

**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE GRANADA**

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA. CTS-101



**MECANISMOS CELULARES Y MOLECULARES
DE NEUROPROTECCIÓN DE
KINURENAMINAS SINTÉTICAS FRENTE
AL DAÑO MITOCONDRIAL
INDUCIDO POR EL SISTEMA NOS/NO**

TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR

VÍCTOR TAPIAS MOLINA,

Licenciado en Biología, para optar al grado de:

DOCTOR POR LA UNIVERSIDAD DE GRANADA

Habiendo obtenido la Suficiencia Investigadora dentro del Programa de Doctorado
“*Bioteología*” en el Área de Conocimiento de Fisiología

Granada, 2006

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Víctor Tapias Molina
D.L.: Gr. 2443 - 2006
ISBN: 84-338-4175-0

A mis padres

“En principio la investigación necesita más cabezas que medios”

Severo Ochoa (1905-1993)
Bioquímico español, premio Nobel de Medicina en 1959.

“Lo peor no es cometer un error, sino tratar de justificarlo, en vez de aprovecharlo como aviso providencial de nuestra ligereza o ignorancia”

Santiago Ramón y Cajal (1852-1934)
Médico español, premio Nobel de Medicina en 1906.

“La verdadera grandeza de la ciencia acaba valorándose por su utilidad”

Gregorio Marañón (1887-1960)
Médico español.

“La ciencia es sólo un ideal. La de hoy corrige la de ayer, y la de mañana la de hoy”

José Ortega y Gasset (1883-1955)
Filósofo español.

Certificaciones

Dr. DARÍO ACUÑA CASTROVIEJO, catedrático del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada,

Certifica que D. Víctor Tapias Molina, Licenciado en Biología, ha realizado bajo mi dirección y en el Departamento de Fisiología (Instituto de Biotecnología) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada el presente trabajo de investigación, titulado: **“Mecanismos celulares y moleculares de neuroprotección de kinurenaminas sintéticas frente al daño mitocondrial inducido por el sistema NOS/NO”**, que ha sido objeto de su Tesis Doctoral, reuniendo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Granada, 1 de Noviembre de 2006

El director,

El interesado,

Fdo. Darío Acuña Castroviejo

Fdo. Víctor Tapias Molina

Dra. GERMAINE ESCAMES ROSA, profesora contratada doctor del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada,

Certifica que D. Víctor Tapias Molina, Licenciado en Biología, ha realizado bajo mi dirección y en el Departamento de Fisiología (Instituto de Biotecnología) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada el presente trabajo de investigación, titulado: **“Mecanismos celulares y moleculares de neuroprotección de kinurenaminas sintéticas frente al daño mitocondrial inducido por el sistema NOS/NO”**, que ha sido objeto de su Tesis Doctoral, reuniendo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Granada, 1 de Noviembre de 2006

El director,

El interesado,

Fdo. Germaine Escames Rosa

Fdo. Víctor Tapias Molina

Publicaciones

PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN QUE HAN FINANCIADO EL ESTUDIO.

1. Acuña Castroviejo, D. Evaluación de kinurenaminas sintéticas como neuroprotectores frente al daño mitocondrial inducido por el sistema NOS/NO en Parkinson experimental. Consejería de Educación, Junta de Andalucía (PAI). ACC-402-CTS1001, 2002-2003.
2. Acuña Castroviejo, D. Mecanismos celulares y moleculares de neuroprotección de kinurenaminas sintéticas frente al daño mitocondrial inducido por el sistema NOS/NO. Consejería de Educación, Junta de Andalucía (PAI). PI02/1447. 2002-2005.

PUBLICACIONES RELACIONADAS CON ESTA MEMORIA.

TRABAJOS.

1. **Carrión MD, Camacho ME, León J, Escames G, Tapias V, Acuña-Castroviejo D, Gallo MA, Espinosa A.** *Synthesis and iNOS/nNOS inhibitory activities of new benzoylpyrazoline derivatives.* Tetrahedron. 2004;60(18):4051-4069.
2. **Entrena A, Camacho ME, Carrión MD, López-Cara LC, Velasco G, León J, Escames G, Acuña-Castroviejo D, Tapias V, Gallo MA, Vivó A, Espinosa A.** *Kynurenamines as neural nitric oxide synthase inhibitors.* J Med Chem. 2005;48(26):8174-81.
3. **León J, Escames G, Rodríguez MI, López LC, Tapias V, Entrena A, Camacho ME, Carrión MD, Gallo MA, Espinosa A, Tan DX, Reiter RJ, Acuña-Castroviejo D.** *Inhibition of neuronal nitric oxide synthase activity by N(1)-acetyl-5-methoxykynuramine, a brain metabolite of melatonin.* J Neurochem. 2006;98(6):2023-33.

COMUNICACIONES A CONGRESOS.

1. **El haouhay N, Araceli, Bijkdaouene L, Tapias V, López LC, Rivas I, Escames G, Granados MJ, Acuña-Castroviejo D.** *Oxidative stress in human aging.* 1st Luso-Spanish Congress on Free Radicals. 6th Portuguese Congress on Free Radicals in Chemistry, Biology and Medicine. Actas del Congreso 1: 87. Coimbra, 04-06 de Diciembre de 2003.
2. **Rivas I, Tapias V, López LC, Bijkdaouene L, El haouhay N, Escames G, de la Torre Y, Acuña-Castroviejo D.** *Melatonin counteracts rotenone-induced mitochondrial oxidative damage in PC12 cells.* 1st Luso-Spanish Congress on Free Radicals. 6th Portuguese Congress on Free Radicals in Chemistry, Biology and Medicine. Actas del Congreso 1: 135. Coimbra, 04-06 de Diciembre de 2003.

3. **Tapias V, Hitos AB, Ortiz O, Rodríguez MI, León J, Escames G, Acuña-Castroviejo D.** *Effects of some synthetic melatonin analogs on nNOS/iNOS activity in vitro.* XXXIII congress of the spanish society of the physiological sciences, sponsored symposia with the physiological society (UK and Eire) and the duth society of physiology. *J. Physiol. Biochem.* 61 (1): 141-142. Sevilla, 10-13 de Febrero de 2005.
4. **Escames G, Hitos AB, López LC, Tapias V, Utrilla P, Arana C, Barbero E, Acuña-Castroviejo D.** *Mitochondrial nitric oxide synthase: two isoforms in the same organelle.* XXXIII congress of the spanish society of the physiological sciences, sponsored symposia with the physiological society (UK and Eire) and the duth society of physiology. *J. Physiol. Biochem.* 61 (1): 295. Sevilla, 10-13 de Febrero de 2005.
5. **López-Cara LC, Carrión MD, Camacho ME, Entrena A, Gallo MA, Espinosa A, Acuña-Castroviejo D, Tapias V.** *Síntesis y evaluación biológica de nuevos derivados pirrólicos frente a óxido nítrico sintasa.* XIV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Química Terapéutica, organizado por la Sociedad Española de Química Terapéutica. *Actas del Congreso* 1: 151. Bilbao, 13 de Septiembre de 2005.
6. **López-Cara LC, Carrión MD, Camacho ME, Entrena A, Gallo MA, Espinosa A, Acuña-Castroviejo D, Tapias V.** *Nuevos derivados benzoilpirazólicos como inhibidores de óxido nítrico sintasa.* XIV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Química Terapéutica, organizado por la Sociedad Española de Química Terapéutica. *Actas del Congreso* 1: 152. Bilbao, 13 de Septiembre de 2005.
7. **León J, Escames G, Tapias V, Acuña-Castroviejo D.** *Efecto de la melatonina (aMT) y su metabolito cerebral, N-acetil-5-metoxikinurenamina (aMK), sobre la actividad de la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) de estriado de rata.* XI congreso de la Sociedad Española de Neurociencia, organizado por la Sociedad Española de Neurociencia. *Revista de Neurología.* 41 (2): 53. Málaga, 15-18 de Septiembre de 2005.
8. **Tapias V, Escames G, León J, Acuña-Castroviejo D.** *Efecto de la melatonina, su metabolito y análogos sintéticos sobre la actividad nNOS/iNOS nigroestriatal en el modelo de parkinson inducido por MPTP en ratones.* XI congreso de la Sociedad Española de Neurociencia, organizado por la Sociedad Española de Neurociencia. *Revista de Neurología.* 41 (2): 72. Málaga, 15-18 de Septiembre de 2005.

LIBROS Y CAPÍTULOS DE LIBROS.

1. **Acuña-Castroviejo D, Escames G, Tapias V, Rivas I.** *Melatonin, mitochondria, and neuroprotection.* Ref libro: *Melatonin: Present and Future.* Ed. Nova Science Publisher, Inc. New Cork, USA. 2005.

Agradecimientos

Quisiera agradecer en primer lugar al profesor Darío Acuña Castroviejo, director de tesis, en cuyo laboratorio he llevado a cabo todo este enorme trabajo realizado. Gracias a él, que me ha transmitido constancia, ilusión por la ciencia, nuevos conocimientos y sobre todo formación investigadora, he podido desarrollar esta tesis y varios artículos científicos.

Este trabajo también se ha podido realizar gracias a la profesora Germaine Escames, que ha llevado a cabo la tarea de canular las ratas empleadas en esta tesis, además de enseñarme parte de la metodología desarrollada en ella.

No menos agradecimiento merecen mis numerosos compañeros, tanto a los que conocí al inicio, durante y al final de mi ciclo en el laboratorio. Cada uno, a su manera, ha influido no solo laboralmente, sino como auténticos amigos, apoyándome en los momentos más difíciles y prestando su ayuda desinteresadamente.

Y de esta manera tuve la suerte de conocer, a Olga, que aunque su paso por el laboratorio fue breve, tuvo tiempo de participar en dicha tesis y de hacerme feliz durante todo este tiempo; gracias por tu comprensión, afecto y apoyo en todo momento.

Agradecimiento al grupo de investigación de Química Farmacéutica, dirigido por el Dr. Don Antonio Espinosa, que me han suministrado los compuestos empleados en esta tesis y en especial a la Dra. María Luisa Carlota y a los doctores D. Antonio Entrena y Dña. María Encarnación Camacho por su interés.

También doy las gracias a algunos profesores de otros laboratorios (Nicolás Olea, Agatángelo Soler, José Manuel Ferrer...) por prestarme su ayuda y facilitar esta tesis doctoral, así como también a doctores y doctorandos que se hallan distribuidos por las distintas universidades españolas (Quique, Carlos Pérez, Alicia, Cruzmi, Entrena, Paco....).

Muchas gracias a mis amigos, que como siempre, constituyen una de las bases principales a lo largo de la vida de una persona; ellos no solo forman parte de mi trabajo, pues me han alentado, animado para concluir esta tesis sino que también forman parte de mi ocio y con los cuales he compartido momentos inolvidables, no solamente en Granada, sino en numerosos puntos del planeta: Miguel, Nacho, Manuel Jesús, Mario, Rebeca, M^a Jesús, Iago, Isidro, Tristán, Pepe, Sonia...y más amigos que seguro sabrán perdonarme por no poderlos enumerar.

Gracias a María del Carmen Sierra (departamento de bioquímica), que me ha aconsejado continuamente y me ha animado a seguir trabajando.

Y como me iba a olvidar de aquellas personas que han saciado durante cuatro años mi gran apetito: los camareros de la Facultad de Medicina, de los que guardo un excelente recuerdo y agradezco su atención.

Agradezco a la Fundación del Hospital Clínico el soporte institucional que me brindó, prácticamente desde el primer momento, para poder llevar a cabo esta tesis.

Para concluir, dar las gracias a mi familia, especialmente a mis padres. Es a ellos a los que le debo todo en esta vida, absolutamente todo. Me han inculcado todos sus valores, me han proporcionado todo lo que estaba a su alcance y más, me han transmitido incondicionalmente todo su apoyo y cariño, han soportado mis malos momentos, mis travesuras y mi indisciplina. Gracias, muchas gracias por existir y ser como sois.

Abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ADNmt: ácido desoxirribonucleico
mitocondrial.

ADP: adenosín difosfato.

AFMK: N¹-acetil-N²-formil-5-
metoxikinuramina.

AMK: N¹-acetil-5-metoxikinuramina.

AMPc: Adenosín 3'-5'-monofosfato cíclico.

AMPA: alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-
isoxazol.

aMT: melatonina.

ARNm: ácido ribonucleico mensajero.

ATP: adenosín trifosfato.

BDNF: factor neurotrófico derivado de
cerebro.

BH₄: tetrahidrobiopterina.

Ca²⁺: calcio.

CAM: calmodulina.

CL: cuerpos de Lewy.

c-mtNOS: óxido nítrico sintasa constitutiva
(mitocondrial).

COX: citocromo oxidasa.

CTE: cadena de transporte electrónico.

DA: dopamina.

DAT: transportador de dopamina.

eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial
(citosólica).

EP: enfermedad de Parkinson.

FAD: flavina adenina dinucleótido.

FADH₂: flavina adenina dinucleótido
reducida.

GABA: ácido gamma amino butírico.

GDNF: factor neurotrófico derivado de la
glía.

GP: globo pálido.

GPe: globo pálido externo.

GPI: globo pálido interno.

GPx: glutation peroxidasa.

GRd: glutation reductasa.

GSH: glutation reducido.

GSSG: glutation oxidado.

G6PD: glucosa-6-fosfato deshidrogenada.

HLA-DR: antígeno leucocitario humano.

HIOMT: hidroxindol-O-metiltransferasa.

H₂O₂: peróxido de hidrógeno.

IDO: indolamina-2,3-dioxigenasa.

IL: interleuquina.

i-mtNOS: óxido nítrico sintasa inducible
(mitocondrial).

iNOS: óxido nítrico sintasa inducible
(citosólica).

IRP: proteína reguladora de hierro.

L-DOPA: L-dihidroxifenilalanina.

LPO: peroxidación lipídica.

LPS: lipopolisacárido.

MAO: monoamina oxidasa.

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad.

MPDP⁺: ión 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridina.

MPP⁺: ión 1-metil-4-fenilpiridina.

MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina.

mtNOS: óxido nítrico sintasa mitocondrial.

NADH: nicotinamida adenín dinucleótido reducida.

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido.

NAT: N-acetiltransferasa.

NF- κ B: factor de transcripción KAPPA B.

NMDA: N-metil D-aspartato.

nNOS: óxido nítrico sintasa neuronal (citosólica).

NO[•]: óxido nítrico.

NOS: óxido nítrico sintasa.

NST: núcleo subtalámico de Luys.

OH[•]: radical hidroxilo.

ONOO⁻: peroxinitritos.

O₂^{-•}: anión superóxido.

Par-4: respuesta apoptótica de próstata 4.

PARS: poli ADP-ribosa sintetasa.

P_i: fósforo inorgánico.

PKC: proteína kinasa C.

RNS: especies reactivas de nitrógeno.

ROS: especies reactivas de oxígeno.

Serotonina: 5-hidroxitriptamina.

SN: sustancia negra.

SNC: sistema nervioso central.

SNpc: sustancia negra pars compacta.

SNpr: sustancia negra pars reticulata.

SOD: superóxido dismutasa.

SQ[•]: semiquinona.

ST: estriado.

tCM: tálamo centromediano.

tDM: tálamo dorsomedial.

TDO: triptófano-2,3-dioxigenasa.

TH: tirosina hidroxilasa.

TNF: factor de necrosis tumoral.

tVA: tálamo ventral anterior.

tVL: tálamo ventrolateral.

UPS: ubiquitina-proteosoma.

VMAT: transportador vesicular de monoaminas.

6-OHDA: 6-hidroxidopamina.

Índice

Introducción.

