3-NPA (50 mg/kg, i.p.) no se observó signos de alteración motora después de 90 min. Por lo tanto, estos animales se inyectaron con una dosis adicional de 3-NPA (20 mg/kg, i.p.). Después de esta inyección estos dos animales también desarrollaron alteraciones motoras evidentes dentro de los siguientes 30 min. A juzgar por sus pesos (274 y 248 g), los dos animales que presentaron las alteraciones motoras con una sola dosis de 3-NPA (50 mg/kg, i.p.) fueron los animales más viejos. Los animales más jóvenes (pesando 210 y 208 g) presentaron las mismas alteraciones motoras después de la dosis adicional de 3-NPA (20 mg/kg, i.p.). En los cuatro animales control inyectados en paralelo con solución salina, no se observó ninguna alteración motora. El peso de los animales control fueron: 239, 268, 217 y 203 g.

La concentración de DA total en los homogenados de estriado de animales inyectados con 3-NPA, no cambió en comparación con los animales inyectados con solución salina (grupo control) (tabla 5). Sin embargo, en homogenados de estriado de animales inyectados con 3-NPA, la concentración total de los metabolitos de DA, DOPAC y HVA, se incrementó al doble de la concentración de los homogenados de estriado de los animales control. Es importante mencionar que HVA no se detectó en sinaptosomas estriatales.

*Tabla 5. Efecto del 3-NPA sobre las concentraciones de catecolaminas<sup>§</sup> en homogenados de estriado ex-vivo.*

	control	3-NPA	*
DA	277 ± 11	301 ± 15	0,11
DOPAC	38 ± 3.2	69 ± 3.3	0,0003
HVA	32 ± 2.1	52 ± 6.3	0,01

<sup>§</sup> Los datos son expresados en pmoles/mg de homogenado de estriado

Los resultados son la media ± ESM de 4 animales control y 4 inyectados con 3-NPA

\* Significacncia estadística entre los animales control y los inyectados con 3-NPA

## **SEGUNDA PARTE EXPERIMENTAL**

Como en el estriado se encuentra la mayor concentración de DA y los radicales libres generados por el 3-NPA pueden propiciar la oxidación de DA generando DA-quinonas (u otros metabolitos más tóxicos), y éstas quinonas a su vez pueden inhibir a otros complejos de la cadena de transporte de electrones, exacerbando así el daño oxidativo. En éste segundo trabajo investigamos el efecto de la vinpocetina, un fármaco con posible efecto neuroprotector, sobre los cambios en la distribución de DA y el estrés oxidativo inducidos por la toxina mitocondrial en las terminales nerviosas aisladas de estriado, con la finalidad de proponer una estrategia experimental que disminuya o atenúe el daño oxidativo inducido por el 3-NPA. Y finalmente, comparamos el efecto de la vinpocetina con el efecto del  $\alpha$ -tocoferol, un compuesto con propiedades antioxidantes, sobre el estrés oxidativo que induce el 3-NPA en sinaptosomas de estriado.

## RESULTADOS

### ESTUDIO II

#### 5.1.7 Efectos simples y combinados de vinpocetina y 3-NPA sobre la distribución de DA y DOPAC

La vinpocetina no cambia la liberación basal de DA pero disminuye marcadamente la concentración de DA interna. Adicionalmente a ésta caída en la concentración de DA interna, la vinpocetina aumentó las concentraciones de DOPAC interno y externo (primeras dos columnas en la tabla 6). Por su parte, el 3-NPA incrementó la concentración de DA interna y disminuyó al DOPAC, como se indica en la tercer columna de la tabla 6. Interesantemente, el aumento en la DA interna que indujo el 3-NPA se restableció por efecto de la vinpocetina (última columna en la tabla 6).

**Tabla 6. Efectos simples y combinados de vinpocetina y 3-NPA sobre la distribución de DA y DOPAC en terminales nerviosas aisladas de estriado incubadas por 10 min**

	control	vinpocetina	3-NPA	vinpocetina + 3-NPA
<i>DA liberada</i>	20 ± 1.3	17 ± 0.9	26 ± 1.7	31 ± 2.8 <sup>c</sup>
<i>DA retenida</i>	420 ± 30	256 ± 18 <sup>a</sup>	508 ± 37 <sup>b</sup>	346 ± 27 <sup>c</sup>
<i>DA total</i>	441 ± 31	273 ± 18 <sup>a</sup>	534 ± 39 <sup>b</sup>	377 ± 29 <sup>c</sup>
<i>DOPAC externo</i>	321 ± 45	423 ± 48 <sup>a</sup>	309 ± 35	378 ± 42 <sup>c</sup>
<i>DOPAC interno</i>	157 ± 39	197 ± 47 <sup>a</sup>	125 ± 32 <sup>b</sup>	141 ± 37
<i>DOPAC total</i>	477 ± 82	620 ± 91 <sup>a</sup>	434 ± 64	519 ± 76

*Los datos son expresados en pmoles/mg de proteína sinaptosomal*

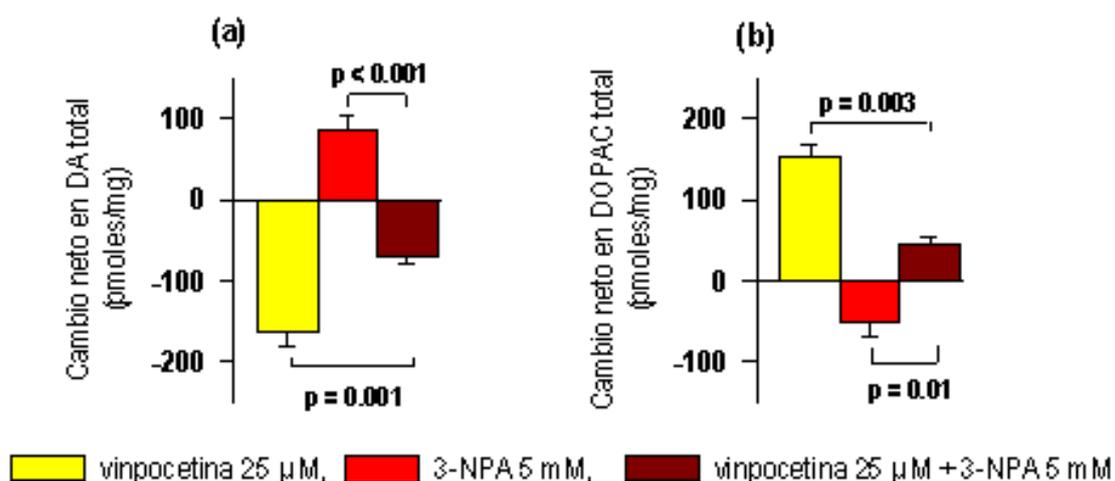
*Los resultados son la media ± ESM de 5 preparaciones sinaptosomales de estriado*

<sup>a</sup>  $p \leq 0.01$  entre el grupo control y vinpocetina

<sup>b</sup>  $p \leq 0.03$  entre el grupo control y 3-NPA

<sup>c</sup>  $p \leq 0.02$  entre el grupo control y vinpocetina + 3-NPA

Los cambios netos en las concentraciones de DA y DOPAC totales bajo cada condición experimental específica, llamadas vinpocetina, 3-NPA o ambas, se calcularon. Los cambios netos se refieren a las concentraciones de catecolaminas bajo una condición experimental específica menos el valor del respectivo control. Los cambios netos en DA y DOPAC totales que induce el 3-NPA en combinación con vinpocetina (barras café en las Figs. 13a y 13b, respectivamente) son similares a aquellos ejercidos con vinpocetina sola (barras amarillas en las Figs. 13a y 13b, respectivamente).