1- Enfermedad de Parkinson.....3

1.1.- Historia de la Enfermedad de Parkinson.....	3
1.2.- Epidemiología.....	4
1.3.- Fisiología de los ganglios basales.....	4
1.3.1.- Organización funcional de los ganglios basales. Neuroanatomía.....	5
1.3.2.- Neuroquímica de los ganglios basales. Neurotransmisión.....	6
1.4.- Fisiopatología de la EP.....	7
1.4.1.- Alteraciones del circuito motor.....	8
1.4.2.- Cuerpos de Lewy.....	9
1.5.- Etiología de la EP.....	10
1.5.1.- Factores ambientales.....	10
1.5.2.- Factores hereditarios ligados a genes.....	11
1.5.3.- Excitotoxicidad.....	12
1.5.4.- Anormalidades mitocondriales.....	14
1.5.5.- Acumulación de hierro en la SN.....	16
1.5.5.1. - Catabolismo de la dopamina.....	17
1.5.5.1.1. - Función neurotransmisora de la dopamina.....	18
1.5.5.1.2. - Importancia de la recaptación de dopamina y metabolismo enzimático y no enzimático.....	18
1.5.6.- Procesos inflamatorios.....	19
1.5.7.- Estrés oxidativo y mitocondria.....	20
1.6.- Apoptosis en la EP.....	25
1.7.- Modelos experimentales en la EP.....	26
1.7.1.- Mecanismo de acción del MPTP.....	27

2- Melatonina.....28

2.1.- Metabolismo de melatonina. Biosíntesis y degradación.....	29
---	----

2.2.- Mecanismos de protección mitocondrial de la melatonina.....	32
2.2.1.- Antioxidante de acción directa.....	33
2.2.2.- Antioxidante de acción indirecta.....	34
2.2.3.- Acción sobre la NOS mitocondrial.....	34
2.2.4.- Potenciación de la CTE.....	35
2.3.- Papel terapéutico de la melatonina en la fisiopatología del Parkinson.....	36

Objetivos.

<u>1- Objetivos.....</u>	<u>45</u>
---------------------------------	------------------

Material y métodos.

<u>1- Animales, procedimiento quirúrgico y tratamiento.....</u>	<u>51</u>
--	------------------

1.1.- Animales y grupos experimentales.....	51
1.2.- Procedimiento quirúrgico y tratamiento.....	51

<u>2- Obtención de la fracción mitocondrial.....</u>	<u>52</u>
---	------------------

2.1.- Aislamiento de la fracción mitocondrial por centrifugación diferencial y gradiente de densidad con percoll.....	52
---	----

<u>3- Métodos analíticos.....</u>	<u>53</u>
--	------------------

3.1.- Determinación de la concentración de proteínas: método de Lowry.....	53
3.2.- Determinación de la actividad óxido nítrico sintasa (citosólica y mitocondrial).....	54
3.3.- Determinación de la actividad específica de la NADH ubiquinona (CoQ) oxidoreductasa (Complejo I de la CTE).....	56
3.4.- Determinación de los niveles de nitritos.....	57
3.5.- Determinación de la peroxidación lipídica.....	58

<u>4- Análisis estadístico.....</u>	<u>58</u>
--	------------------

<u>5- Reactivos utilizados.....</u>	<u>59</u>
--	------------------

Resultados.

1- Resultados 'in vitro':.....65

1.1.- Melatonina.....	65
1.2.- Familia kinurenínica.....	66
1.3.- Familia kinurenamínica.....	67
1.4.- Familia pirazolínica.....	70
1.4.1.- Pirazolinas.....	70
1.4.2.- Pirazolidinas.....	85
1.4.3.- Pirazoles.....	89
1.4.4.- Pirroles.....	92
1.5.- Clasificación de los compuestos por mayor grado de inhibición de la nNOS.....	99
1.6.- Clasificación de los compuestos por mayor grado de inhibición de la iNOS.....	105

2- Resultados 'in vivo':.....111

2.1.- Actividad del complejo I de la CTE.....	112
2.1.1.- Kinureninas.....	112
2.1.2.- Kinurenaminas.....	113
2.1.3.- Pirazolinas.....	114
2.1.4.- Pirroles.....	115
2.2.- Actividad de la NOS en citosol y mitocondria de SN y ST.....	116
2.2.1.- Kinureninas.....	116
2.2.2.- Kinurenaminas.....	119
2.2.3.- Pirazolinas.....	121
2.2.4.- Pirroles.....	123
2.3.- Niveles de nitritos en citosol y mitocondria de SN y ST.....	125
2.3.1.- Kinureninas.....	125
2.3.2.- Kinurenaminas.....	126
2.3.3.- Pirazolinas.....	127
2.3.4.- Pirroles.....	128

2.4.- Oxidación de lípidos de membrana (LPO) en citosol y mitocondria de SN y ST.....	129
2.4.1.- Kinureninas	129
2.4.2.- Kinurenaminas.	131
2.4.3.- Pirazolinás.....	132
2.4.4.- Pirazolinás.....	133
2.5.- Clasificación de los compuestos por mayor grado de inhibición de la iNOS en el citosol de SN	134
2.6.- Clasificación de los compuestos por mayor grado de inhibición de la i-mtNOS en la mitocondria de SN.....	135

Discusión.

<i>1- Mitocondria y EP.....</i>	<i>139</i>
<i>2- Melatonina, AMK y análogos estructurales sintéticos en la EP.....</i>	<i>144</i>
<i>3- Resumen de los diferentes niveles de actuación de la melatonina y sus metabolitos en la EP.....</i>	<i>149</i>

Conclusiones.

<i>1- Conclusiones.....</i>	<i>153</i>
------------------------------------	-------------------

Bibliografía.

<i>1- Bibliografía.....</i>	<i>159</i>
------------------------------------	-------------------

Introducción

1. ENFERMEDAD DE PARKINSON.

1.1. Historia de la Enfermedad de Parkinson.

La primera descripción de la Enfermedad de Parkinson (EP) fue realizada en 1817 por el médico inglés **James Parkinson**. Sin embargo, algunos de los síntomas descritos por Parkinson ya habían sido mencionados mucho tiempo atrás; así, el físico griego Galeno distinguió en sus escritos el temblor en reposo producido durante el movimiento. En esta misma línea, el doctor Sylvius de le Boe, ya en el siglo XVII, realizó varios estudios basándose en los diferentes temblores de algunos enfermos, un temblor que aparecía en reposo (*tremor coactus*), mientras que otro aparecía cuando el paciente realizaba un movimiento voluntario (*motus tremulous*). Un siglo después, François Boissier de Sauvages añadió que los temblores de reposo, “palpitaciones” los llamaba, desaparecían cuando el paciente intentaba hacer algún movimiento (Goetz y cols., 2001).

Pero fue James Parkinson (1755-1824), médico general, geólogo y paleontólogo inglés, quien describió la enfermedad, a la que denominó *parálisis agitante* y describía como “movimientos involuntarios de carácter tembloroso, con disminución de la fuerza muscular que afectan a las partes que están en reposo y que incluso provocan una tendencia a la inclinación del cuerpo hacia delante y una forma de caminar con pasos cortos y rápidos. Los sentidos y el intelecto permanecen inalterados”. Esta definición detallada queda recogida en un tratado llamado ‘*Ensayo sobre la parálisis agitante*’ (Parkinson, 2002).

En 1880 se habló por primera vez de rigidez asociada a la EP. Jean-Martin Charcot (1825-1893), neuropatólogo francés, completó la definición de la patología y la bautizó como EP, en reconocimiento al trabajo olvidado de su colega británico. El francés observó con meticulosidad a sus pacientes y no pasó por alto la rigidez que presentaban, ni tampoco que no todos los enfermos de Parkinson sufrían temblores y parálisis (Teive, 1998). Fue en 1919 cuando Tretiakoff descubre la parte del cerebro implicada en la enfermedad, localizándola en la sustancia negra (SN) (denominada así porque sus neuronas contienen neuromelanina, un pigmento coloreado) situada en el mesencéfalo, que va perdiendo pigmento conforme van muriendo sus neuronas, las cuales producen un neurotransmisor: la dopamina (DA) (Kapp, 1992). En 1955, Arvid Carlson (Premio Nobel de Medicina, 2000) demostró que el 80% de la DA del cerebro se encuentra en los ganglios basales (Carlson, 1955). En 1961, Oleh Hornykiewicz desentrañó la clave de la enfermedad: una disminución de la DA en el cuerpo estriado (ST) y putamen (Hornykiewicz, 1963).

Finalmente, la implicación de estas estructuras cerebrales en la patogénesis de la EP ha conducido a un exhaustivo estudio de los ganglios basales en las últimas décadas, llegando a la formulación de un modelo de organización de los ganglios basales universalmente aceptado,

y como resultado, a un mejor entendimiento de la enfermedad (Alexander y cols., 1986, 1990; Albin y cols., 1989; Bergman y cols., 1990).

1.2. Epidemiología.

La EP es la neurodegeneración más frecuente después de la enfermedad de Alzheimer. Dependiendo del estudio, la incidencia anual es de 110 a 330 casos por cada 100.000 habitantes con una edad superior a los 50 años, de 1.800/100.000 (1.8%) en individuos mayores de 65 años y de 2.600/100.000 (2.6%) para el caso de una población mayor de 85 años (Mayeux, 2003); en España están afectadas unas 110.000 personas, por lo que la tasa de prevalencia se estima en 180-200/100.000 habitantes (Artacoz-Sanz y cols., 1995). La edad media de comienzo de la EP son los 55-60 años, y aproximadamente el 5-10% de los casos de Parkinson ocurren en personas menores de 40 años de edad (Costa y cols., 2001). La enfermedad ataca a hombres y mujeres casi por igual pero progresa con mayor rapidez en los primeros (las mujeres ancianas parecen tener mayor riesgo de alteraciones posturales, mientras que los hombres de rigidez y temblor). Se encuentra una incidencia más alta de parkinsonismo en las personas que residen en áreas rurales, en particular aquellos que beben agua de pozos privados, o son agricultores expuestos a pesticidas y herbicidas, como la rotenona, el paraquat, etc (Brown y cols., 2006) aunque también se ha relacionado la EP con la exposición a determinados productos industriales o a metales (cobre, plomo, hierro, mercurio, aluminio, etc.).

En líneas generales, se estima que la prevalencia de la demencia en la EP varía de acuerdo a la población estudiada, a la definición de demencia que se utilice y a las técnicas que se usen para la evaluación. En todo caso, hay un hecho evidente: el incremento espectacular de la esperanza de vida en los países occidentales ha producido un envejecimiento de la población, con el consiguiente incremento de las enfermedades propias de las décadas más avanzadas de la vida, entre ellas la EP.

1.3. Fisiología de los ganglios basales.

Los ganglios basales constituyen un conjunto de núcleos subcorticales implicados en el control del movimiento voluntario. La degradación de la SN se traduce en que los ganglios basales reciben cantidades reducidas de catecolaminas, neurotransmisor que contribuye a la precisión de los movimientos y coordina los cambios de postura; los ganglios basales procesan las señales y transmiten la información.

En la EP se produce una degeneración en las células dopaminérgicas de la SN que ocasiona una pérdida o eficiencia en la acción de la DA y menos conexiones con otras células nerviosas y músculos.

1.3.1. Organización funcional de los ganglios basales. Neuroanatomía.

Filogenéticamente los ganglios basales se dividen en: arquiestriado, compuesto por el cuerpo amigdalino; paleoestriado, formado por el globo pálido interno (GPi) y externo (GPe) y neoestriado, en el que se incluyen los núcleos caudado, putamen, accumbens y el tubérculo olfatorio (Herrero y cols., 2002; McHaffie y cols., 2005). Además, la SN y el núcleo subtalámico de Luys (NST) se consideran parte de los ganglios basales por su importante relación anatomofuncional con el paleoestriado y neoestriado. Funcionalmente el paleoestriado y el neoestriado están divididos en dos porciones, una dorsal y otra ventral, con diferentes funciones. Los núcleos caudado, putamen y globo pálido (GP) constituyen la parte dorsal del sistema y estarían relacionados con funciones sensitivo-motoras, aunque parece que el caudado participa preferentemente en circuitos cognitivos y el putamen en circuitos motores. Por el contrario, los núcleos accumbens, el tubérculo olfatorio y la porción rostral de la sustancia innominada conformarían la parte ventral del sistema que estaría relacionado con funciones límbicas (Luquín y cols., 1998).

La corteza cerebral de los mamíferos esta conectada de forma masiva con los ganglios basales a través de 'núcleos de entrada', que reciben información directa del córtex cerebral y 'núcleos de salida', que a través del tálamo envían de nuevo la información hacia la corteza. En los ganglios basales, el neoestriado representa el centro de entrada de información y el GPi junto a la sustancia negra pars reticulata (SNpr), constituyen los núcleos eferentes (Bolam y cols., 2000). Tradicionalmente se pensaba que los núcleos eferentes de los ganglios basales alcanzaban una única región del tálamo ventrolateral (tVL), que a su vez proyectaba sobre un área cortical concreta, la corteza motora primaria. Sin embargo, en la actualidad se admite que las eferencias desde los ganglios de la base alcanzan múltiples subdivisiones del tVL, ventral anterior (tVA), dorsomedial (tDM) y centromediano (tCM) (Percherón y cols., 1996) a través de las cuales los ganglios basales alcanzan regiones dispersas de la corteza cerebral hasta ahora no reconocidas (Middleton y cols., 2000).

El circuito motor se origina en neuronas del área motora suplementaria, córtex premotor, motor y corteza somatosensorial. Estas áreas proyectan principalmente al putamen de manera somatotópica desde donde alcanzan la porción ventrolateral del GPi, GPe y la parte caudolateral de la SN. Desde el GPi el circuito alcanza los núcleos tVL, tVA y tCM, cerrándose el recorrido con proyecciones eferentes desde estos hacia la corteza motora, premotora y área motora suplementaria (Alexander y cols., 1986, 1990). Además los núcleos talámicos reciben proyecciones directas desde el putamen y la corteza cerebral (figura 1).

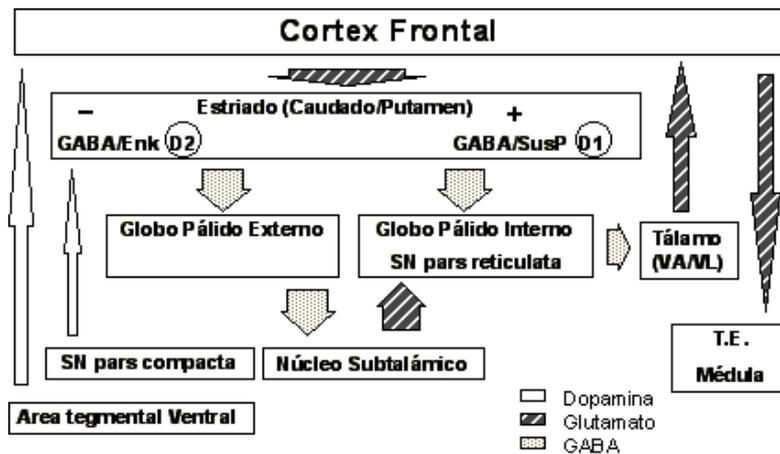


Figura 1. Circuito motor. SN= Sustancia negra; VA= Ventral anterior; VL= Ventral lateral; T.E.= Tronco del encéfalo; D1= Receptores dopaminérgicos D1; D2= Receptores dopaminérgicos D2.

La distribución somatotópica de las neuronas encargadas de la modulación del movimiento se mantiene a lo largo de todo el circuito de manera que las neuronas relacionadas con los movimientos de la pierna están localizadas dorsalmente, las correspondientes a los movimientos orofaciales ventralmente y las relacionadas con los movimientos del brazo en medio de ambas.

1.3.2. Neuroquímica de los ganglios basales. Neurotransmisión.

Los ganglios basales utilizan una variada gama de neurotransmisores, entre ellos, los más importantes son: ácido gamma amino butírico (GABA), glutamato, acetilcolina y la DA. Las estructuras que componen cada uno de los cinco circuitos existentes son las mismas incluyendo el córtex frontal, ST (núcleo caudado, putamen y ST ventral) GP, SN y tálamo. En cada uno de los circuitos se distinguen dos vías: 1) una vía directa que conecta el ST con el GPi/SNpr y 2) una vía indirecta con proyecciones estriatales al GPe y desde este al complejo GPi/SNpr a través del NST. Tanto la vía directa como la indirecta proyectan desde el complejo GPi/SNpr hacia núcleos talámicos y desde estos hacia la corteza (Mink JW, 1996).

La organización bioquímica básica de todos los circuitos es semejante. Desde las áreas motoras de la corteza, fibras excitatorias glutamatérgicas alcanzan el ST estableciéndose de este modo sinapsis glutamatérgicas excitadoras con los receptores ionotrópicos del glutamato (ácido propiónico alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol (AMPA) y N-metil D-aspartato (NMDA). Estas células estriatales, a su vez, envían proyecciones inhibitorias GABAérgicas tanto a las neuronas del GPi/SNpr (vía directa) como a las neuronas del GPe (vía indirecta). En la vía indirecta, las neuronas del GPe envían proyecciones inhibitorias GABAérgicas hacia el NST, el cual a su vez conecta con el complejo GPi/SNpr mediante fibras excitatorias glutamatérgicas. Además de GABA, la vía directa utiliza sustancia-P/dinorfina en sus

proyecciones estriopallidales y se origina en una población neuronal que contiene una densidad elevada de receptores dopaminérgicos D1. La vía estriopallidal indirecta contiene como neurotransmisores GABA y Leu-encefalina y las neuronas estriatales en las que se origina tienen una expresión muy elevada de receptores dopaminérgicos D2. Finalmente el complejo GPi/SNpr proyecta hacia los núcleos talámicos utilizando GABA como neurotransmisor, los cuales cierran el circuito a través de proyecciones excitatorias que llegan al área cortical donde se originó el circuito (Luquín y cols., 1998) (figura 2).

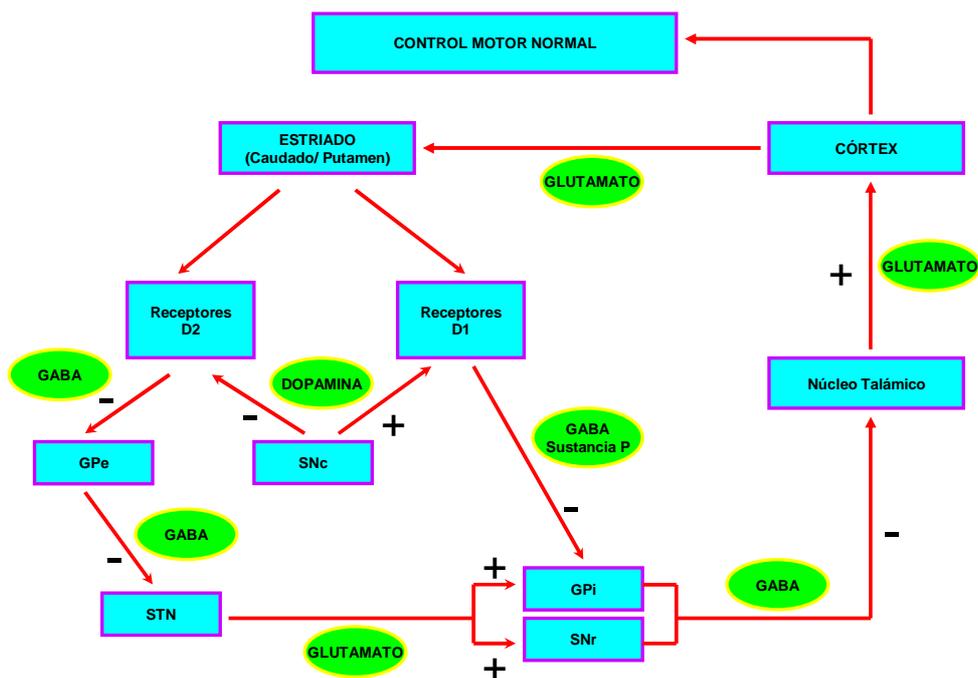


Figura 2. Representación esquemática de la conexión entre los ganglios basales y la corteza motora. La vía que conduce desde el ST hacia la SNp o GPi es conocida como vía directa. La vía que va del ST hacia el GPe, la STN y entonces a la SNpr o GPi es conocida como vía indirecta. Bajo condiciones normales, las salidas tanto de la vía directa como de la indirecta se encuentran en equilibrio. El ST conecta con los núcleos de salida de los ganglios basales.

1.4. Fisiopatología de la EP.

La EP se caracteriza por una degeneración progresiva de la SN y locus coeruleus y aparición de los cuerpos de Lewy (CL) en el citoplasma neuronal (Harrower y cols., 2005); es un desorden neurodegenerativo crónico que se debe a la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la SNpc y de sus fibras proyectantes en el ST, implicadas en la modulación del funcionamiento de los ganglios basales (Blandini y cols., 2000). Los estudios han demostrado que los pacientes de Parkinson tienen una pérdida del 70-80% de las células productoras de DA en la SN. La disfunción de la respiración mitocondrial (Dabbeni-Sala y cols., 2001) afecta a todos los niveles del control motor: movimientos reflejos (rigidez), automáticos (hipocinesia,

temblor) y voluntarios (bradicinesia). Estas neuronas mesencefálicas, particularmente las localizadas en la SNpc, contienen un pigmento denominado neuromelanina. En la EP esta zona, al ser observada al microscopio, aparece despigmentada, con marcada pérdida neuronal y gliosis.

1.4.1. Alteraciones del circuito motor.

Las alteraciones de los ganglios basales producen movimientos involuntarios, pobreza y lentitud de movimiento, y alteraciones de tono y postura. Los movimientos involuntarios corresponden a signos positivos de la enfermedad, es decir, resultantes de la liberación de la función de circuitos de los ganglios basales. Las enfermedades motoras se caracterizan también por signos negativos, resultado de la abolición de los circuitos neuronales. Tal es el caso de la lentitud en la iniciación del movimiento (bradiquinesia) de la EP. El cuadro hipocinético del Parkinson es la situación farmacológica inversa de los síndromes hiperkinéticos, o sea, se exagera con bloqueo dopaminérgico D2 o con agonistas colinérgicos, y se mejora con agonistas dopaminérgicos o con anticolinérgicos.

En un cerebro normal, los niveles de DA y acetilcolina se encuentran en equilibrio e igualados en sus funciones inhibitorias y excitatorias; el elemento principal que constituye la base fisiopatológica de la EP es una reducción de los impulsos dopaminérgicos desde la SN al ST, originándose por un lado una hiperactividad del circuito estriopallidal indirecto. La inhibición de las neuronas del GPe que se produce tras la denervación dopaminérgica induce secundariamente una activación del NST el cual a su vez produce una hiperactividad del GPi/SNpr lo que conduce a una mayor inhibición del tálamo sobre la corteza cerebral (córtex) (Bonnet y cols., 1999). El resultado neto sería una inhibición del movimiento. Por otro lado la pérdida del tono dopaminérgico produce una menor actividad del circuito estriopallidal directo aumentando de esta manera la actividad neuronal del GPi/SNpr, y contribuyendo de esta manera a incrementar el estado hipocinético (Bergman y cols., 2002) (figura 3). Esta secuencia de hechos, se correlaciona mejor con el mecanismo de la acinesia/bradicinesia que con los otros síntomas que presenta la enfermedad (Elsworth y cols., 1997).

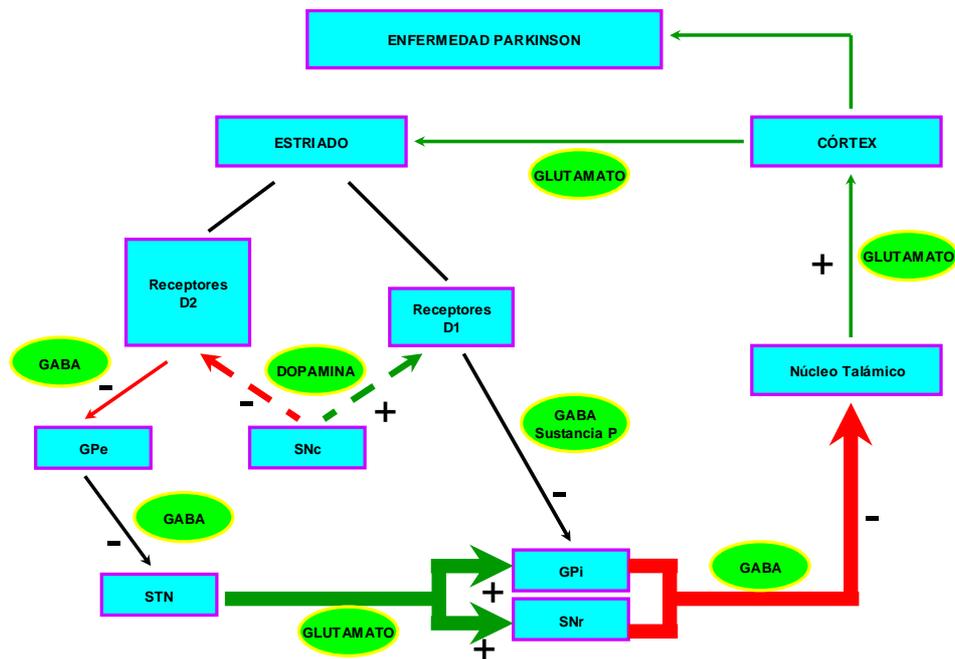


Figura 3. Este modelo propone que la depleción de DA, tal y como ocurre en la EP, conduce a una sobreactivación de la vía indirecta y una regulación a la baja de la vía directa. El resultado se traduce en un incremento en la actividad de los núcleos de salida de los ganglios basales hacia el tálamo, lo que conduce a una inhibición de la excitación glutamatérgica del córtex motor, produciéndose una excesiva inhibición de esta estructura con una activación reducida de las regiones motoras corticales y por tanto, el desarrollo de los efectos parkinsonianos (bradicinesia, rigidez).

1.4.2. Cuerpos de Lewy.

Histológicamente, la EP se caracteriza por la presencia de los CL en la SN; están muy diseminados, pero se localizan fundamentalmente en los núcleos que contienen neuromelanina como son los núcleos de troncoencéfalo (locus coeruleus, núcleos del rafe, núcleo motor del vago), en el núcleo basal de Meynert y ganglios simpáticos (McKeith, 2000). La pérdida neuronal en la SN es la más importante por el déficit de DA y la degeneración de la vía nigro-estriada. Los CL fueron descritos originariamente por Frederick Lewy en 1912 y corresponden a inclusiones neuronales eosinófilas, constituidos por neurofilamentos que se acumulan tras su fragmentación y fosforilación anormal y por numerosas proteínas, ácidos grasos libres, esfingomielina y polisacáridos. No está claro si los CL actúan como neuroprotectores o bien como perpetradores (Harrower y cols., 2005). El hecho de que la mayor parte de las proteínas que forman los CL se encuentren fosforiladas y que el enzima superóxido dismutasa (SOD) se encuentre presente dentro de los cuerpos sugiere la implicación de mecanismos oxidativos en su formación. La ausencia de la proteína Tau en los CL aumenta la especificidad de estas inclusiones en relación con el origen de la EP. Sin embargo, al igual que ocurre con el resto de inclusiones intraneuronales en las enfermedades neurodegenerativas, la importancia

etiopatogénica de los CL no está aclarada. En concreto, no se ha definido si representa neuronas en proceso de degeneración o bien, si se trata de una respuesta reactiva a un proceso tóxico, siendo por tanto un mecanismo de defensa intracelular (Harrower y cols., 2005).

Entre las proteínas que constituyen los CL, encontramos la ubiquitina, neurofilamentos, elementos proteosomales y α -sinucleína, que es la más importante, numerosa y puede ser modificada oxidativamente (Spillantini y cols., 1997). Mutaciones en el gen de esta proteína presináptica están ligadas a la EP familiar, sugiriendo un papel central de la α -sinucleína en la patogénesis de dicha enfermedad; así, modificaciones (truncación, fosforilación) en la α -sinucleína conlleva a la formación de CL (Baba y cols., 1998).

1.5. Etiología de la EP.

La controversia existente en cuanto a la etiología y patogénesis de esta enfermedad todavía persiste. Dicha etiología es multifactorial y no del todo bien conocida, por lo que resulta muy difícil desarrollar fármacos apropiados que impidan la progresión de la enfermedad. Para hacer posible el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas se requiere un conocimiento mucho más amplio de los mecanismos que van a conducir finalmente a la muerte neuronal que ocurre en la EP, en especial de aquellas formas menos conocidas. Hasta el momento se han descrito diversos mecanismos relacionados con la etiología y la evolución de la EP (mecanismos que contribuyen a la degeneración y muerte selectiva de las neuronas dopaminérgicas); entre ellos los más estudiados son: factores ambientales, hereditarios ligados a genes, excitotoxicidad, anormalidades mitocondriales, acumulación de hierro en la SN y estrés oxidativo.

En estos últimos años ha tomado fuerza la teoría de que los radicales libres están plenamente implicados en el desarrollo de la EP, siendo la mitocondria el principal generador y diana de éstos cuando se produce una deficiencia en su actividad; esta teoría propone que el aumento de radicales libres genera una alteración de los mecanismos antioxidantes y por tanto se produce un estrés oxidativo que daña estructuras celulares, lo cual conduce a la muerte celular. Además también son de considerable importancia los radicales libres procedentes de la oxidación de la DA, de la deficiencia en el funcionamiento de los enzimas antioxidantes e incluso, el efecto citotóxico generado por esos radicales libres (excitotoxicidad).

1.5.1. Factores ambientales.

Entre ellos podemos encontrar neurotoxinas endógenas y exógenas (Tablas 1 y 2) (Di Monte, 2003; Logroscino, 2005).

Tabla 1. Factores ambientales y EP: claves epidemiológicas

Factor de riesgo	Agente
Aumento de riesgo	
Exposición a pesticidas	Paraquat, organoclorinas, carbamatos
Exposición a metales	Hierro, cobre
Disminución de riesgo	
Tabaco	Nicotina, Monoamino oxidasa (MAO _B)
Consumo de café	Cafeína

Tabla 2. Factores ambientales y EP: modelos experimentales

Modelo	Agente
Modelos de patología y comportamiento similares a la EP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), rotenona
Lesión nigroestriatal discreta	Paraquat
Cambios de desarrollo	Lipopolisacárido (LPS)
Toxicidad sinérgica	MPTP/DDC, paraquat/DDC Aluminio/DDC, rotenona/ (LPS)
Efectos aditivos	Metales/pesticidas
Neuroinflamación	MPTP, LPS
Interacciones proteína/ sustancia química	α -sinucleína/metales α -sinucleína/pesticidas
Neuroprotección	Nicotina, inhibidores de la MAO _B

1.5.2. Factores hereditarios ligados a genes.

Los genes que confieren susceptibilidad o que son causa directa de la EP se les agrupa como genes PARK (PARK1-PARK 10), que codifican a una proteína diferente. El PARK1 es el gen que codifica la proteína denominada α -sinucleína, se encuentra localizado en el cromosoma 4, se transmite de modo autosómico dominante, con aparición temprana de los síntomas y desarrollo rápido de la enfermedad. Estudios post-mortem muestran la presencia de la proteína en los CL, preferentemente en su zona interna. Existen datos que parecen indicar que la α -sinucleína puede regular el pool de DA intracelular bien a través de la regulación de la tirosina hidroxilasa (TH) o bien a través de la expresión del transportador de la captación de DA (DAT) (Fahn y cols., 2004). El PARK5, que codifica la proteína UCH-L1, localizado en el cromosoma 4, se transmite de modo autosómico dominante, con comienzo temprano de los síntomas y progresión rápida; también se desarrollan CL (Gasser, 2005). El grupo de genes cuyas mutaciones inducen Parkinson familiar también comprende el NR4A2, cuya proteína pertenece a la superfamilia de receptores nucleares, la NURR; este es el gen del locus PARK7, además conocido como DJ-1. Este receptor nuclear es esencial para la adquisición y

mantenimiento del carácter dopaminérgico de la neurona. En su ausencia o con un funcionamiento anómalo, las neuronas dopaminérgicas son muy escasas en número. Este factor es capaz de modular la expresión del enzima inicial de la vía de síntesis, que es la TH, modificando también las respuestas del sistema noradrenérgico (Vila y cols., 2004).