**Fig 13. Efecto neto de vinpocetina sobre los cambios inducidos por el 3-NPA en las concentraciones de DA y DOPAC totales durante 10 min.** Sinaptosomas de estriado fueron incubados (37°C) por 10 min en: KRH con vinpocetina (25  $\mu$ M), KRH con 3-NPA (5 mM), o KRH con vinpocetina y 3-NPA. Los cambios netos en (a) DA total y (b) DOPAC total se refiere a la concentración de la catecolamina en la presencia de vinpocetina, 3-NPA o ambos (vinpocetina+3NPA) menos el valor de la concentración del respectivo control. Los datos se expresaron en pmoles de DA o DOPAC por mg de proteína sinaptosomal estriatal. Los resultados son la media  $\pm$  ESM de los valores de 5 preparaciones sinaptosomales de estriado. La significancia estadística de los cambios netos de las catecolaminas entre vinpocetina o 3-NPA y vinpocetina+3-NPA se indica en cada gráfica.

### 5.1.8 Efectos simples y combinados de $\alpha$ -tocoferol y 3-NPA sobre la distribución de DA y DOPAC

Se midieron los efectos de  $\alpha$ -tocoferol solo y en combinación con el 3-NPA sobre: la distribución de DA y DOPAC externo, interno y total en terminales nerviosas aisladas de estriado. Como en el caso de vinpocetina, el  $\alpha$ -tocoferol no modificó la liberación basal de DA endógena, pero disminuyó la concentración de DA interna, aunque las concentraciones de DOPAC no se modificaron por la presencia de  $\alpha$ -tocoferol (primeras dos columnas de la tabla 7). Similarmente a la vinpocetina, el  $\alpha$ -tocoferol inhibió el aumento de DA interna que induce el 3-NPA, pero sin modificar la concentración de DOPAC (última columna en la tabla 7).

**Tabla 7. Efectos simples y combinados del tocoferol y 3-NPA sobre la distribución de DA y DOPAC en terminales nerviosas aisladas de estriado incubadas por 10 min**

	control	tocoferol	3-NPA	tocoferol + 3-NPA
<i>DA liberada</i>	18 ± 0.8	19 ± 1.6	25 ± 0.8 <sup>b</sup>	29 ± 1.9 <sup>c</sup>
<i>DA retenida</i>	431 ± 42	331 ± 14 <sup>a</sup>	502 ± 37 <sup>b</sup>	404 ± 32
<i>DA total</i>	448 ± 42	351 ± 15 <sup>a</sup>	527 ± 37 <sup>b</sup>	433 ± 31
<i>DOPAC externo</i>	289 ± 41	312 ± 43	278 ± 33	283 ± 38
<i>DOPAC interno</i>	116 ± 19	117 ± 17	87 ± 13 <sup>b</sup>	84 ± 12 <sup>c</sup>
<i>DOPAC total</i>	405 ± 60	429 ± 59	365 ± 45	368 ± 49

*Los datos son expresados en pmoles/mg de proteína sinaptosomal*

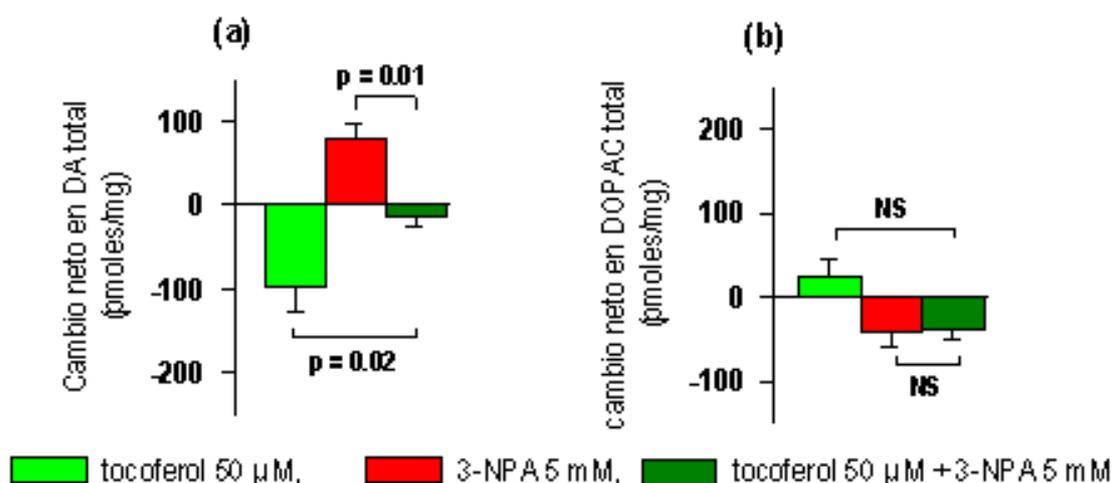
*Los resultados son la media ± ESM de 4 preparaciones sinaptosomales de estriado*

<sup>a</sup>  $p \leq 0.01$  entre el grupo control y tocoferol

<sup>b</sup>  $p \leq 0.02$  entre el grupo control y 3-NPA

<sup>c</sup>  $p \leq 0.002$  entre el grupo control y tocoferol + 3-NPA

El aumento neto en la concentración de DA total que induce el 3-NPA, se inhibió por la presencia de  $\alpha$ -tocoferol (barras verde oscuro en la Fig. 14a), pero no inhibió la disminución en la concentración de DOPAC total (barras verde oscuro en la Fig. 14b).



**Fig 14. Efecto neto de  $\alpha$ -tocoferol sobre los cambios inducidos por el 3-NPA en las concentraciones de DA y DOPAC totales durante 10 min.** Sinaptosomas de estriado se incubaron a 37°C por 10 min en presencia o ausencia de  $\alpha$ -tocoferol (50  $\mu$ M), 3-NPA (5mM), o la combinación de ambos ( $\alpha$ -tocoferol+3-NPA). El valor del cambio neto en: (a) DA total y (b) DOPAC total se refiere a la concentración de la catecolamina en la presencia de  $\alpha$ -tocoferol, 3-NPA o ambos ( $\alpha$ -tocoferol+3-NPA) menos el valor de la concentración del respectivo control. Los datos son expresados en pmoles de DA o DOPAC por mg de proteína sinaptosomal estriatal. Los resultados son la media  $\pm$  ESM de los valores de 4 preparaciones sinaptosomales de estriado. La significancia estadística de los cambios netos de las catecolaminas entre  $\alpha$ -tocoferol o 3-NPA y  $\alpha$ -tocoferol+3-NPA se indica en cada gráfica.

### 5.1.9 Comparación del efecto de vinpocetina y $\alpha$ -tocoferol sobre el aumento en la formación de productos de DA-quinona inducido por el 3-NPA

El efecto de vinpocetina y  $\alpha$ -tocoferol en ausencia o presencia de 3-NPA sobre la formación de productos de DA-quinona en terminales nerviosas aisladas de estriado se estimó a 530 nm usando una modificación del método de NBT/glicinato (Paz y col. 1991) descrito en la sección de métodos.

La cantidad de productos de DA-quinona formados en terminales nerviosas aisladas de estriado durante 2 h aumentó cerca del 60% la cantidad de aquellos productos formados por la presencia de 3-NPA (5 mM) en el medio de incubación (tabla 8). Además, vinpocetina sola y  $\alpha$ -tocoferol solo no modificó la formación de productos de DA-quinona. Interesantemente, el aumento de productos de DA-quinona inducido por el 3-NPA se inhibió completamente por la presencia simultánea de vinpocetina (25  $\mu$ M) o  $\alpha$ -tocoferol (50  $\mu$ M) en el medio de incubación (tabla 8).

**Tabla 8. Efectos simples y combinados de vinpocetina, tocoferol y 3-NPA sobre la formación de aductos quinoproteicos en terminales nerviosas aisladas de estriado**

condición experimental	productos de <sup>§</sup> DA-quinona	valor de P entre la condición experimental indicada	
(a) control	0.189 ± 0.03		
(b) 3-NPA	0.310 ± 0.05	(a) vs (b)	<0.001
(c) VPC	0.179 ± 0.03	(a) vs (c) NS	(c) vs (d) NS
(d) VPC + 3NPA	0.173 ± 0.03	(a) vs (d) NS	(b) vs (d) <0.001
(e) tocoferol	0.187 ± 0.03	(a) vs (e) NS	(e) vs (f) NS
(f) tocoferol + 3NPA	0.195 ± 0.04	(a) vs (f) NS	(b) vs (f) 0,002

<sup>§</sup>Los aductos quinoproteicos son expresados como la absorbancia a 530 nm/mg de proteína sinaptosomal. Los resultados son la media ± ESM de 4 experimentos independientes en sinaptosomas de estriado. NS, no hay diferencia estadísticamente significativa. 3-NPA, ácido 3-nitropropiónico; VPC, vinpocetina; DA, dopamina

## 5.2.0 Comparación del efecto de vinpocetina y $\alpha$ -tocoferol sobre el aumento en la producción de ROS inducido por el 3-NPA

El ensayo fluorescente de DCF-DA detecta la producción de ROS y es un método comúnmente usado como un índice de estrés oxidativo. Este método se realizó en terminales nerviosas aisladas de estriado incubadas con vinpocetina o  $\alpha$ -tocoferol en ausencia o presencia de 3-NPA (5 mM) durante 2 h.

Los productos fluorescentes formados por la oxidación de DCFH son un estimado de los ROS producidos (estandarizados por mg de proteína sinaptosomal). Los sinaptosomas de estriado expuestos al 3-NPA incrementan la cantidad de los ROS producidos cerca de un 40% sobre el valor control

(tabla 9). Además, vinpocetina y  $\alpha$ -tocoferol disminuyeron la producción de ROS por debajo de los niveles basales, 25% y 35% respectivamente. Interesantemente, ambos fármacos, vinpocetina y  $\alpha$ -tocoferol, inhibieron el aumento de los ROS producidos por el 3-NPA en sinaptosomas de estriado (tabla 9).

**Tabla 9. Efectos simples y combinados de vinpocetina, tocoferol y 3-NPA sobre la producción de ROS en terminales nerviosas aisladas de estriado**

condición experimental	<sup>§</sup> ROS	valor de P entre las condiciones experimentales indicadas	
(a) control	117 ± 8.7		
(b) 3-NPA	164 ± 14	(a) vs (b) 0,001	
(c) VPC	86 ± 8.1	(a) vs (c) 0,02	(c) vs (d) 0,001
(d) VPC + 3NPA	132 ± 14	(a) vs (d) NS	(b) vs (d) 0,02
(e) tocoferol	73 ± 14	(a) vs (e) 0,004	(e) vs (f) 0,001
(f) tocoferol + 3NPA	124 ± 20	(a) vs (f) NS	(b) vs (f) 0,01

<sup>§</sup> Los ROS son expresados en pmoles de diclorofluoresceína/mg de proteína sinaptosomal  
 Los resultados son la media ± ESM de 5 experimentos independientes en sinaptosomas de estriado  
 NS, no hay diferencia estadísticamente significativa  
 3-NPA, ácido 3-nitropropiónico; VPC, vinpocetina; ROS, especies reactivas de oxígeno

### 5.2.1 Comparación del efecto de vinpocetina y $\alpha$ -tocoferol sobre el aumento en la generación de TBARS inducido por el 3-NPA

La peroxidación de lípidos se midió en las terminales nerviosas aisladas de estriado mediante la cuantificación de sustancias reactivas al TBA (TBARS),

éste ensayo es comúnmente utilizado como un índice de oxidación a los lípidos de membrana.

La formación de TBARS (estandarizados por mg de proteína sinaptosomal) se midió en sinaptosomas de estriado incubados con vinpocetina (25  $\mu$ M) o  $\alpha$ -tocoferol (50  $\mu$ M) en la ausencia o en presencia de 3-NPA (5 mM). El 3-NPA aumentó la producción de TBARS aproximadamente un 37% sobre el valor control (tabla 10). Por otra parte, vinpocetina disminuyó la producción de TBARS por debajo del valor control, y el aumento en la producción de TBARS inducido por el 3-NPA se inhibió por la incubación simultánea de vinpocetina (25  $\mu$ M) o  $\alpha$ -tocoferol (50  $\mu$ M) (tabla 10).

**Tabla 10. Efectos simples y combinados de vinpocetina, tocoferol y 3-NPA sobre la formación de TBA-RS en terminales nerviosas aisladas de estriado**

condición experimental	$\text{TBARS}^{\S}$	valor de P entre las condiciones experimentales indicadas	
(a) control	2.00 $\pm$ 0.07		
(b) 3-NPA	2.74 $\pm$ 0.18	(a) vs (b) 0,002	
(c) VPC	1.52 $\pm$ 0.14	(a) vs (c) 0,03	(c) vs (d) 0,005
(d) VPC + 3NPA	2.16 $\pm$ 0.24	(a) vs (d) NS	(b) vs (d) 0,01
(e) tocoferol	1.85 $\pm$ 0.06	(a) vs (e) NS	(e) vs (f) NS
(f) tocoferol + 3NPA	2.22 $\pm$ 0.11	(a) vs (f) NS	(b) vs (f) 0,02

$\text{TBARS}^{\S}$  Los TBA-RS son expresados en nmoles de MDA/mg de proteína sinaptosomal

Los resultados son la media  $\pm$  ESM de 5 experimentos independientes en sinaptosomas de estriado

NS, no hay diferencia estadísticamente significativa

3-NPA, ácido 3-nitropropiónico; VPC, vinpocetina; TBARS, sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

## 6. DISCUSIÓN

En el presente estudio hemos demostrado que las terminales nerviosas aisladas de estriado y de cerebro completo expuestas al 3-NPA durante un periodo de incubación corto (10 min), la concentración de DA total aumenta y disminuye la de DOPAC bajo condiciones de reposo y de despolarización con  $K^+$  alto, y que la exposición de 3-NPA bajo condiciones de reposo por un periodo de incubación largo (2 h) incrementa el estrés oxidativo, la formación de aductos de DA-quinona y disminuye la concentración total de DOPAC. Todos los cambios mencionados anteriormente son más marcados en las terminales nerviosas aisladas de estriado que en las terminales aisladas de cerebro completo. Además encontramos que en homogenados de estriado de los animales expuestos al 3-NPA *in vivo*, los cambios en la concentración de catecolaminas se reflejan en un aumento de los niveles de los metabolitos de DA, DOPAC y HVA.

### 6.1 Interpretación del efecto del 3-NPA sobre la distribución de DA y DOPAC en terminales nerviosas aisladas *in vitro*

La concentración de DA cinco veces mayor en las terminales nerviosas aisladas de estriado que en aquellas aisladas de cerebro completo, es consistente con el mayor incremento en la concentración de DA total (Figs. 10c y 11c) y con la disminución en la concentración de DOPAC total (Figs. 10f y 11f) inducidos por el 3-NPA en las terminales nerviosas aisladas de estriado que en las de cerebro completo, sugiriéndonos que el metabolismo de DA está involucrado en la vulnerabilidad estriatal selectiva ejercida por el 3-NPA (nótese que las terminales nerviosas aisladas de estriado están incluidas dentro de las

terminales nerviosas aisladas de cerebro completo). La disminución de DOPAC producido por el 3-NPA, particularmente evidente en las terminales nerviosas aisladas de estriado, sugieren que el 3-NPA inhibe la degradación de DA inhibiendo indirectamente la actividad de la MAO-A, que se sabe está localizada pre-sinápticamente en las terminales nerviosas dopaminérgicas nigro-estriatales (Agid y col. 1973; Demarest y col. 1980). Esta disminución en el metabolismo de DA evidenciada por una caída en el DOPAC se acompañó por un aumento en la concentración de DA total después de 10 min de incubación (Fig. 10c) o por un aumento en la formación de productos de DA-quinona después de 2 h (tabla 4).