Otros genes que confieren susceptibilidad están relacionados con enzimas del metabolismo y detoxificación de fármacos, pesticidas y en general xenobióticos, así como factores que afectan el nivel redox de la célula y el funcionamiento mitocondrial. Entre ellos destacan los relacionados con el enzima GST; el enzima es capaz de bloquear grupos sulfidrilos susceptibles de ser oxidados y es una protección contra problemas oxidativos. Otro gen implicado es el del citocromo CYP2D6, cuya isoforma tipo 4 confiere susceptibilidad a Parkinson tardío (Guerrero y cols., 2002).

Finalmente el enzima de detoxificación, conocido como N-acetilasa, que acetila grupos -NH₂ formando enlaces amida, puede conferir susceptibilidad a Parkinson cuando está presente la isoforma de acetilación lenta, la N-acetiltransferasa 2 (NAT2); el sistema de degradación proteica ubiquitina-proteosoma (UPS) ejerce un papel central en la homeostasis neuronal, regulando la degradación fisiológica de las proteínas normales así como aquellas dañadas o con alteraciones en su plegamiento. Existen diversos factores que pueden alterar la función del UPS y dar lugar a neurodegeneración y patogénesis en la EP (Betarbet y cols., 2005). Por otra parte, la actividad del proteosoma 26S disminuye en la SNpc de pacientes con la EP, cuya inhibición incrementa el daño oxidativo a proteínas (Huang y cols., 2004).

1.5.3. Excitotoxicidad.

La excitotoxicidad se podría definir como el proceso en el que hay una activación excesiva de los receptores de glutamato. El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio y su interacción con receptores específicos de la membrana es la responsable de algunas funciones neurológicas: cognición, memoria y sensación. Uno de los efectos de la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las células es la liberación de glutamato, un neurotransmisor excitatorio que da lugar a la denominada '*neurotoxicidad glutamatérgica*' y que se debe a la unión del glutamato a su receptor NMDA (Atlante y cols., 2001). Existen dos tipos de receptores glutamatérgicos: receptores ionotrópicos (NMDA y no-NMDA) y los receptores metabotrópicos. En la EP tiene lugar un excesiva activación de los receptores NMDA debido a la exposición del glutamato, induciendo así un incremento en la concentración de calcio (Ca²⁺) intracelular que una vez que pasa al interior de la mitocondria, constituye el llamado complejo calcio-calmodulina (Ca²⁺-CaM). Consecuentemente, se produce una activación de los enzimas Ca²⁺-dependientes, entre ellos la óxido nítrico sintasa (NOS) generándose óxido nítrico (NO^{*}) en elevadas concentraciones. Este NO^{*} puede difundir a la célula presináptica, donde aumenta la liberación de glutamato GMPc-dependiente, cerrándose

el ciclo y generando excitabilidad neuronal. Se ha sugerido que el descenso de los niveles de Ca^{2+} mitocondrial, seguido de un importante incremento en la concentración de Ca^{2+} citosólico, representa una etapa anterior hacia la excitotoxicidad y la muerte celular (Plaitakis y cols., 2000; Escames y cols., 2004). Por tanto, esta neurotoxicidad mediada por el Ca^{2+} se basa en dos mecanismos: en la producción excesiva de NO^{\bullet} y en una disfunción mitocondrial.

Por otra parte, el glutamato por sí solo es capaz de inhibir la recaptación de la cisteína, molécula precursora de la síntesis intracelular de glutatión, lo que provoca un descenso de las defensas antioxidantes de la neurona y un aumento en los niveles de radicales libres (Tan y cols., 1998). El glutamato también puede ser tóxico de manera indirecta; cuando ocurre una despolarización neuronal (por reducción en los niveles de adenosín trifosfato o ATP), disminuye el bloqueo de magnesio voltaje-dependiente del receptor NMDA de glutamato. Bajo estas condiciones, incluso niveles normales de glutamato extracelular pueden causar una activación excitotóxica de los receptores NMDA y un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular. Además, se ha demostrado que defectos crónicos en el complejo I pueden conducir a una activación anormal de los receptores NMDA y, al mismo tiempo, volver a las neuronas más vulnerables a su sobreexcitación (Greene y cols., 1996).

En la EP, un aumento en la sensibilidad a la excitotoxicidad puede ser especialmente perjudicial; al estar degeneradas las terminales nerviosas dopaminérgicas de la vía nigroestriatal, las células del NST están sobreactivadas (Hamani y cols., 2004). Estas células son excitadoras y glutamatérgicas y sus terminaciones actúan sobre neuronas de la SN (figura 4). La SN es el blanco de las entradas glutamatérgicas desde el córtex y el NST. De esta manera se acentúa el daño sobre las neuronas dopaminérgicas, ya existente per sé.

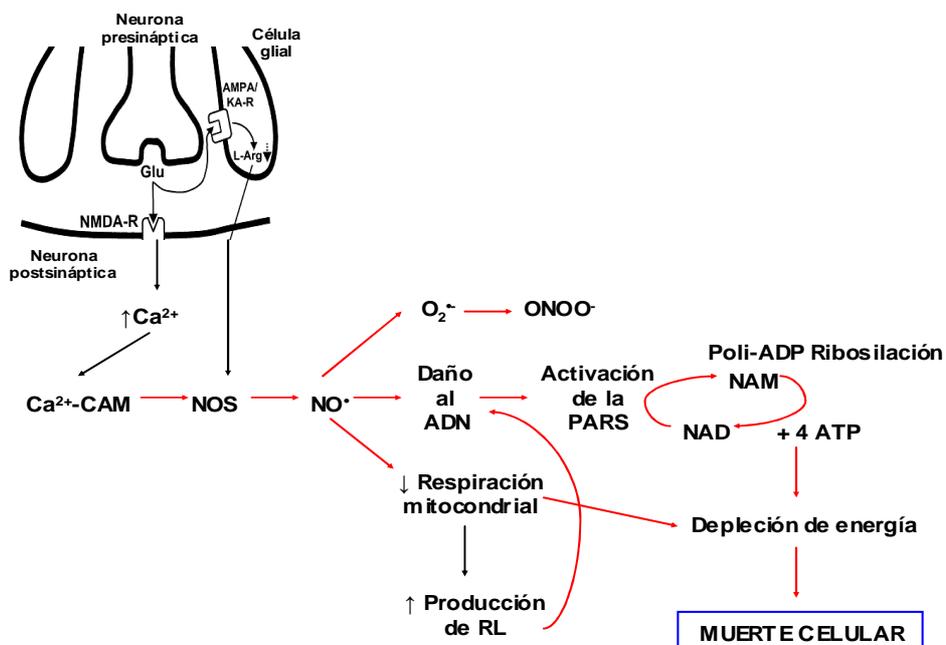


Figura 4. Mecanismo de neurotoxicidad del NO^{\bullet} .

1.5.4. Anormalidades mitocondriales.

Las mitocondrias son orgánulos esenciales para el mantenimiento funcional y la viabilidad de las células. Su función principal es la producción de ATP a través del acoplamiento de la fosforilación oxidativa con la respiración aeróbica (sistema OXPHOS, figura 5), proporcionando del 90-95% del requerimiento energético (Acuña-Castroviejo y cols., 2001; León y cols., 2004). El piruvato entra en la mitocondria y es descarboxilado, generando acetilCoA, que es oxidado en el ciclo de Krebs, donde se forman los equivalentes reductores (nicotinamida adenín dinucleótido reducida o NADH y flavina adenina dinucleótido reducida o FADH₂), los cuales presentan una capacidad donadora de electrones muy elevada y la energía se va liberando a lo largo de una serie de reacciones redox en las crestas mitocondriales con la participación de complejos enzimáticos y coenzimas. Esta serie de reacciones constituye la cadena de transporte electrónico (CTE), la cual está formada por cuatro complejos multiproteicos unidos a la membrana interna de la mitocondria y por proteínas transportadoras (citocromos). El complejo I (NADH ubiquinona oxidoreductasa) cataliza la transferencia de electrones desde el NADH a la ubiquinona o coenzima Q (CoQ). El complejo II (succinato CoQ oxidoreductasa) cataliza la oxidación del succinato a fumarato (en el ciclo de Krebs) y transfiere también los electrones a la ubiquinona (en la CTE). El complejo III (citocromo c oxidoreductasa) participa en la transferencia de electrones entre los complejos III y IV. El complejo IV (citocromo c oxidasa o COX) transfiere cuatro electrones desde el citocromo c a una molécula de oxígeno, creándose una molécula de agua. Esta transferencia de electrones entre los distintos complejos de la CTE se aprovecha de forma indirecta para sintetizar ATP. Al principio de la cadena las moléculas reducidas NADH y FADH₂ transfieren los electrones del hidrógeno al siguiente complejo enzimático y liberan protones a la matriz mitocondrial. Los electrones fluyen entre los complejos gracias a un gradiente electroquímico propiciado por los complejos III y IV y al transporte realizado por la ubiquinona y el citocromo c. La transferencia electrónica entre los complejos I y IV es efectuada a través de subunidades portadoras de grupos prostéticos. La energía liberada durante este proceso se usa en los complejos I, III y IV para bombear protones de la matriz mitocondrial al espacio intermembrana. La acumulación de protones en este espacio frente a los electrones de la matriz, crea un potencial eléctrico que tiende a llevar a los protones de nuevo a la matriz; se origina un gradiente protónico en la membrana interna asociado a una diferencia de potencial. La membrana interna presenta una impermeabilidad extrema a los protones y se hace necesaria la intervención del complejo V (F₀-F₁-ATP sintasa) para que puedan ser transportados de nuevo al interior de la mitocondria. Esta entrada de protones genera energía que es usada para sintetizar ATP a partir de adenosín difosfato (ADP) y fósforo inorgánico (Pi).

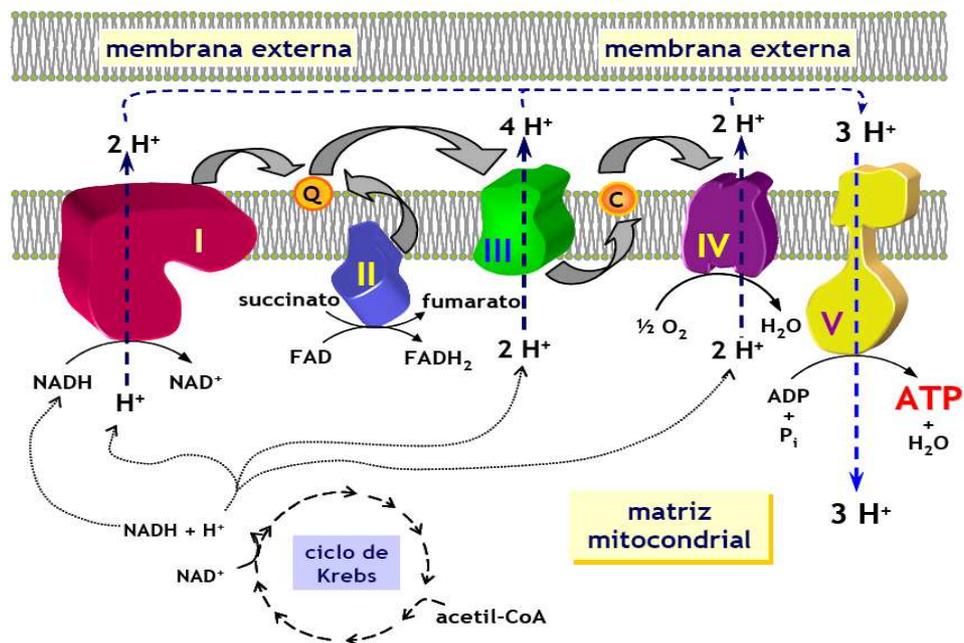


Figura 5. Esquema de la CTE acoplada a la fosforilación oxidativa.

Dos requisitos son necesarios para que se produzca la fosforilación oxidativa: integridad de la membrana interna y concentración elevada de protones en el espacio intermembrana. La fosforilación oxidativa genera la mayor parte del ATP celular y cualquier alteración en la capacidad de la mitocondria para producir dicha energía puede tener consecuencias fatales; pero no sólo debido a la falta primaria de ATP, sino también al desequilibrio indirecto que se ocasionaría en las funciones derivadas, como la producción de ROS, el mantenimiento del orgánulo, la regulación de la apoptosis y la homeostasis celular del Ca^{2+} y la glucosa (Duchen, 1999; León y cols., 2004; León y cols., 2005). La alteración en la producción de ATP podría ser el evento a partir del cual se activarían los diferentes mecanismos de señalización celular (Orth y cols., 2002).

En la EP, se ha observado que aproximadamente tiene lugar una disminución del 40% en la actividad del complejo I de la CTE en la SNpc, lo cual contribuye a la degeneración celular al disminuir la síntesis de ATP y por tanto, a un defecto en la bioenergética (Greenamyre y cols., 2001; Tretter y cols., 2004). Se ha sugerido la posibilidad de que mutaciones en el ácido desoxirribonucleico mitocondrial (ADNmt) puedan ser el origen del daño en el complejo I, siendo el estrés oxidativo el causante de los defectos en el ADNmt (Sherer y cols., 2002) y la MAO la fuente de radicales libres a este nivel.

Por otra parte, la exposición a agentes ambientales tóxicos podrían ser también la causa de la inhibición de dicho complejo. El complejo I es el que ejerce mayor control sobre la respiración mitocondrial y su inhibición hace que tenga lugar un escape masivo de electrones hacia el complejo II, que genera de 5 a 7 veces más radicales libres que cuando los electrones

pasan por el complejo I (Dykens, 1994) y que el complejo III se pueda reducir, continuando así el flujo electrónico hasta la oxidasa terminal de la cadena. No obstante, este flujo está mermado ya que los electrones no han podido ser canalizados bajo el primer controlador de la cadena y el poder reductor disponible procede sólo del FADH₂, que va directamente al complejo II. Esto hace que el complejo I sea más vulnerable que el resto de complejos de la CTE al estrés oxidativo y que, al mismo tiempo, actúe como fuente de ROS (Schapira, 1994; Tretter y cols., 2004) (figura 6).