La despolarización con  $K^+$  alto libera selectivamente la posa vesicular de DA. La liberación de neurotransmisores y el aumento de  $Ca^{2+}$  inducido por  $K^+$  alto en las terminales nerviosas cerebrales dependen del  $Ca^{2+}$  externo y es sensible a las toxinas bloqueadoras de canales de  $Ca^{2+}$  tipo P/Q,  $\omega$ -Aga-IVA y  $\omega$ -Aga-TK (Turner y col. 1992; Sitges y Chiu 1995; Sitges y Galindo 2005). Por lo tanto, nuestros hallazgos de que el 3-NPA incrementa la exocitosis de DA después de una exposición corta (10 min), a juzgar por la potenciación del 3-NPA sobre la liberación de DA evocada por efecto del  $K^+$  alto (Fig. 11a), sugieren fuertemente que la DA que no se metabolizó a DOPAC después de 10 min de exposición al 3-NPA, se acumuló dentro de las vesículas sinápticas.

Nuestros hallazgos de que, sinaptosomas de estriado expuestos a 3-NPA por 2 h disminuya la formación de DOPAC, no aumente la DA y en vez de ello la disminuya (Fig. 12c), sugieren fuertemente que el estrés oxidante inducido por el 3-NPA durante 2 h de incubación (tabla 3) transformara una gran cantidad de la DA no metabolizada a DOPAC, a productos de oxidación de DA,

apoyado por el marcado incremento de DA-quinonas derivadas de los aductos quinoproteicos inducidos por el 3-NPA, observados predominantemente en sinaptosomas estriatales (tabla 4). Nuestra dificultad para detectar el aumento de estrés oxidativo en presencia de 3-NPA después de 10 min de incubación, está de acuerdo con resultados previos *in vitro* en donde se observa que la sensibilidad del método no es suficiente para detectar un aumento de ROS inducido por concentraciones milimolares de 3-NPA en periodos de tiempo inferiores a 2 h (Raut y col. 2006).

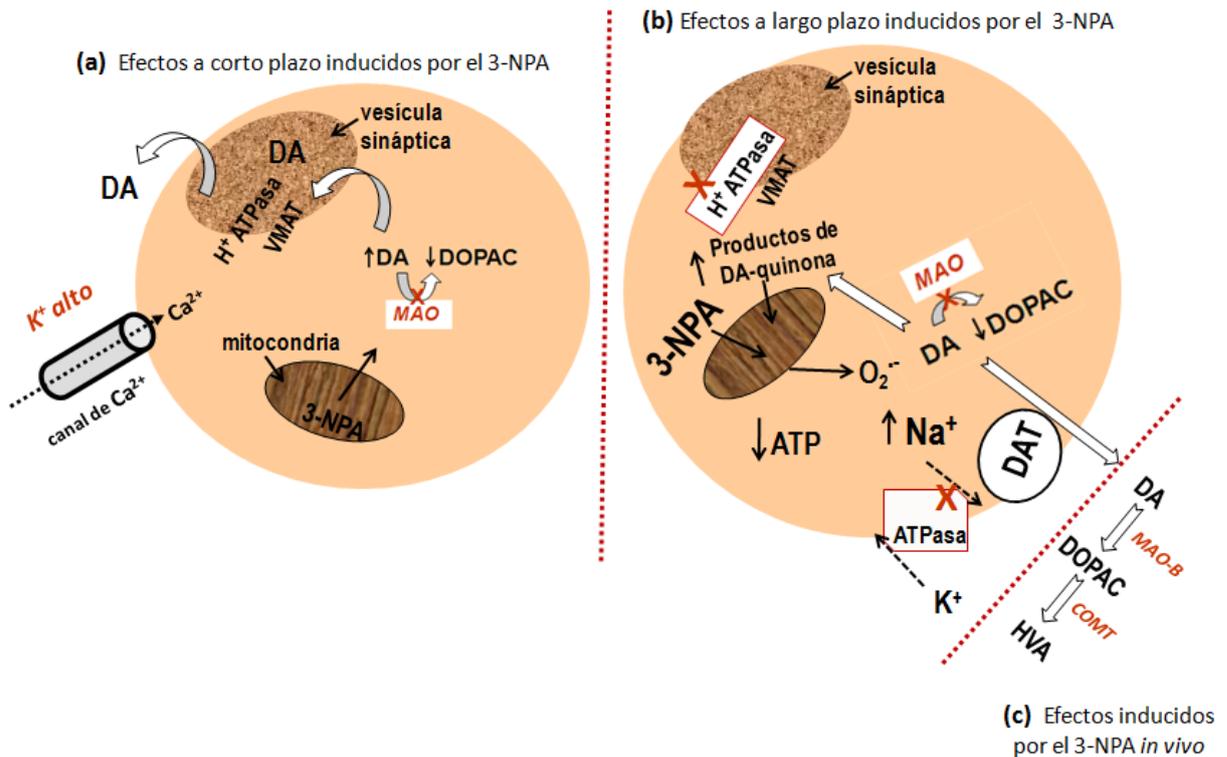
Para investigar si el marcado incremento en la producción de ROS observados en las terminales nerviosas aisladas de estriado estaba ligado a la formación de DA-quinonas empleamos el método NBT/ glicinato, previamente utilizado en preparaciones mitocondriales expuestas a DA (50-400  $\mu$ M) (Khan y col. 2001; Khan y col. 2005; Jana y col. 2007). La reducción del reactivo NBT medido a 530 nm nos da una estimación de la cantidad de aductos de DA-quinona formados. Por lo tanto, los datos obtenidos aquí con el método de NBT/glicinato indican que la cantidad de DA presente en las terminales nerviosas cerebrales, y particularmente en aquellas aisladas del estriado es suficiente para permitir la detección de los aductos. En consecuencia, los aductos de DA-quinona deberían originarse de las DA-quinonas unidas covalentemente con el grupo tiol de las proteínas presentes en las terminales nerviosas aisladas. Dado que se conoce que las cisteínas son esenciales para la actividad de la MAO (Wu y col. 1993; Sablin y Ramsay 1998), es posible que las DA-quinonas producidas por el 3-NPA estén inhibiendo la actividad de la MAO formando “quino-MAO-aductos”. Además, se ha demostrado que las quinonas, tanto de DA y L-DOPA, inhiben a la triptófano hidroxilasa y modifican

las proteínas en el sitio activo redox formando quino-triptófano hidroxilasa (Kuhn y Arthur 1998, 1999). Por lo tanto, no descartamos que la tirosina hidroxilasa (TH), la enzima limitante en la síntesis de DA, este siendo transformada en el sitio activo redox en quino-tirosina hidroxilasa.

En mitocondrias de cerebro de rata, los productos de oxidación de DA inhiben los complejos I y IV de la cadena respiratoria (Khan y col. 2005; Jana y col. 2007). Por lo tanto, la mayor producción de ROS en los sinaptosomas de estriado que en los de cerebro completo, donde la DA es menos abundante, también debería ser explicado por la inhibición de aquellos complejos. En presencia de 3-NPA, que inhibe de manera irreversible al complejo II de la cadena respiratoria y simultáneamente disminuye el metabolismo de DA (como se muestra aquí), la producción de ROS y los productos de oxidación de DA serían incrementados particularmente en regiones ricas en DA, explicando porque el 3-NPA es más dañino en el estriado que en otras estructuras del cerebro. El metabolismo de DA a DOPAC por actividad de la MAO-A es acompañado por la formación de  $H_2O_2$ , y en las terminales nerviosas aisladas el 3-NPA redujo la formación de DOPAC con la consecuente disminución en la producción de  $H_2O_2$ . Por lo tanto, el aumento en la producción de ROS dentro de los sinaptosomas inducido por el 3-NPA, es poco probable que esté ligado a la formación de  $H_2O_2$  y en vez de ello puede estar ligado a la formación de productos de oxidación de DA capaces de inhibir otros sitios de la cadena respiratoria.

En pocas palabras, nuestros datos *in vitro* indican que la DA que no se metabolizó a DOPAC en los sinaptosomas de estriado expuestos a 3-NPA durante 10 min, se acumuló dentro de las vesículas sinápticas (Fig 15a),

mientras que en sinaptosomas de estriado expuestos a 3-NPA durante 2 h, la DA que no se metabolizó a DOPAC se encontró en forma de productos de oxidación de DA o en el medio externo, donde se liberó muy probablemente a través de la reversión del transportador de DA (DAT). El marcado aumento en los productos de oxidación de DA inducido por el 3-NPA puede parar la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa, al inhibir los complejos I y IV de la cadena respiratoria, y aumentar la concentración de  $\text{Na}^+$  interno con la concomitante liberación de DA mediada por el DAT, explicando el mayor aumento en la liberación basal de DA observado en las terminales nerviosas aisladas de estriado incubadas con 3-NPA durante 2 h. En terminales nerviosas cerebrales, el estrés oxidante ha demostrado inactivar la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa en presencia de DA endógena (Chakraborty y col. 2003; Bagh y col. 2008) y se demostró que la inhibición de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa aumenta la concentración interna de  $\text{Na}^+$  (Galván y Sitges 2004), con la concomitante liberación de DA mediada por el DAT (Sitges y col. 1994). Además, la caída esperada de ATP después de 2 h de exposición al 3-NPA también podría parar a la  $\text{H}^+$ -ATPasa acoplada al VMAT previniendo la acumulación de DA dentro de las vesículas sinápticas (Fig. 15b).



**Fig 15. Mecanismos propuestos relacionados con el efecto particularmente dañino ejercido por el 3-NPA en el estriado.** Cambios inducidos por el 3-NPA: (a) en terminales nerviosas aisladas de estriado expuestas a la toxina por 10 min; (b) por 120 min; y (c) en homogenados de estriado por la administración de 3-NPA a animales *in vivo*.

## 6.2 Interpretación de los cambios en el metabolismo de DA estriatal inducidos por el 3-NPA *ex-vivo*

El efecto del 3-NPA sobre las concentraciones de catecolaminas estriatales *ex vivo* se investigó en homogenados de estriado y no en sinaptosomas de estriado. Debido a que nuestros resultados *in vitro* mostraron que después de 2 h de exposición al 3-NPA, la DA que no se transformó a productos de oxidación de la DA-quinona se liberó al medio externo (Fig. 12a), y porque la mayoría del DOPAC transformado también se liberó al medio externo. Por lo que asumimos que una gran concentración de catecolaminas podría ser eliminada durante el

procedimiento de la obtención de sinaptosomas. En homogenados de estriado de los animales administrados con 3-NPA *in vivo* encontramos que ambos metabolitos de DA, DOPAC y HVA, se incrementaron. Este hallazgo sugiere que la DA liberada por efecto del 3-NPA, se metaboliza muy probablemente por enzimas no neuronales que no están presente en los sinaptosomas, tales como la MAO-B y la COMT (Reenilä y col. 1997; Helkamaa y col. 2007). A diferencia de la MAO-A, la MAO-B no se localiza dentro de las terminales nerviosas. En consecuencia, no se espera que la enzima sea inhibida por el incremento en DA-quinonas inducido por el 3-NPA dentro de las terminales nerviosas nigro-estriatales. Por lo tanto, el aumento de DOPAC observado en homogenados de estriado de los animales administrados con 3-NPA puede resultar del metabolismo, por la MAO-B, de la DA liberada. Con base a lo anterior, el HVA que resulta de la actividad de la COMT no se detectó en sinaptosomas de estriado, pero fue notoriamente detectado en homogenados de estriado; sugiriéndonos que la DA liberada por efecto del 3-NPA *in vivo* también es fuente de dicho metabolito (Fig. 15c).

En experimentos previos *in vivo* se demostró que una mezcla de inhibidores de la MAO (IMAO) inyectados i.p. durante 7 días reduce el volumen de la lesión inducido por el 3-NPA (20 mg/kg i.p. inyectados diariamente durante los últimos 4 días) en el estriado de rata (Maragos y col. 1999). El tratamiento crónico (1 semana) con dosis altas de IMAO se esperaría un incremento de DA y una disminución de DOPAC, como lo hizo el 3-NPA en las terminales nerviosas aisladas de estriado. Sin embargo, esta aparente controversia puede explicarse por resultados no publicados de nuestro laboratorio, donde se demostró que el inhibidor selectivo de la MAO-A, clorgilina, a altas concentraciones (> 30  $\mu$ M)

libera toda la DA al medio externo disminuyendo la concentración de DA interna por debajo de los valores control en terminales nerviosas aisladas de estriado. Dado que en ausencia de DA dentro de las terminales nerviosas aisladas de estriado, el 3-NPA es incapaz de producir DA-quinonas y aductos de quinona con la MAO-A, es posible que las dosis altas de IMAO utilizadas por Maragos y colaboradores (1999) *in vivo*, inhiban la lesión en el estriado inducida por el 3-NPA, disminuyendo la concentración de DA dentro de las terminales nerviosas. Por otra parte, en los animales administrados con 3-NPA, el metabolismo de DA externa se esperaría que genere H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Sin embargo, la posibilidad de que la inhibición del metabolismo de DA externa por la MAO-B, con la concomitante prevención en la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> participe en la protección ejercida por los IMAO's sobre la vulnerabilidad estriatal inducida por el 3-NPA es poco probable, porque en ratones "knock-out" a la MAO-B la vulnerabilidad del estriado al 3-NPA no se inhibió (Maragos y col. 2004).

### **6.3 Interpretación del efecto de vinpocetina y a-tocoferol sobre el daño mediado por los cambios en DA inducidos por el 3-NPA en sinaptosomas de estriado**

En el presente trabajo demostramos que la vinpocetina, al igual que el  $\alpha$ -tocoferol, inhiben el aumento en la concentración de DA total inducido por el 3-NPA en terminales nerviosas aisladas de estriado, y además ambos fármacos inhibieron el aumento en la producción de ROS, de lípidos peroxidados y la formación de productos de DA-quinona inducidos por la toxina mitocondrial en sinaptosomas de estriado.

De acuerdo con un estudio previo donde se demuestra que la vinpocetina en el rango  $\mu\text{M}$  bajo (1.5 a 50  $\mu\text{M}$ ) disminuye la concentración de DA y aumenta el DOPAC de manera dosis-dependiente en sinaptosomas de estriado (Trejo y col. 2001), en el presente trabajo encontramos que la vinpocetina 25  $\mu\text{M}$  disminuyó la concentración de DA a expensas de su metabolito, el DOPAC en las terminales nerviosas aisladas de estriado (tabla 6 y Fig. 13). Además, de acuerdo a nuestro estudio anterior donde mostramos que la DA que no se metabolizó a DOPAC después de exponer a los sinaptosomas de estriado al 3-NPA durante 10 min, se convirtió a productos de DA-quinona después de 2 h (Herrera y Sitges 2010), el 3-NPA aumentó la concentración de DA después de 10 min de incubación y los productos de DA-quinona después de 2 h. Además, los hallazgos presentes muestran que tanto la vinpocetina y el  $\alpha$ -tocoferol, un antioxidante ampliamente reconocido, previenen el aumento de DA inducido por el 3-NPA después de 10 min de incubación, así como el aumento en los productos de oxidación de la DA inducido por el 3-NPA después de 2 h.