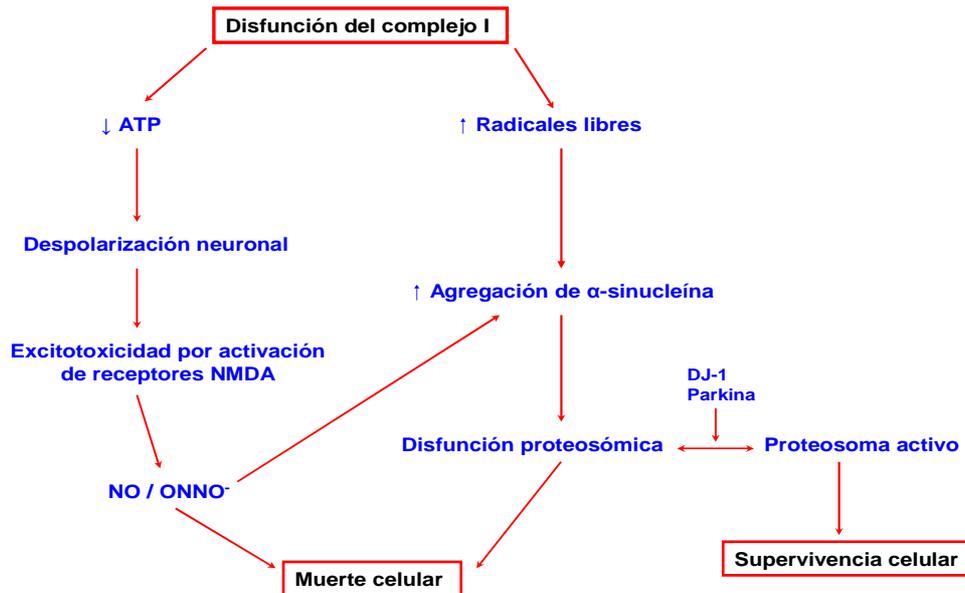


Figura 6. La disfunción del complejo I puede ser fundamental en la EP, ya que conduce a un aumento de estrés oxidativo, formación de radicales libres y disminución en los niveles de ATP; esto último produce una despolarización de la membrana y contribuye a un daño neuronal excitotóxico y además a un daño mediado por radicales libres, como el NO[•] y el ONOO⁻. La lenta y crónica deficiencia del complejo I conlleva una acumulación de α-sinucleína la cual conduce a una disfunción del proteosoma y contribuye a la muerte celular.

1.5.5. Acumulación de hierro en la SN.

El hierro es un elemento esencial para el desarrollo de las actividades celulares, pero en exceso, puede ser tóxico para las células. Debido a su alta reactividad, el Fe²⁺ (ferroso) se oxida a Fe³⁺ (férrico) en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, lo que conduce a un aumento del estrés oxidativo. La regulación del almacenamiento y transporte de hierro está determinado por la cantidad de receptor de transferrina y lactoferrina y por la cantidad de ferritina generada. El aumento de la cantidad de receptores de transferrina o lactoferrina, incrementa el transporte de hierro, mientras que un aumento en los niveles de ferritina, determina la concentración de hierro libre en la célula. Dos proteínas homólogas denominadas proteínas reguladoras del hierro o IRP (IRP1 e IRP2) regulan el nivel de receptores de la transferrina, los de lactoferrina y la ferritina en la célula (Kaur y cols., 2004). La SNpc contiene

un mecanismo adicional para el almacenamiento de hierro. La neuromelanina se acumula en la SN con la edad, como un producto procedente de la autooxidación de la DA.

Numerosos estudios indican que en la EP existe un funcionamiento anormal en el transporte y almacenamiento de hierro. Al estudiar la expresión de transferrina y lactoferrina en la EP, se observó un aumento en la lactoferrina mientras que en el caso de la transferrina disminuía. Este incremento de lactoferrina podría ser la responsable de la excesiva acumulación de hierro en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc. Por otro lado, se lleva a cabo una unión del hierro a la α -sinucleína, de manera que el hierro incrementa enormemente la agregación de α -sinucleína (Wolozin y cols., 2002).

1.5.5.1. Catabolismo de la dopamina.

Cuando la enfermedad progresa, disminuye el número de receptores de DA, aparentemente por la concomitante degeneración de sitios blanco para ésta en neuronas del ST. Las neuronas dopaminérgicas son particularmente sensibles al estrés oxidativo debido al elevado y permanentemente nivel de radicales libres que se generan (Tieu y cols., 2003; Przedborski y cols., 2005). La DA puede ser degradada enzimáticamente o no enzimáticamente. Tanto en la síntesis de DA por medio de la TH como en su metabolismo enzimático normal, vía MAO, se genera peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (figura 7), que en presencia de metales (como el hierro) puede originar, a través de la reacción de Fenton, radicales libres más peligrosos. Una vez sintetizada, la DA es captada por un sistema independiente de energía y almacenada en vesículas en forma de complejos proteínicos.

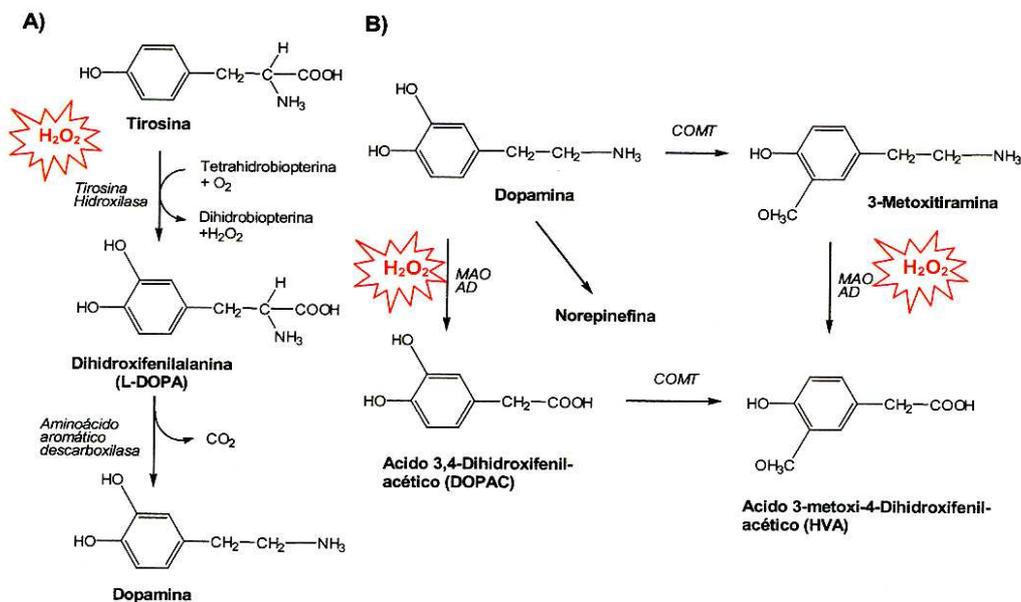


Figura 7. Vías de síntesis (A) y degradación (B) enzimáticas de la DA. En estos procesos se libera H_2O_2 , siendo la MAO la que mayor cantidad de peróxido libera.

Por otra parte, la autooxidación no enzimática de la DA produce neuromelanina (Fedorow y cols., 2005), proteína con papel citoprotector capaz de secuestrar iones metálicos, fundamentalmente hierro. Un exceso de H_2O_2 oxida al hierro, formando radicales hidroxilo (OH^\bullet) a través de la reacción de Fenton. Curiosamente, la mayoría de las neuronas de la SNpc afectadas en la EP son aquellas que contienen neuromelanina (Hirsch y cols., 1988).

Al presentar un grupo catecol inestable, la DA también puede sufrir oxidación espontánea originando radicales anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) y semiquinonas (SQ^\bullet), que reaccionan a su vez con más moléculas de DA generando un elevado número de ROS. Hay que remarcar que la pérdida neuronal es preponderante a nivel de la región lateral y ventral de la SNpc; este patrón relativamente selectivo es diferente al observado durante el envejecimiento, donde se aprecia una pérdida preferente de la población de neuronas situadas en la zona medial.

1.5.5.1.1. Función neurotransmisora de la dopamina.

La DA está almacenada en vesículas y se libera a la sinapsis por exocitosis regulada. La DA actúa sobre el ST a través de receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G, modulando generalmente los niveles de Adenosín 3'-5'-monofosfato cíclico (AMPC) y la fosforilación de proteínas; estos receptores son conocidos como D1, D2, D3, D4 y D5. Los tipos D1 y D5 activan el enzima adenilatociclasa, incrementando los niveles de AMPC, mientras que D2 y D3, D4 los disminuyen. En el núcleo del ST existe una gran abundancia de receptores tipo D1, sobre todo en el soma de las neuronas colinérgicas, que a su vez establecen sinapsis inhibitorias tanto en el GP como formando un bucle de retrocontrol sobre las neuronas dopaminérgicas de la SN.

1.5.5.1.2. Importancia de la recaptación de dopamina y metabolismo enzimático y no enzimático.

El neurotransmisor, una vez que ha actuado, es recaptado con gran selectividad por el transportador específico localizado en las terminales sinápticas dopaminérgicas, que se denomina DAT. Aproximadamente el 95% de la DA es internalizada para su reutilización. La DA, una vez internalizada al citosol de la neurona dopaminérgica, necesita ser recaptada por el transportador vesicular. Este transportador es menos selectivo y puede internalizar todas las aminas aromáticas, por eso se denomina transportador vesicular de monoaminas (VMAT). Existen dos genes con distinta distribución en las neuronas simpáticas centrales y periféricas; en las neuronas dopaminérgicas se expresa sobre todo el gen del VMAT2 (Jankovic y cols., 2005). La captación eficaz por parte de la vesícula es absolutamente necesaria, pues de otro modo la DA podría difundir hasta la membrana externa de la mitocondria, donde está localizada la enzima monoamina oxidasa (MAO).

1.5.6. Procesos inflamatorios.

La SN es rica en microglía comparada con otras regiones cerebrales (Lawson y cols., 1990; Kim y cols., 2000). Además, las neuronas dopaminérgicas en la SN presentan niveles reducidos de glutatión, lo que las hace más susceptibles al daño (Kim y cols., 2000).

Elevados niveles de citoquinas pro-inflamatorias y el aumento del estrés oxidativo en muestras de cadáveres parkinsonianos sugieren que la activación de la microglía podría desempeñar un papel fundamental en el proceso neurodegenerativo (Greenamyre y cols., 1999). Estudios epidemiológicos indican una correlación entre daños cerebrales en edades tempranas y el desarrollo de la EP posteriormente, implicando procesos inflamatorios y activación de la microglía (McGeer y cols., 1988). Como la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la EP está asociada a un incremento de la reacción glial (Forno y cols., 1992; Banati y cols., 1998; Mirza y cols., 2000), los datos sugieren que la activación de la microglía podría participar en los procesos neurodegenerativos en la EP.

La respuesta glial es mayor en la SNpc que en el ST, aunque el daño observado en la vía dopaminérgica es más severo en el ST (McGeer y cols., 1988); ello puede deberse al hecho de que las neuronas dopaminérgicas presentan la mayor parte de su estructura en la SNpc, mientras que las sinapsis dopaminérgicas representan menos del 15% de las estructuras estriatales. La razón por la cual los pacientes de Parkinson presentan bajos niveles de DA se debe a la degeneración de la vía nigroestriatal, constituida por neuronas dopaminérgicas cuyos cuerpos celulares están localizados en la SNpc y cuyos axones y nervios terminales proyectan en el ST (Dauer y cols., 2003).

La microglía activa se caracteriza por la expresión del antígeno de histocompatibilidad o complejo mayor de histocompatibilidad, concretamente el II (MHCII) (McGeer y cols., 1988; Hurley y cols., 2003), que en humanos se denomina HLA-DR (antígeno leucocitario humano). La expresión de este antígeno se correlaciona con la presentación de antígenos a los linfocitos T, que presentan un elevado poder citolítico (Watts y cols., 2003).

Otro rasgo característico de la EP es el aumento de citoquinas, como el factor de necrosis tumoral (TNF- α) que induce la activación del factor de transcripción KAPPA B (NF- κ B), las interleuquinas (IL 1- β) y el interferón- γ , (Hunot y cols., 2003; Hartmann, 2005) que son potentes activadores de la NOS citosólica inducible (iNOS) en los astrocitos, con el consecuente aumento de NO^{*} (figura 8) (Hunot y cols., 1999; Stewart y cols., 2003).

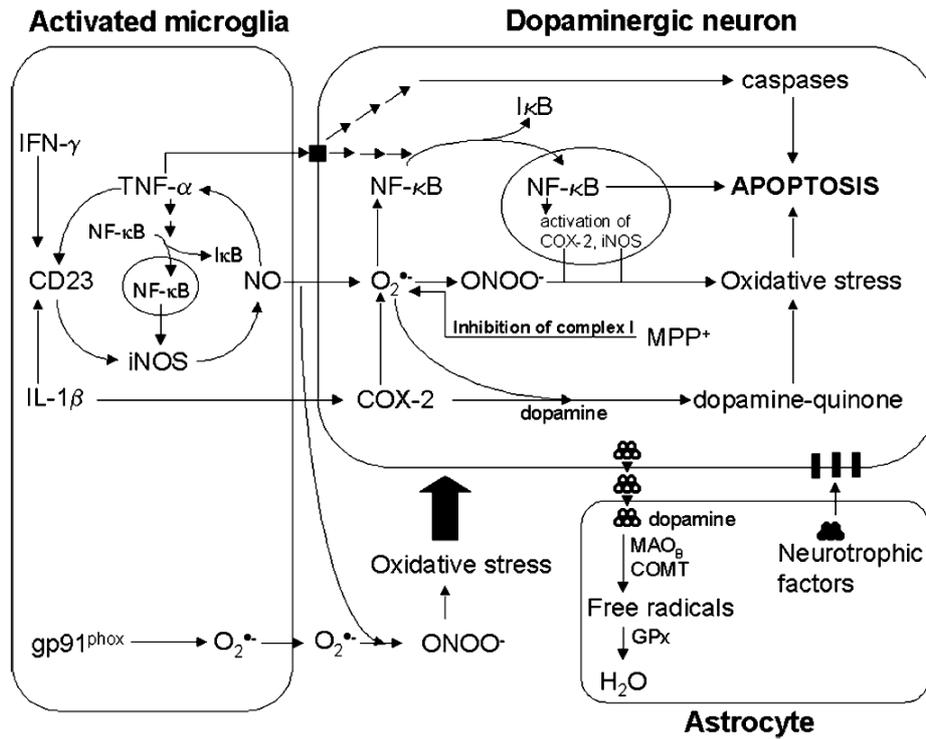


Figura 8. Implicación de las células gliales en la patogénesis de la EP. La activación de las células de la microglía contribuyen a la neurodegeneración dopaminérgica por la liberación de compuestos citotóxicos como las citoquinas ($TNF-\alpha$, $IFN-\gamma$, $IL-1\beta$) que inducen la expresión de la $iNOS$ y por tanto, la liberación de NO , el cual puede difundir hacia las neuronas dopaminérgicas circundantes donde puede reaccionar con el $O_2^{\bullet-}$ (procedente de la $COX-2$ o de la inhibición del complejo I) formando $ONOO^-$. Todo ello conduce a la muerte de la neurona. Los astrocitos pueden liberar factores neurotróficos, o metabolizar DA por la MAO_B o la $COMT$, eliminando radicales libres a través de la GPx , presentando un efecto neuroprotector.

1.5.7. Estrés oxidativo y mitocondria.

El estrés oxidativo constituye una alteración producida por un desequilibrio entre la generación de radicales libres y los sistemas de defensa antioxidante, que puede conducir a un estado de daño tisular (Davies, 1999). Actualmente, se piensa que los radicales libres, que son moléculas inestables y potencialmente perjudiciales generadas por acciones químicas normales resultantes de la inhibición mitocondrial, son los responsables del daño neuronal. Los radicales libres son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado en su capa externa, por lo que son muy reactivos y de vida efímera, con una enorme capacidad para combinarse inespecíficamente en la mayoría de los casos, así como con la diversidad de moléculas integrantes de estructura celular: carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y derivados de cada uno de ellos (Kehrer, 1993; Bandyopadhyay y cols., 1999). Pueden proceder de fuentes exógenas (fuentes ambientales) o endógenas (síntesis de novo en el interior de los tejidos), siendo la mitocondria, a través de la CTE, la principal fuente de radicales libres.