Nuestros hallazgos de que la disminución de DA ejercida por la vinpocetina se acompañe de un aumento en la concentración de DOPAC soportan nuestra conclusión previa de que la vinpocetina previene la acumulación de la DA citoplasmática dentro de las vesículas sinápticas (Trejo y col. 2001), y sugieren que la DA acumulada en el citoplasma es metabolizada por la MAO-A a DOPAC. Por el contrario, el aumento en la DA total y la disminución de su metabolito, el DOPAC, producido por el 3-NPA (Figs. 13 y 14), apoyan la propuesta descrita en un trabajo previo donde se sugiere que el 3-NPA inhibe indirectamente la actividad de la MAO-A (Herrera y Sitges 2010). En contraste a la vinpocetina, el  $\alpha$ -tocoferol no modificó la concentración de DOPAC,

sugiriendo que el mecanismo por el que el  $\alpha$ -tocoferol disminuye la concentración de DA es diferente al de la prevención de la acumulación de DA dentro de las vesículas sinápticas. En células PC12 la actividad catalítica de la tirosina hidroxilada (TH), que es la enzima limitante en la biosíntesis de la DA es modulada por el antioxidante ditiotreitól ([Borges y col. 2002](#)). Por lo tanto, una posible explicación de la disminución de la DA total ejercida por el  $\alpha$ -tocoferol sin modificar al DOPAC (tabla 7 y Fig. 14) podría ser por una disminución en la síntesis de DA. Además, a la disminución de DA ejercida por vinpocetina y  $\alpha$ -tocoferol, ambos fármacos previenen el aumento de los productos de DA-quinona inducido por el 3-NPA (tabla 8). A este respecto es interesante mencionar que en un estudio previo donde se compararon concentraciones equimolares de DA y DOPAC sobre la producción de aductos quinoproteicos en mitocondrias de cerebro de rata, se encontró que los aductos quinoproteicos dañinos capaces de inhibir otros complejos de la cadena respiratoria son los generados por la DA, y no por el DOPAC ([Jana y col. 2007](#)).

$\alpha$ -Tocoferol es un componente esencial del mecanismo de defensa celular contra oxidantes endógenos y exógenos ([Wang y Quinn 1999](#)). La comparación de la capacidad antioxidante de vinpocetina y  $\alpha$ -tocoferol, contra el aumento de marcadores de daño oxidativo como son los ROS y los TBARS inducido por el 3-NPA, muestra que ambos compuestos son eficaces “scavengers” de radicales libres. Sin embargo, aunque ambos compuestos, vinpocetina y  $\alpha$ -tocoferol reducen el aumento en la producción de TBARS inducido por el 3-NPA, solamente la vinpocetina disminuyó la producción de TBARS por debajo de los niveles basales de una manera estadísticamente significativa (tabla 10).

Por lo tanto, los presentes hallazgos indican que la vinpocetina posee una importante capacidad antioxidante, ya que a una concentración de 25  $\mu\text{M}$  fue más eficaz que el antioxidante lipofílico  $\alpha$ -tocoferol a una concentración de 50  $\mu\text{M}$  para reducir la formación de TBARS.

Nuestros hallazgos de que la vinpocetina y el  $\alpha$ -tocoferol redujeron la formación de ROS y la producción de TBARS por debajo de los niveles basales en sinaptosomas de estriado (tablas 9 y 10), difieren de la falla de vinpocetina y trolox, un análogo del  $\alpha$ -tocoferol, para modificar los niveles de ROS y TBARS en sinaptosomas de cerebro completo (Santos y col. 2000). Esta aparente diferencia puede ser probablemente debido a la cantidad de ROS producidos de casi 5 veces más baja en sinaptosomas de cerebro completo de rata que en los sinaptosomas de estriado (Herrera y Sitges 2010) y al período de incubación (15 min) utilizado en el trabajo de Santos y col. (2000).

Si comparamos la capacidad antioxidante de vinpocetina con la del  $\alpha$ -tocoferol, observamos que ambos fármacos son capaces de inhibir de manera similar el aumento de los marcadores de daño oxidativo, como son la producción de ROS (tabla 9), TBARS (tabla 10) y los productos de oxidación de DA (tabla 8) inducidos por el 3-NPA en las terminales nerviosas aisladas de estriado, muy probablemente debido a su propiedad como “scavenger” y además debido a su capacidad de inhibir el aumento de DA interna inducido por la toxina mitocondrial.

En un estudio previo, se demostró que la vinpocetina es altamente efectiva contra la peroxidación de lípidos y los ROS generados por el complejo ascorbato/ $\text{Fe}^{2+}$  en terminales nerviosas aisladas de corteza cerebral (Santos y col. 2000), así como la capacidad “scavenger” de vinpocetina para atrapar al

radical hidroxilo generado por la reacción de Fenton *in vitro* (Oláh y col. 1990). En este sentido, ya se había reportado que la vinpocetina y el  $\alpha$ -tocoferol son igualmente efectivos contra el estrés oxidante inducido por el complejo ascorbato/ $\text{Fe}^{2+}$  en terminales nerviosas aisladas de corteza cerebral (Santos y col. 2000). Estos resultados confirman la capacidad antioxidante de vinpocetina y podrían contribuir importantemente a la acción neuroprotectora de la vinpocetina contra el daño oxidativo inducido por el 3-NPA, particularmente en estructuras cerebrales ricas en DA, como es el estriado.

Nuestros hallazgos de que la vinpocetina y el  $\alpha$ -tocoferol previenen el aumento de todos los marcadores de daño oxidativo inducidos por el 3-NPA en las terminales nerviosas aisladas de estriado indican que ambos compuestos son poderosos agentes neuroprotectores. Porque teniendo en cuenta que las mitocondrias, las estructuras donde se generan principalmente los ROS, son particularmente abundantes en las terminales nerviosas; que el neurotransmisor DA está particularmente concentrado en el estriado, y que los complejos I y IV de la cadena respiratoria mitocondrial son inhibidos por los productos de DA-quinona (Khan y col. 2005; Jana y col. 2007), bajo las presentes condiciones experimentales la acción dañina del 3-NPA puede ser particularmente importante.

En resumen, nuestros resultados indican que las propiedades “scavenger” de vinpocetina y el  $\alpha$ -tocoferol junto con su capacidad de disminuir los niveles de DA total, permiten a estos compuestos estabilizar los ROS generados por la inhibición indirecta del complejo II de la cadena respiratoria inducido por el 3-NPA, así como los ROS generados por la inhibición de los complejos I y IV por las DA-quinonas producidos por el 3-NPA. De acuerdo con esta interpretación

en células PC12 que son células ricas en DA, la vinpocetina ha demostrado además prevenir la inhibición de los complejos II, III y IV de la cadena respiratoria inducida por el péptido amiloide-beta ([Pereira y col. 2000](#)).

En conclusión, la inhibición que ejerce la vinpocetina sobre el aumento en la DA, los ROS, los TBARS y los productos de oxidación de la DA que induce el 3-NPA en sinaptosomas de estriado, debe contribuir importantemente a la acción neuroprotectora de la vinpocetina contra el daño oxidativo, particularmente en estructuras cerebrales ricas en DA, como es el estriado.

## 7. CONCLUSIONES

En las terminales nerviosas nigro-estriatales, donde la DA está particularmente concentrada, el aumento de radicales libres generado por el 3-NPA podría estar oxidando a la DA y generar DA-quinonas. Y éstas quinonas a su vez pueden formar aductos quinoproteicos con el sitio activo de la MAO-A disminuyendo así su actividad y evitando el metabolismo normal de DA a DOPAC.

Parte de la DA que no se metabolizó a DOPAC por medio de la MAO-A, podría generar más productos de oxidación de DA que inhiban a otros complejos de la cadena respiratoria (y a la MAO-A), y otra parte de la DA podría liberarse al medio externo mediante la reversión del DAT.

Nuestros datos *in vivo* sugieren que la DA liberada al medio externo por efecto del 3-NPA, es metabolizada a DOPAC y a HVA mediante la MAO-B y la COMT, respectivamente.

La inhibición que ejerce la vinpocetina sobre el aumento en la DA, los ROS, los TBARS y los productos de oxidación de la DA que induce el 3-NPA en sinaptosomas de estriado, debe contribuir importantemente a la acción neuroprotectora de la vinpocetina contra el daño oxidativo, particularmente en estructuras cerebrales ricas en DA, como es el estriado.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

Agid Y., Javoy F., and Youdim M. (1973) Monoamine oxidase and aldehyde dehydrogenase activity in the striatum of rats after 6-hydroxydopamine lesion of the nigrostriatal pathway. *Brit J Pharmacol* **48**, 175-178.

Alexi T., Hughes P., Faull R., and Williams C. (1998) 3-Nitropropionic acid's lethal triplet: cooperative pathways of neurodegeneration. *Neuroreport* **9**, R57-R64.

Ali S. F., LeBel C. P., and Bondy S. C. (1992) Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. *Neurotoxicology* **13**, 637-648.

Alston T. A., Mela L., and Bright H. J. (1977) 3-Nitropropionate, the toxic substance of *Indigofera*, is a suicide inactivator of succinate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **74**, 3767-3771.

Araki T., Kogure K., and Nishioka K. (1990) Comparative neuroprotective effects of pentobarbital, vinpocetine, flunarizine and ifenprodil on ischemic neuronal damage in the gerbil hippocampus. *Res Exp Med (Berl)* **190**, 19-23.

Bagh M. B., Maiti A. K., Jana S., Banerjee K., Roy A., and Chakrabarti S. (2008) Quinone and oxyradical scavenging properties of N-acetylcysteine prevent dopamine mediated inhibition of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase and mitochondrial electron transport chain activity in rat brain: implications in the neuroprotective therapy of Parkinson's disease. *Free Radic Res* **42**, 574-581.

Bauerfeind R., Galli T., De Camilli P. (1996) Molecular mechanisms in synaptic vesicle recycling. *J Neurocytol* **25**, 701-715

Beal M. F., Brouillet E., Jenkins B. G., Ferrante R. J., Kowall N. W., Miller J. M., Storey E., Srivastava R., Rosen B. R., and Hyman B. T. (1993) Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J Neurosci* **13**, 4181-92.

Borges C. R., Geddes T., Watson J. T., and Kuhn D. M. (2002) Dopamine biosynthesis is regulated by S-glutathionylation. Potential mechanism of tyrosine hydroxylase inhibition during oxidative stress. *J Biol Chem* **277**, 48295-48302.

Borlongan C. V., Koutouzis T. K., Randall T. S., Freeman T. B., Cahill D. W., and Sanberg P. R. (1995) Systemic 3-nitropropionic acid: behavioral deficits and striatal damage in adult rats. *Brain Res Bull* **36**, 549-556.

Borlongan C. V., Nishino H., and Sanberg P. R. (1997) Systemic, but not intraparenchymal, administration of 3-nitropropionic acid mimics the neuropathology of Huntington's disease: a speculative explanation. *Neurosci Res* **28**, 185-189.

Cardoso S. M., Pereira C., and Oliveira C. R. (1998) The protective effect of vitamin E, idebenone and reduced glutathione on free radical mediated injury in rat brain synaptosomes. *Biochem Biophys Res Commun* **246**, 703-710.

Chakraborty H., Sen P., Sur A., Chatterjee U., and Chakrabarti S. (2003) Age-related oxidative inactivation of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in rat brain crude synaptosomes. *Exp Gerontol* **38**, 705-710.

Cooper JR, Bloom FE, Roth RH. The biochemical basis of neuropharmacology, 7<sup>th</sup>. Ed. New York/Oxford, Oxford University Press, 1996:293-351.

Demarest K. T., Smith D. J., and Azzaro A. J. (1980) The presence of the type A form of monoamine oxidase within nigrostriatal dopamine-containing neurons. *J Pharmacol Exp Ther* **215**, 461-468.

Dorado M. C., Rugerio V. C., and Rivas A. S. (2003) Estrés oxidativo y neurodegeneración. *Rev Fac Med* **46**, 229-235.

Galpern W. R., Matthews R. T., Beal M. F., and Isacson O. (1996) NGF attenuates 3-nitrotyrosine formation in a 3-NP model of Huntington's disease. *Neuroreport* **7**, 2639-2642.

Galván E. and Sitges M. (2004) Characterization of the participation of sodium channels on the rise in Na<sup>+</sup> induced by 4-aminopyridine (4-AP) in synaptosomes. *Neurochem Res* **29**, 347-355.

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

Halliwel B. and Gutteridge J. M. C. (2006) Free Radicals in Biology and Medicine, 4<sup>th</sup> edn, Oxford University Press, Oxford.

Halliwel B. and Whiteman M. (2004) Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* **142**, 231-255.

Helkamaa T., Reenilä I., Tuominen R. K., Soynila S., Väänänen A., Tilgmann C., and Rauhala P. (2007) Increased catechol-O-methyltransferase activity and

protein expression in OX-42-positive cells in the substantia nigra after lipopolysaccharide microinfusion. *Neurochem Int* **51**, 412-423.

Herrera-Mundo N., and Sitges M. (2010) Mechanisms underlying striatal vulnerability to 3-nitropropionic acid. *J Neurochem* **114**, 597-605.

Jakel R. J., and Maragos W. F. (2000) Neuronal cell death in Huntington's disease: a potential role for dopamine. *Trends Neurosci* **23**, 239-245.

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

Kehrer J. P. (1993) Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol* **23**, 21-48.

Khan F. H., Saha M., and Chakrabarti S. (2001) Dopamine induced protein damage in mitochondrial-synaptosomal fraction of rat brain. *Brain Res* **895**, 245-249.

Khan F. H., Sen T., Maiti A. K., Jana S., Chatterjee U., and Chakrabarti S. (2005) Inhibition of rat brain mitochondrial electron transport chain activity by dopamine oxidation products during extended in vitro incubation: Implications for Parkinson's disease. *Biochem Biophys Acta* **1741**, 65-74.

Koutouzis T. K., Borlongan C.V., Scoria T., Creese I., Cahill D. W., Freeman T. B., and Sanberg P. R. (1994) Systemic 3-nitropropionic acid: long-term effects on locomotor behavior. *Brain Res* **646**, 242-246.

Kuhn D. and Arthur R. (1998) Dopamine inactivates tryptophan hydroxylase and forms a redox-cycling quinoprotein: possible endogenous toxin to serotonin neurons. *J. Neurosci.* **18**, 7111-7117.

Kuhn D. and Arthur R. (1999) L-DOPA-quinone inactivates tryptophan hydroxylase and converts the enzyme to a redox-cycling quinoprotein. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **73**, 78-84.