Una consecuencia directa de este proceso es que entre los nutrientes iniciales y la generación de energía al final del proceso, se forman varias moléculas con diferente grado de oxidación. Algunas de ellas puede entregar 1 ó 2 electrones al oxígeno y producir intermediarios parcialmente reducidos que son los radicales libres como el $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 y OH^{\bullet} (Cadenas y colbs., 2000; Acuña-Castroviejo y colbs., 2001). Otras fuentes serían los peroxisomas, leucocitos y xantina deshidrogenasa. Los radicales libres desempeñan un papel fisiológico clave en la homeostasis, como es el caso del NO^{\bullet} sintetizado por la NOS; los radicales derivados de ROS intervienen en la respuesta del estrés oxidativo y mantienen la homeostasis redox. Los radicales libres se clasifican según el grupo funcional presente en la molécula (Morrisey y colbs., 1998).

Frente a esta generación de radicales libres, la mitocondria presenta sus propios sistemas antioxidantes. En primer lugar, existe un leve desacoplamiento que previene un excesivo incremento de la fuerza protón motriz y, por tanto, formación de $O_2^{\bullet-}$. La mitocondria posee otros dos sistemas antioxidantes, como son la oxidación del $O_2^{\bullet-}$ a oxígeno por parte del citocromo c disuelto en el espacio intermembranal, y su dismutación por parte de la SOD, que convierte el $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 , el cual se convertirá finalmente en agua por medio del ciclo del glutatión (Skulachev, 1999).

El descubrimiento de que la mitocondria podría producir NO^{\bullet} (Bates y colbs., 1995; Frandsen y colbs., 1996), ha llevado a la caracterización de dos isoformas de la NOS mitocondrial (mtNOS) (Escames y colbs., 2006; López y colbs., 2006). Este hecho, junto con los efectos del NO^{\bullet} tanto en situaciones fisiológicas como fisiopatológicas en la mitocondria, han permitido considerar que la disfunción mitocondrial en la EP puede deberse a una inducción de la mtNOS y el consiguiente aumento de NO^{\bullet} . Esta inducción ocurre tanto a nivel de actividad como de expresión del enzima. El NO^{\bullet} es generado por la oxidación del grupo guanidino del aminoácido L-arginina catalizada por enzimas de la familia de NO^{\bullet} sintasas (NOS), que utilizan oxígeno y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH) como cosubstratos y generan L-citrulina como coproducto (Moncada y colbs., 1991; Dawson y colbs., 1996) (figura 9). La reacción oxidativa implica 5 electrones y esta estequiometría impar de la transferencia de electrones permite la generación de un radicales libres (Koppenol y colbs., 1996).

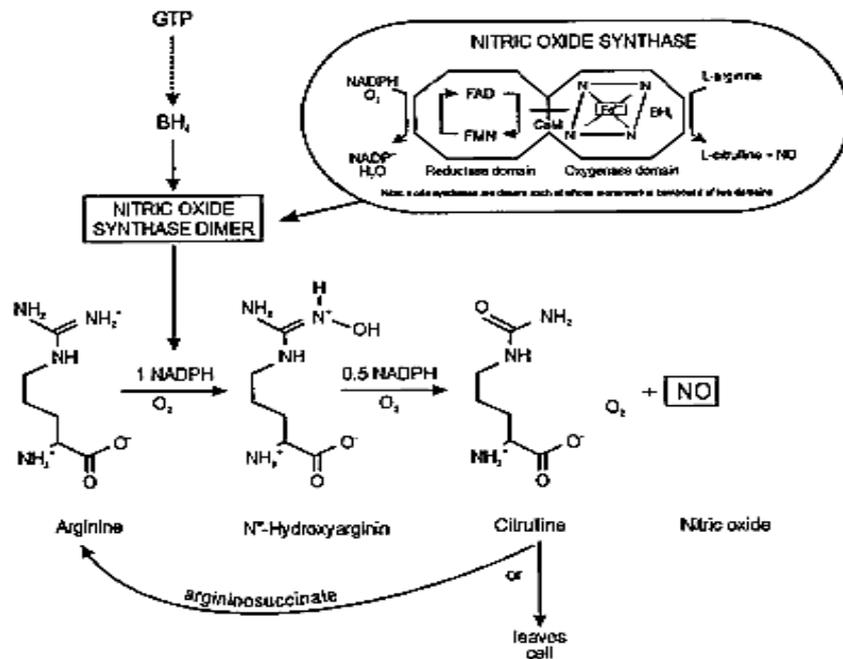


Figura 9. Producción de NO[•], el cual es generado por la oxidación del grupo guanidino del aminoácido L-arginina catalizada por las distintas isoformas de la NOS. El NADPH y el oxígeno son los cosubstratos y la L-citrulina sería el coproducto.

Parte del NO[•] que llega a la mitocondria proviene del producido a partir de varios isoenzimas de la NOS, principalmente de la NOS citosólica neuronal (nNOS), NOS citosólica endotelial (eNOS) e iNOS, siendo esta última la que produce masivas cantidades de NO[•] responsables de gran parte del daño oxidativo en muchos procesos incluyendo el envejecimiento mismo y enfermedades degenerativas. Pero la mayoría del NO[•] presente en la mitocondria proviene de la mtNOS (Haynes y colbs., 2004), la cual presenta dos isoformas, una constitutiva, Ca²⁺-dependiente (c-mtNOS), y otra inducible, Ca²⁺-independiente (i-mtNOS) (Escames y colbs., 2003, 2006; López y colbs., 2006). Además, el aumento de la actividad mtNOS, fundamentalmente de su componente inducible, es responsable de un incremento de estrés oxidativo, dañando la CTE (figura10).

Durante la EP, tiene lugar una inducción del componente inducible de la NOS como consecuencia de la reacción inflamatoria que se produce, con el consiguiente aumento de NO[•], que en exceso tiene efectos nocivos sobre la función mitocondrial. Así, se inhibe el complejo I de la CTE y se produce una disminución en los niveles de ATP, alterando la función mitocondrial y generando su muerte (por necrosis o apoptosis). Por otra parte, también tiene lugar un incremento de la formación de radicales libres (O₂^{-•}, H₂O₂ y peroxinitritos (ONOO⁻)); se estima que las mitocondrias constituyen la principal fuente subcelular de ROS (Carreras y colbs., 2004; Balaban y colbs., 2005; Chinopoulos y colbs., 2006).

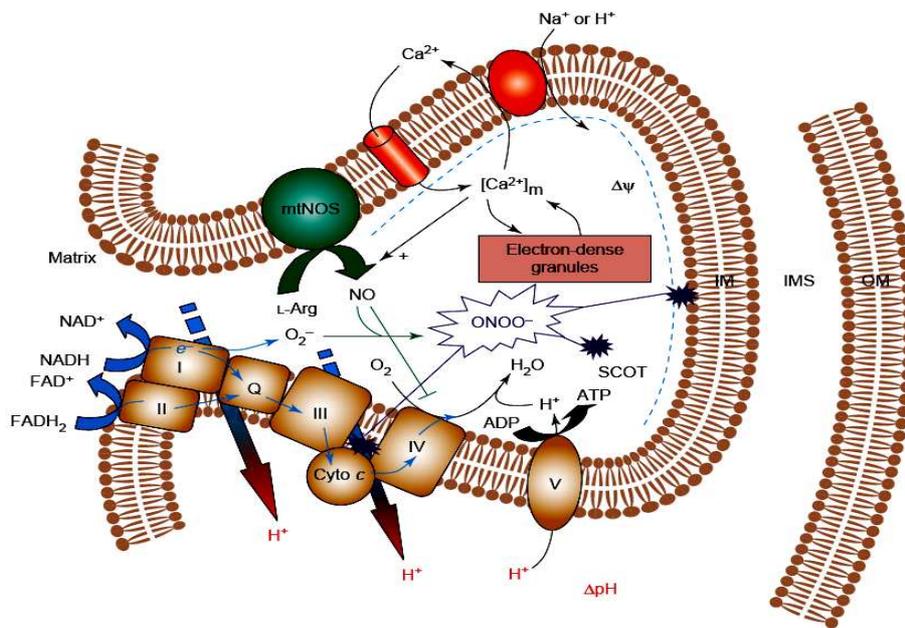


Figura 10. La mitocondria posee un tipo de NOS denominada mtNOS, la cual está asociada a la membrana mitocondrial interna y que genera NO^\bullet que a su vez compite con el oxígeno para unirse al complejo IV y regular así, la respiración mitocondrial. El NO^\bullet producido por la mtNOS reacciona rápidamente con el $\text{O}_2^{\bullet-}$, formando ONOO^- , que da lugar a la liberación de citocromo c, a un incremento de la peroxidación de los lípidos de la membrana mitocondrial y a un aumento del estrés oxidativo.

La SOD convierte el $\text{O}_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 mediante la reacción de Fenton; este último en presencia de Fe^{2+} produce OH^\bullet , reacción que es activada por Fe^{2+} y Cu^+ . (Ebadi y cols., 1996) De todos los radicales libres, el OH^\bullet resulta el más dañino, dado que su presencia, aunque sea solamente por una fracción de segundo, es capaz de destruir enzimas proteolíticas, de provocar la ruptura de polisacáridos y de causar peroxidación lipídica de la membrana (LPO), alterando su permeabilidad y las funciones asociadas (Halliwell y cols., 1984; Gotz y cols., 1990).

Otro aspecto clave en la formación de ROS es el mantenimiento de la fuerza proton-motriz, ya que si es demasiado alta pueden 'escaparse' electrones del complejo III generando ROS, y si es demasiado baja se reducen los niveles de ATP y el pool de NADPH pasa a estado oxidado (Nicholls y cols., 2000).

Las especies reactivas de nitrógeno (RNS) engloban principalmente al NO^\bullet y el producto de su reacción con el $\text{O}_2^{\bullet-}$, ONOO^- , que presentan un alto poder oxidante y son enormemente citotóxicos ya que inhiben irreversiblemente todos los complejos de la CTE, incluyendo la ATP sintasa, pudiendo ocasionar daño directo a las proteínas y al ácido desoxirribonucleico (ADN). También constituyen un potente inductor de la LPO que puede llegar a destruir a las neuronas, las cuales son especialmente sensibles a este proceso (Mattson, 1998). El NO^\bullet compite con el oxígeno por su sitio de unión al complejo IV, es decir, a la forma reducida del centro binuclear citocromo a_3 (Fe^{2+})-CuB (Cu^+). Por tanto, el NO^\bullet es un inhibidor de la citocromo oxidasa; esta

inhibición es reversible y se ha sugerido que puede darse por dos reacciones diferentes (Brown, 2001; Brookes y cols., 2002).

En conjunto, todas estas especies reactivas que pueden formarse en la mitocondria van a actuar dañando proteínas, el ADNmt y oxidando lípidos, provocando en último caso la disfunción mitocondrial, mitopoptosis y apoptosis (Turens, 2003). En la figura 11 se expone la forma en que influyen los radicales libres en las células del organismo y el daño que producen.

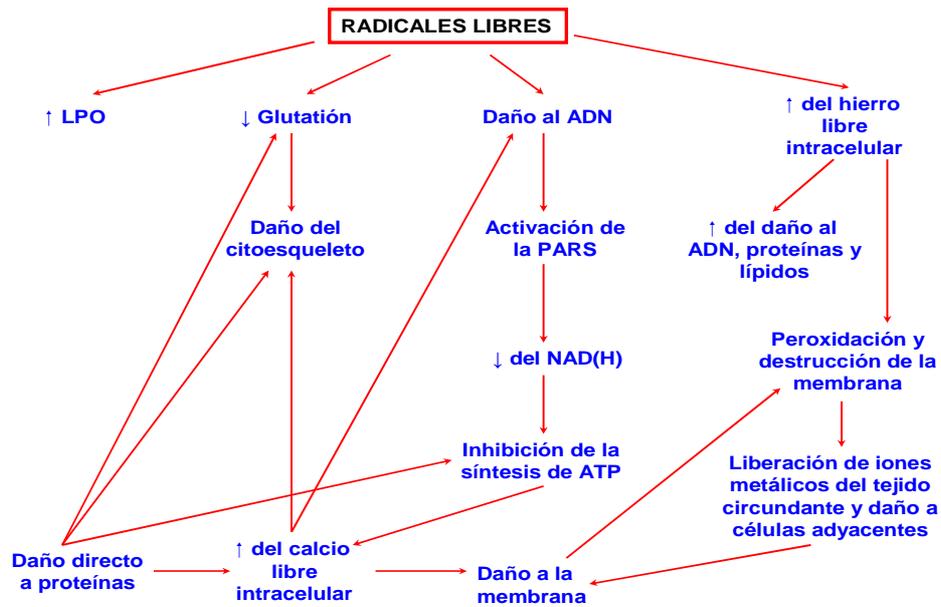


Figura 11. Mecanismos interactivos de los radicales libres que causan daño celular.

Por tanto, la etiología de la EP se podrían resumir en el siguiente esquema (figura 12):



Figura 12. Factores implicados en la etiología de la EP. Causas hipotéticas que podrían explicar la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la SN.

La producción de radicales libres en las neuronas se considera que es aún más elevada debido a su alto consumo de oxígeno; el cerebro utiliza el 20% del oxígeno basal a pesar de constituir solamente el 2-3% de la masa corporal total. En la figura 13, podemos ver un esquema en el cual se resumen las distintas causas por las cuales tiene lugar el daño en la SNpc.

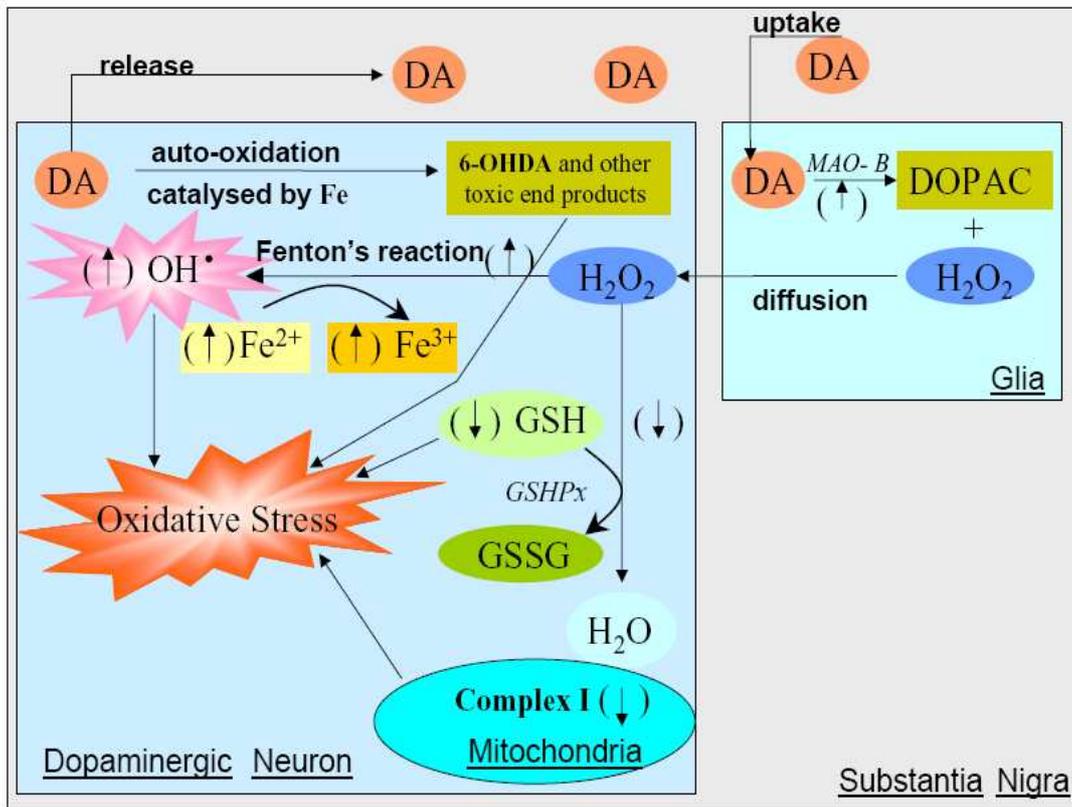


Figura 13. Vulnerabilidad de la SNpc al estrés oxidativo. Las flechas indican el incremento o disminución de los componentes cuyos niveles se alteran en la EP.

1.6. Apoptosis en la EP.

Actualmente se desconoce el mecanismo de muerte de celular desencadenado en la SN y que acaba con la degeneración y posterior desaparición de las neuronas dopaminérgicas. En función de cual sea ese mecanismo implicado, se podrán adoptar unas estrategias terapéuticas u otras. Además, el conocimiento de dicho mecanismo ayudaría aún más a entender la etiología de esta enfermedad y, probablemente al establecimiento de unas pautas a seguir para detectar la enfermedad en una fase temprana, cuando aún no ha comenzado la degeneración.

Existen, básicamente, dos tipos de muerte celular:

- **Necrosis**, o muerte por daño o agresión. La célula muere de forma drástica, no aislada, con daño en la membrana plasmática e inflamación del tejido circundante.
- **Apoptosis**, también conocida como muerte celular programada. Requiere expresión de nuevos agentes y síntesis de proteínas, y no lleva consigo ninguna respuesta inflamatoria.

Los eventos que acompañan a la degeneración de las neuronas dopaminérgicas parecen apuntar finalmente hacia la activación de la vía de muerte celular programada (Tatton y cols., 2003; Eberhardt y cols., 2003). Los estímulos de muerte por apoptosis pueden ser de diferente origen, aunque todos ellos convergen de algún modo en la mitocondria, utilizando para ello diferentes vías (Newmeyer y cols., 1994). Se conocen diversos mecanismos en los que participa la mitocondria que están implicados en la apoptosis: interrupción del transporte de electrones, alteración del potencial redox celular, liberación de factores promotores de la activación de las caspasas, etc.

1.7. Modelos experimentales en la EP.

En la última década ha existido un notable aumento en el uso de neurotoxinas para explorar el funcionamiento del sistema nervioso tanto en la salud como en la enfermedad. Una de las razones existentes, es que se han descubierto sustancias capaces de lesionar de forma selectiva los mismos sistemas neuronales que se afectan en las enfermedades neurodegenerativas lo que ha permitido usarlas como herramientas para el estudio de las enfermedades neurodegenerativas. Existe una gran variedad de modelos experimentales inducidos por neurotoxinas de diferente utilidad: rotenona, 6-hidroxidopamina (6-OHDA), paraquat, reserpina, meta-anfetamina, etc. La enfermedad producida por el MPTP es muy similar a la EP (Langston, 1987; Kopin y cols., 1988; Gerlach y cols., 1991), lo que permite usarlo no sólo para el desarrollo de nuevas terapéuticas de esta enfermedad sino para el estudio de los mecanismos de aparición de ésta. Las razones de este interés son varias:

- El MPTP es una de las neurotoxinas más selectivas identificadas hasta la fecha.
- Tiene su principal diana en los 2 grupos neuronales más afectados en la EP: la SN y el locus coeruleus, con afectación especialmente del primero.
- Ejerce su efecto neurotóxico tras administración sistémica, por lo que constituye un modelo para estudiar la hipótesis de la etiología de las toxinas ambientales.

Todo esto ha llevado al desarrollo de un modelo de EP ampliamente usado en la actualidad.

1.7.1. Mecanismo de acción del MPTP.

El MPTP es una molécula sencilla, altamente soluble y en su forma de base libre, volátil, capaz de producir depleción dopaminérgica estriatal en el ratón después de administración subcutánea, intraperitoneal y gastrointestinal. Por su volatilidad puede evaporarse a temperatura ambiente y absorberse por inhalación, habiéndose descrito la aparición de parkinsonismo en un químico por esta vía. El hecho de que la toxicidad sea posible por vías tan diferentes de absorción apoya el argumento de que una toxina pueda inducir un proceso neurodegenerativo después de exposición ambiental (Di Monte, 2003; Logroscino, 2005).

Así, la EP puede producirse experimentalmente mediante la administración de MPTP el cual, tras entrar en la circulación sistémica, se metaboliza a su intermediario MPDP⁺ (ion 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridina), que a su vez se transforma en su metabolito activo, MPP⁺ (ión 1-metil-4-fenilpiridina), en la glía mediante la MAO_B, que es un enzima de la membrana mitocondrial externa (Przedborski y colbs., 2004; Zang y colbs., 1993). La mayoría de los datos existentes sugieren que la toxicidad se ejerce a través del MPP⁺, el cual no cruza la barrera hematoencefálica (y sí en cambio el MPTP que es altamente hidrofílico) y posteriormente se acumula en las neuronas dopaminérgicas (Dunigan y colbs., 1996), donde es introducido a través del DAT (Storch y colbs., 2004). EL MPP⁺ se concentrado en la matriz mitocondrial de SNpc donde se une específicamente al complejo I de la CTE (Greenamyre y colbs., 2001), inhibiendo su actividad, disminuyendo los niveles de ATP y el potencial de membrana mitocondrial, llevando a la neurona a apoptosis (figura 14) (Tretter y colbs., 2004; Przedborski y colbs., 2004). Además, la inhibición del complejo I desvía el flujo de electrones hacia el complejo II, que genera de 5 a 7 veces más radicales libres que cuando los electrones pasan por el complejo I (Dykens, 1994).

El descenso del ATP y el aumento de los radicales libres aumenta la vulnerabilidad de la neurona, que presenta marcadores típicos del daño oxidativo a ese nivel: aumento de LPO y de hierro (causante de la producción de OH[•] a partir del H₂O₂ por la reacción de Fenton) y descenso del contenido de glutatión total y reducido (GSH), así como de la glutatión peroxidasa (GPx) y reductasa (GRd). El GSH es esencial para mantener la viabilidad mitocondrial, y su depleción causa degeneración mitocondrial y apoptosis (Jain y colbs., 1991).

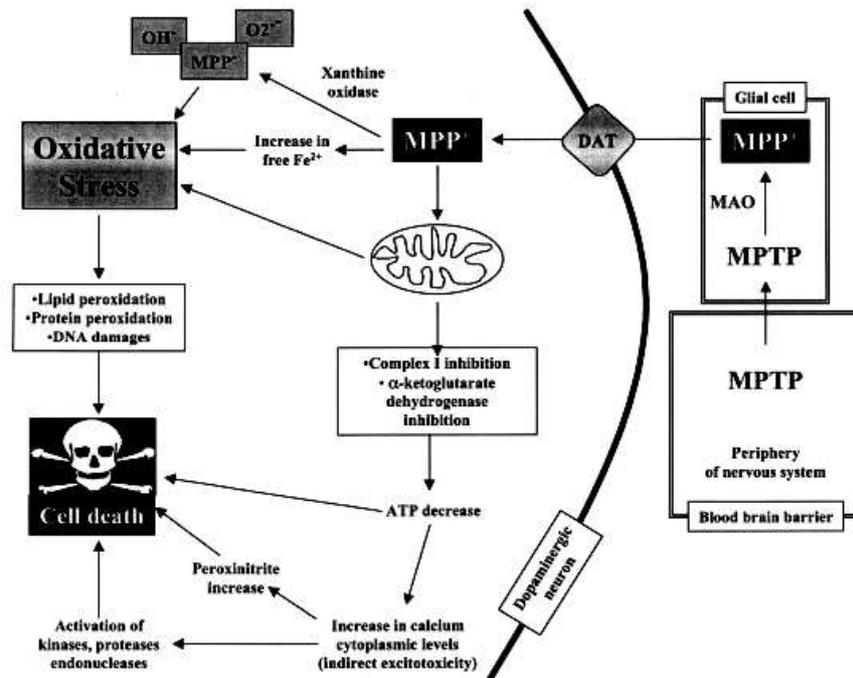


Figura 14. Mecanismo de acción del MPTP.

1. Melatonina

La melatonina o N-acetil-5-metoxitriptamina (aMT) es una indolamina descrita inicialmente por McCord y Allen (1917) y aislada, por primera vez, por Lerner (1958). Esta hormona fue descubierta inicialmente en la glándula pineal donde se sintetiza a partir de triptófano, aunque también puede ser producida por muchos otros tejidos del organismo (Tan y cols., 2000); así, los niveles tisulares de aMT son 2-3 órdenes de magnitud mayores que los del plasma (Reiter y cols., 2003). La aMT se concentra específicamente en determinadas organelas celulares, como el núcleo y la mitocondria (Menéndez-Peláez y cols., 1993) y ejerce sus acciones a través de dos mecanismos principales: efectos mediados por receptores (de membrana y nucleares), y efectos independientes de receptor. En cuanto a los receptores de membrana, podemos decir que, hasta el momento, se han clonado tres receptores de membrana de aMT, asociados a una proteína G_i de los cuales dos se encuentran en mamíferos y se han caracterizado en humanos (Conway y cols., 2000). En cuanto al receptor nuclear de aMT pertenece a la familia de los receptores retinoicos (RZR/ROR) (Acuña-Castroviejo y cols., 1993; Carlberg y cols., 1995).

Aunque inicialmente se encuadró a la aMT exclusivamente en la fisiología circadiana y reproductora, estudios posteriores permitieron relacionarla con aspectos de la fisiología intracelular independientes de sus acciones hormonales. Así, se demostró que la aMT es un potente depurador de radicales libres (Reiter y cols., 1994; Tan y cols., 2002). Asimismo, se

demonstró la capacidad de la aMT para unirse a proteínas citosólicas como la proteína quinasa C (PKC) (Benítez-King y colbs., 1996), la CAM (Pozo y colbs., 1994; León y colbs., 2000) y la calreticulina (Macías y colbs., 2003), permitiendo esta interacción modular las acciones intracelulares del Ca^{2+} .

En cuanto a su acción sobre el sistema nervioso central (SNC), la aMT regula tanto a los neurotransmisores como a sus receptores (Acuña-Castroviejo y colbs., 1986). La aMT regula la neurotransmisión GABAérgica por mecanismos dependientes de receptores opioides y aumenta los niveles de GABA (Rosenstein y colbs., 1990). También actúa directamente sobre aminoácidos excitadores como el glutamato (Pellegrini-Giampietro y colbs., 1990) e inhibe la activación de la nNOS a través de su interacción con el complejo Ca^{2+} -CAM (León y colbs., 1998b; León y colbs., 2000).

Metabolismo de la melatonina. Biosíntesis y degradación.

La aMT es un compuesto altamente conservado en la escala evolutiva, estando presente en muchos tipos de organismos, incluyendo bacterias, eucariotas unicelulares, microalgas, plantas, invertebrados y vertebrados. En mamíferos, el primer lugar donde se descubrió la síntesis de aMT fue en la glándula pineal, la cual poseía todos los enzimas necesarios para su síntesis a partir de la serotonina o 5-hidroxitriptamina (Axelrod y colbs., 1960) y su actividad bioquímica se veía afectada por los ciclos luz-oscuridad (Quay, 1964). Entonces, la síntesis de aMT en la glándula pineal funciona como un mensaje codificado de la duración de la oscuridad y es responsable de las concentraciones picomolar/nanomolar de la indolamina en plasma (Reiter, 1991).

En la glándula pineal, la aMT se sintetiza a partir del triptófano, que entra en el pinealocito por transporte activo en contra del gradiente de concentración (Sugden, 1979). Este triptófano se transforma, en primer lugar, en serotonina, por acción sucesiva de la L-triptófano hidroxilasa y de la 5-hidroxitriptófano descarboxilasa. Posteriormente, la serotonina se convierte en N-acetilserotonina por acción de la NAT, que actúa como enzima limitante en el proceso de síntesis de aMT. Finalmente, la N-acetilserotonina sufre una metilación por acción de la hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT) produciendo la molécula de aMT (figura 15).

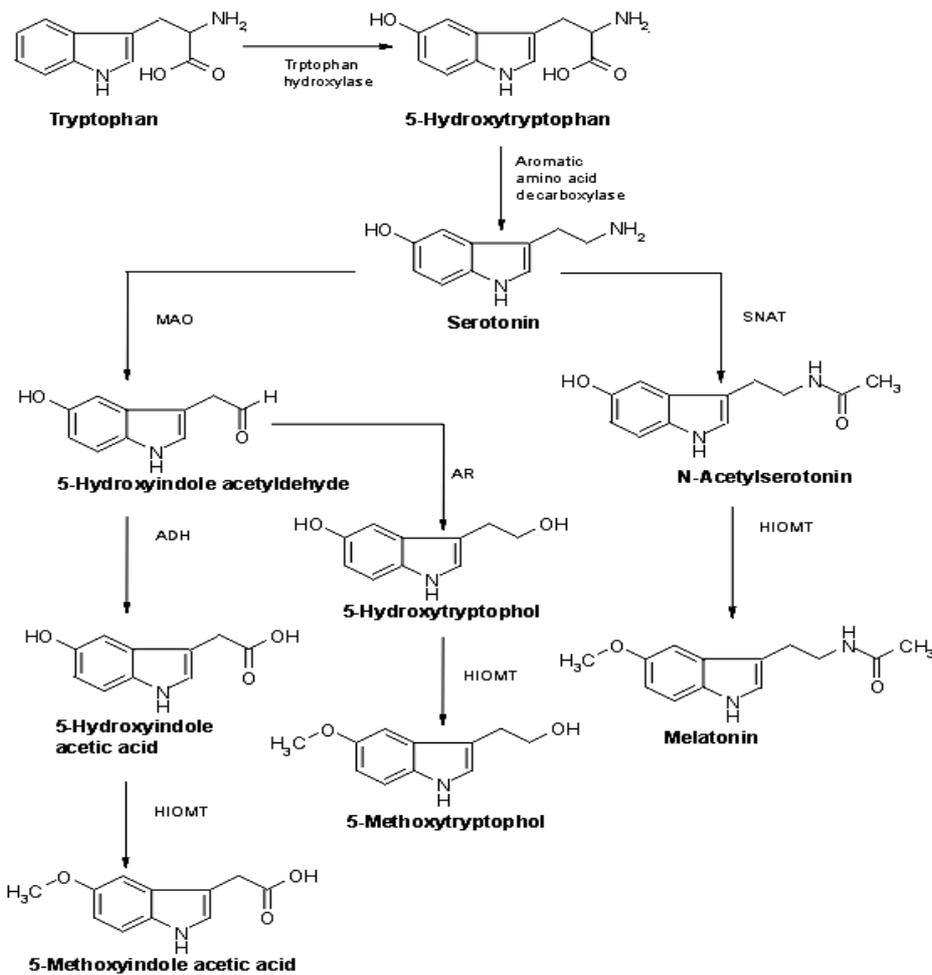


Figura 15. Síntesis de aMT a partir de la serotonina en la glándula pineal. NAT: N-acetiltransferasa; HIOMT: hidroxindol-O-metiltransferasa; SAM: S-adenosilmetionina; SAH: S-adenosilhomocisteína.