La Fontaine M. A., Geddes J. W., Banks A., and Butterfield D. A. (2000) 3-Nitropropionic acid induced *in vivo* protein oxidation in striatal and cortical synaptosomes: insights into Huntington's disease. *Brain Res* **858**, 356-362.

Levitt M., Spector S., Sjoerdsma A., and Udenfriend S. (1965) Elucidation of the rate-limiting step in norepinephrine biosynthesis in the perfused guinea-pig heart. *J Pharmacol Exp Ther* **148**, 1-8.

Ludolph A. C., He F., Spencer P. S., Hammerstad J., and Sabri M. (1991) 3-Nitropropionic acid-exogenous animal neurotoxin and possible human striatal toxin. *Can J Neurol Sci* **18**, 492-498.

Ma J., Yoshimura M., Yamashita E., Nakagawa A., Ito A., and Tsukihara T. (2004) Structure of rat monoamine oxidase A and its specific recognitions for substrates and inhibitors. *J Mol Biol* **338**, 103-114.

Maragos W. F., Tillman P. A., Chesnut M., and Jakel R. (1999) Clorgyline and deprenyl attenuate striatal malonate and 3-nitropropionic acid lesions. *Brain Res* **834**, 168-172.

Maragos W., Young K., Altman C., Pocernich C., Drake J., Butterfield D., Seif I., Holschneider P., Chen K., and Shih J. (2004) Striatal damage and oxidative stress induced by the mitochondrial toxin malonate are reduced in clorgyline-treated rats and MAO-A deficient mice. *Neurochem Res* **29**, 741-746.

Miyamoto M., Murphy T. H., Schnaar R. L., and Coyle J. T. (1989) Antioxidants protect against glutamate-induced cytotoxicity in a neuronal cell line. *J Pharmacol Exp Ther* **250**, 1132-1140.

Nagatsu T., Levitt M., and Udenfriend S. (1964) Tyrosine hydroxylase. The initial step in norepinephrine biosynthesis. *J Biol Chem* **239**, 2910-2917.

Oláh V. A., Balla G., Balla J., Szabolcs A., and Karmazsin L. (1990) An in vitro study of the hydroxyl scavenger effect of Cavinton. *Acta Paediatr Hung* **30**, 309-316.

Osakada F., Hashino A., Kume T., Katsuki H., Kaneko S., and Akaike A. (2003) Neuroprotective effects of alpha-tocopherol on oxidative stress in rat striatal cultures. *Eur J Pharmacol* **465**, 15-22.

Pacher P., Beckman J. S., and Liaudet L. (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* **87**, 315-424.

Paz M. A., Flückiger R., Boak A., Kagan H. M., and Gallop P. M. (1991) Specific detection of quinoproteins by redox-cycling staining. *J Biol Chem* **266**, 689-692.

Pereira C., Agostinho P., and Oliveira C. R. (2000) Vinpocetine attenuates the metabolic dysfunction induced by amyloid beta-peptides in PC12 cells. *Free Radic Res* **33**, 497-506.

Pérez-De La Cruz V., González-Cortés C., Pedraza-Chaverrí J., Maldonado P. D. Andrés-Martínez L., and Santamaría A. (2006) Protective effect of S-allylcysteine on 3-nitropropionic acid-induced lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction in rat brain synaptosomes. *Brain Res Bull* **68**, 379-383.

Raut A., Iglewski M., and Ratka A. (2006) Differential effects of impaired mitochondrial energy production on the function of mu and delta opioid receptors in neuronal SK-N-SH cells. *Neurosci Lett* **404**, 242-246.

Reenilä I., Tuomainen P., Soinila S., and Männistö P. T. (1997) Increase of catechol-O-methyltransferase activity in rat brain microglia after intrastriatal infusion of fluorocitrate, a glial toxin. *Neurosci Lett* **230**, 155-158.

Reynolds D., Carter R., and Morton A. (1998) Dopamine modulates the susceptibility of striatal neurons to 3-nitropropionic acid in the rat model of Huntington's disease. *J Neurosci* **23**, 10116-10127.

Rodríguez-Martínez E., Rugerio-Vargas C., Rodríguez A. I., Borgonio-Pérez G., and Rivas-Arancibia S. (2004) Antioxidant effects of taurine, vitamin C, and vitamin E on oxidative damage in hippocampus caused by the administration of 3-nitropropionic acid in rats. *Int J Neurosci* **114**, 1133-1145.

Sablin S. O. and Ramsay R. R. (1998) Monoamine oxidase contains a redox-active disulfide. *J Biol Chem* **273**, 14074-14076.

Santos M. S., Duarte A. I., Moreira P. I., and Oliveira C. R. (2000) Synaptosomal response to oxidative stress: effect of vinpocetine. *Free Radic Res* **32**, 57-66.

Schulz J. B., Matthews R. T., Jenkins B. G., Ferrante R. J., Siwek D., Henshaw D. R., Cipolloni P. B., Mecocci P., Kowall N. W., Rosen B. R., and Beal M. F. (1996) Blockade of neuronal nitric oxide synthase protects against excitotoxicity *in vivo*. *J Neurosci* **15**, 8419-8429.

Siegel GJ eds. Basic Neurochemistry, 4th Ed. New York: Raven Press; 1989. P.233-251.

Sies H. (1991) Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klin Wochenschr* **15**, 965-968.

Sitges M., Reyes A., and Chiu L. M. (1994) Dopamine transporter mediated release of dopamine: role of chloride. *J Neurosci Res* **39**, 11-22.

Sitges M. and Chiu L. M. (1995) w-Aga IVA selectively inhibits the calcium dependent fraction of the evoked release of [<sup>3</sup>H]GABA from synaptosomes. *Neurochem Res* **20**, 1065-1071.

Sitges M. and Galindo C. (2005) Omega-agatoxin-TK is a useful tool to study P-type Ca<sup>2+</sup> channel-mediated changes in internal Ca<sup>2+</sup> and glutamate release in depolarized brain nerve terminals. *Neurochem Int* **46**, 53-60.

Sitges M., Nekrassov V., and Guarneros A. (2000) Simultaneous action of MK-801 (dizclopine) on dopamine, glutamate, aspartate and GABA release from striatum isolated nerve endings. *Brain Res* **854**, 48-56.

Sitges M., Aldana B. I., Chiu L. M., and Nekrassov V. (2009) Characterization of phenytoin, carbamazepine, vinpocetine and clorgyline simultaneous effects on sodium channels and catecholamine metabolism in rat striatal nerve endings. *Neurochem Res* **34**, 470-479.

Trejo F., Nekrassov V., and Sitges M. (2001) Characterization of vinpocetine effects on DA and DOPAC release in striatal isolated nerve endings. *Brain Res* **909**, 59-67.

Turner T. J., Adams M. E., and Dunlap K. (1992) Calcium channels coupled to glutamate release identified by w-Aga-IVA. *Science* **258**, 310-313.

Villarán R., Tomás-Camardiel M., de Pablos R., Santiago M., Herrera A., Navarro A., Machado A., and Cano J. (2008) Endogenous dopamine enhances the neurotoxicity of 3-nitropropionic acid in the striatum through the increase of mitochondrial respiratory inhibition and free radicals production. *Neurotoxicology* **29**, 244-258.

Vishnevskii A. A., Korotkevich I. G., and Zhaparalieva Ch. O. (2009) Membrane and functional effects of vinpocetine and tocopherol in rats with experimental cerebral ischemia. *Biomed Khim* **55**, 635-642.

Wang X., and Quinn P. J. (1999) Vitamin E and its function in membranes. *Prog Lipid Res* **38**, 309-336.

Wu H., Chen K., and Shih J. (1993) Site-directed mutagenesis of monoamine oxidase A and B: role of cysteines. *Mol Pharmacol* **43**, 888-893.