En cuanto a su degradación, fundamentalmente en la retina, aunque también en el hígado, la aMT puede sufrir descetilación y desaminación hasta convertirse en ácido 5-metoxiindolacético y 5-metoxitriptofol (Cahill y cols., 1989). Otra importante vía de degradación de la aMT es la que tiene lugar en el cerebro, plexo coroideo y pineal; en este caso, la indolamina se transforma primero en N¹-acetil-N²-formil-5-metoxikinurenamina (AFMK) y después en AMK (N¹-acetil-5-metoxikinuramina) (Hirata y cols., 1974; León y cols., 2006) (figura 16). El AMK también se excreta por la orina y su origen puede no ser exclusivamente cerebral; de hecho, la aMT puede transformarse de forma no enzimática en AMK, cuando en primer lugar depura un OH[•] y después un O₂^{•-} (Fujiwara y cols., 1978). Es interesante el hecho de que los metabolitos cerebrales de la aMT, el AFMK y su metabolito deformilado, el AMK (Hirata y cols., 1974; Hardeland y cols., 2005) manifiestan importantes propiedades antioxidantes, mayores que la aMT (Tan y cols., 2001; Mayo y cols., 2005). El AMK es más potente para inhibir *in vitro* e *in vivo* la actividad NOS estriatal que la aMT (León y cols.,

2006). La vía kinurenínica es la mayor ruta para el metabolismo del triptófano y está implicada en la disfunción cerebral de varias patologías (Stone y cols., 2002). Esta vía se activa por los radicales libres, interferones y citoquinas generados durante una respuesta inflamatoria. Los enzimas responsables de convertir el triptófano a kinurenina, indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO) y la triptófano-2,3-dioxigenasa (TDO), están activadas. El L-triptófano se metaboliza en el cerebro por dos vías principales, produciendo metoxindol y kinureninas. Como es sabido, en la vía metabólica kinurenínica del triptófano se sintetizan diferentes metabolitos, como son el ácido quinolínico, la L-kinurenina y el ácido kinurénico, los cuales pueden interactuar con el receptor NMDA (Schwarcz y cols., 2002). El ácido quinolínico y la L-kinurenina son agonistas del complejo receptor NMDA y están implicados en la patogénesis de varias enfermedades neurológicas, mientras que el ácido kinurénico es un antagonista no selectivo de la glicina_B en el sitio de reconocimiento del receptor NMDA, mostrando propiedades neuroprotectoras. Por tanto, estos metabolitos del triptófano interactúan con el complejo receptor NMDA de manera opuesta (León y cols., 1998a; Schwarcz, 2004). La kinurenina y el triptófano compiten por el mismo transportador para dirigirse a la sangre cerebral y en condiciones patológicas tiene lugar un cambio significativo en las concentraciones de estos compuestos neuroactivos en la sangre y en el cerebro.

Además, la vía kinurenínica incluye la 3-hidroxicinurenina y el ácido 3-hidroxiantranílico, compuestos que pueden generar radicales libres y consecuentemente, de estrés oxidativo, aumentando los niveles de LPO (Forrest y cols., 2004). Se ha demostrado que tanto la aMT como el AMK presentan propiedades antioxidantes (Reiter, 1995a) y neuroprotectoras (Acuña-Castroviejo y cols., 1995; León y cols., 2006), atenúa las respuestas mediadas por glutamato en el ST y sus efectos inhibitorios pueden ser mediados a través de la inhibición de la NOS de manera dosis-dependiente y CAM-dependiente (Carrión y cols., 2004); también pueden inhibir la actividad nNOS/iNOS en el citosol además de la actividad c-mtNOS/i-mtNOS en la mitocondria (López y cols., 2006; Escames y cols., 2006), reduciendo así la producción de NO[•].

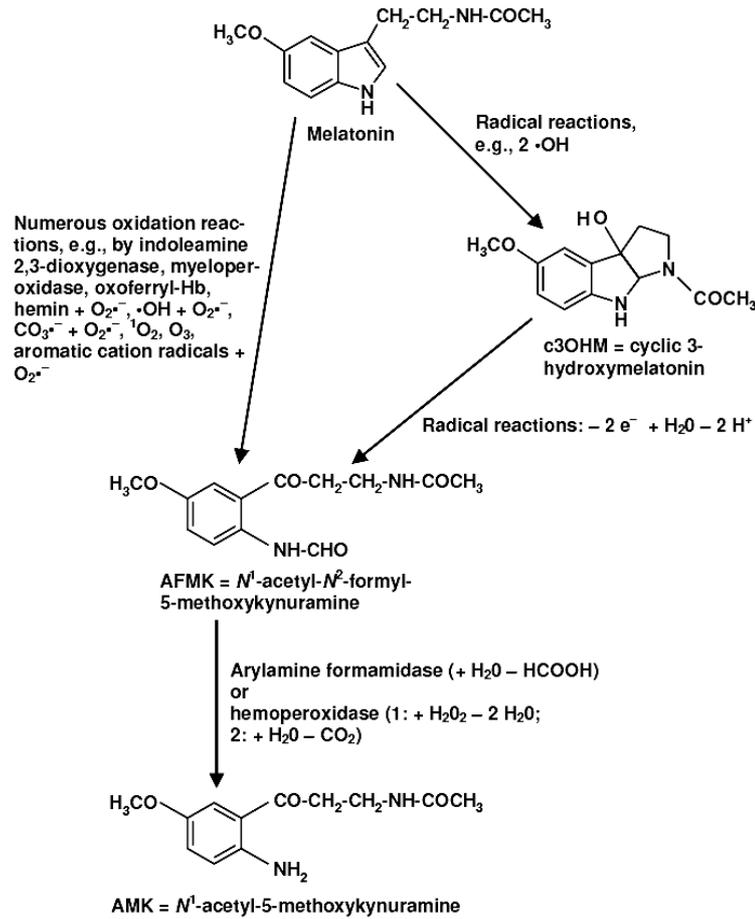


Figura 16. Vía kinurenínica del metabolismo de la aMT.

Mecanismo de protección mitocondrial de la melatonina.

La aMT es una molécula altamente lipofílica, lo que le permite atravesar las membranas celulares con cierta facilidad, así como penetrar fácilmente la barrera hematoencefálica llegando hasta las células gliales y neuronas (Borlongan y cols., 2000; Baydas y cols., 2003), enriqueciendo los compartimentos subcelulares, incluyendo la mitocondria, donde puede acumularse a altas concentraciones (Acuña-Castroviejo y cols., 2002; Acuña-Castroviejo y cols., 2003; León y cols., 2004). La aMT es una indolamina que presenta propiedades antioxidantes y antiinflamatorias (Cuzzocrea y cols., 2002; Reiter y cols., 2000a; Reiter y cols., 2000b). Las propiedades antioxidantes implican una depuración directa tanto de ROS como de RNS (Reiter y cols., 2000a; Acuña-Castroviejo y cols., 2001) como indirecta a través de la inducción de enzimas antioxidantes como la GPx y reductasa GRd (Reiter, 1995a; Tan y cols., 2000; Poeggeler y cols., 2002). Las acciones antiinflamatorias de la aMT están relacionadas con su capacidad para reducir la expresión y actividad de la iNOS y de la COX-2

en diferentes modelos de inflamación (Crespo y colbs., 1999; Acuña y colbs., 2001; Mayo y colbs., 2005). Recientemente se ha demostrado que la aMT también puede inhibir la expresión y actividad de la i-mtNOS, recuperando así la función mitocondrial (Escames y colbs., 2006; López y colbs., 2006). Además, la aMT puede inhibir la excitotoxicidad dependiente de la nNOS a través de la inhibición de la actividad de la nNOS y la activación del receptor NMDA (Escames y colbs., 2004).

En otros trabajos se ha demostrado que la aMT previene la autooxidación de la DA (Khaldy y colbs., 2003) y presenta propiedades neuroprotectoras en diferentes modelos de neurodegeneración, incluido el modelo de Parkinson inducido por MPTP (Acuña-Castroviejo y colbs., 1995, 1997; Reiter, 1998; Khaldy y colbs., 2003; Thomas y colbs., 2004; Mayo y colbs., 2005).

2.2.1. Antioxidante de acción directa.

La aMT y algunos de sus metabolitos poseen la capacidad de depurar por sí mismos algunas especies reactivas de especial interés en la mitocondria (Acuña-Castroviejo y colbs., 2001; Reiter y colbs., 2003; León y colbs., 2004). La primera evidencia que mostró esta capacidad de la indolamina fue la neutralización del OH^\bullet (Stasica y colbs., 1998), eliminándose dos moléculas de OH^\bullet por cada molécula de aMT y produciéndose 3-hidroxi-melatonina cíclica por esta interacción, la cual es detectada en la orina como producto de excreción (Tan y colbs., 2002; Tan y colbs., 1998).

El H_2O_2 , también es susceptible de ser depurado por la aMT, formándose AFMK (Tan y colbs., 2000); estos experimentos también han sido comprobados *in vivo* (Reiter y colbs., 2003). Tanto la 3-hidroxi-melatonina cíclica como el AFMK, productos de la reacción de la aMT con OH^\bullet y H_2O_2 respectivamente, parecen tener funciones depuradoras de agentes tóxicos (Acuña-Castroviejo y colbs., 2001; Reiter y colbs., 2003; León y colbs., 2004). Diversos autores han indicado la posible capacidad de la indolamina para depurar $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Marshall y colbs., 1996; Zang y colbs., 1998), aunque este hecho aún está por confirmar, especialmente *in vivo*, ya que la reacción por la cual la aMT ejercería esta acción no se conoce.

La aMT también puede depurar radicales peroxilo, interfiriendo así en la propagación de la LPO, aunque este hecho podría deberse más a la acción depuradora de otras especies reactivas que pueden provocar LPO que a la depuración en sí de radicales peroxilo. No obstante, la aMT es altamente eficaz para reducir los niveles de LPO, tanto basales como estimulados por estrés oxidativo (Reiter y colbs., 2003).

Además de las ROS, la aMT actúa como depuradora de RNS, reaccionando con el NO^\bullet para formar N-nitrosomelatonina, así como con los ONOO^- , formando un producto aún no del todo clarificado puesto que diferentes grupos han hallado diferentes productos en la reacción

de la aMT con el ONOO^- (Acuña-Castroviejo y colbs., 2001; Reiter y colbs., 2003; León y colbs., 2004) (figura 17).

2.2.2. Antioxidante de acción indirecta.

Junto a la capacidad intrínseca para depurar radicales libres, la aMT posee la capacidad de estimular la actividad y expresión (Kotler y colbs., 1998; Antolín y colbs. 2002; Mayo y colbs., 2002) de otros sistemas antioxidantes, estableciendo así una forma de acción indirecta para la reducción del estrés oxidativo. En primer lugar, la aMT estimula el ciclo del glutathion, aumentando la actividad de la GPx y de la GRd, regulando así el balance glutathion oxidado (GSSG)/GSH (Pablos y colbs., 1998; Martín y colbs., 2000a). Además, la aMT aumenta la producción de GSH por la estimulación de la γ -glutamilcisteina sintasa, enzima limitante en la ruta de síntesis de glutathion (Urata y colbs., 1999); y también estimula la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), la cual genera el NADPH requerido por la GRd (Pierrefiche y colbs., 1995). En el mismo sentido, se ha descrito que la aMT estimula otros enzimas antioxidantes como la SOD y la catalasa (Acuña-Castroviejo y colbs., 2001; Reiter y colbs., 2003; León y colbs., 2004). También ejerce una acción sinérgica con otros antioxidantes como la vitamina E y C (Reiter y colbs., 2003).

En resumen, sea por acción directa y/o indirecta, la aMT es un potente antioxidante con importantes propiedades para actuar en la mitocondria y, en consecuencia, proteger el ADNmt, las membranas lipídicas y las proteínas mitocondriales del daño oxidativo (figura 17).

2.2.3. Acción sobre la NOS mitocondrial.

Aunque aún no esté clara la naturaleza de la mtNOS, durante procesos inflamatorios (como el Parkinson) tiene lugar una inducción de la isoforma inducible. La aMT parece inhibir la activación del NF- κ B y puede también actuar a nivel de las MAPKs (Cuzzocrea y colbs., 2002), reduciendo de esta manera la inducción de la expresión de la iNOS. La aMT además reduce la expresión de la iNOS a nivel transcripcional (Crespo y colbs., 1999). En este sentido, la administración de aMT reduce la expresión de la iNOS en un modelo experimental de Parkinson inducido por MPTP. Según Escames y colbs. (2003) existe un componente inducible de la mtNOS, la i-mtNOS, sobreexpresada en hígado y pulmón durante la sepsis. El tratamiento con aMT inhibe tanto la expresión como la actividad de esta i-mtNOS al igual que ocurre con la iNOS citosólica. En cualquier caso, los mecanismos por los que la indolamina inhibe la actividad de la iNOS no son del todo conocidos. Además, Escames y colbs. (2003) hallan en la mitocondria una isoforma derivada de la nNOS cuya actividad no aumenta en la sepsis, aunque la aMT también inhibe parcialmente la actividad de ésta. En este sentido, León y colbs. (2000) demostraron que el mecanismo de inhibición de la actividad nNOS por la aMT es por su unión a la CAM, la cual es necesaria para formar el tetrámero activo del enzima.

Por tanto, la aMT inhibe la producción de NO[•] que se produce en el Parkinson, restaurando la función mitocondrial y reduciendo el estrés oxidativo.

2.2.4. Potenciación de la cadena de transporte electrónico.

La influencia de la aMT en la homeostasis mitocondrial no se limita a su poder antioxidante sino que también actúa en la CTE y en la producción de ATP. En diversos experimentos se ha demostrado que la aMT, tanto *in vivo* como en mitocondrias incubadas *in vitro*, estimula la transcripción del ADNmt, aumentando la expresión del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) correspondiente a las subunidades I, II y III del complejo IV de la CTE que están codificados por el ADNmt (Escames y colbs., 2006). La administración de aMT también impide la reducción en la actividad de los complejos I y IV debido al estrés oxidativo y daño mitocondrial inducido por rojo de rutenio administrado a ratas (Martín y colbs., 2000b). En este mismo sentido, usando partículas submitocondriales obtenidas de hígado y cerebro de ratas, se demostró que la aMT aumenta la actividad de los complejos I y IV de forma dosis-dependiente (Martín y colbs., 2002), y contrarresta la inhibición del complejo IV causado por cianuro (Martín y colbs., 2002). En un modelo de daño mitocondrial inducido por la administración de LPS a ratas y mediado por el NO[•], la aMT es capaz de recuperar la actividad de los complejos I y IV inhibidos por la inflamación en mitocondrias de hígado y pulmón (Escames y colbs., 2003).

Basado en estos resultados, es razonable pensar que el efecto de la aMT en la regulación de la actividad de los complejos de la CTE no sólo se basa en el papel antioxidante de la indolamina. En efecto, el alto potencial redox de la aMT (0.74 V) (Tan y colbs., 2000) sugiere que ésta puede interactuar con los complejos de la CTE donando y aceptando electrones y de esta manera aumentar el flujo electrónico, un efecto que no poseen otros antioxidantes (Martín y colbs., 2002). En otros modelos experimentales, se demostró asimismo que la administración de aMT aumenta la actividad de los cuatro complejos respiratorios, dando lugar a un aumento de la capacidad de la mitocondria para producir ATP. Estos efectos se han visto en multitud de órganos del animal, incluido hígado, cerebro, pulmón, corazón, diafragma y músculo esquelético (Escames y colbs., 2006; López y colbs., 2006). Es, por tanto, un efecto general de la aMT y no restringido a un determinado órgano.

Por último, el aumento de la actividad de los complejos I y IV observado tras la administración de aMT tiene una importante consecuencia en la fisiología celular, el incremento en la producción de ATP (Martín y colbs., 2002).

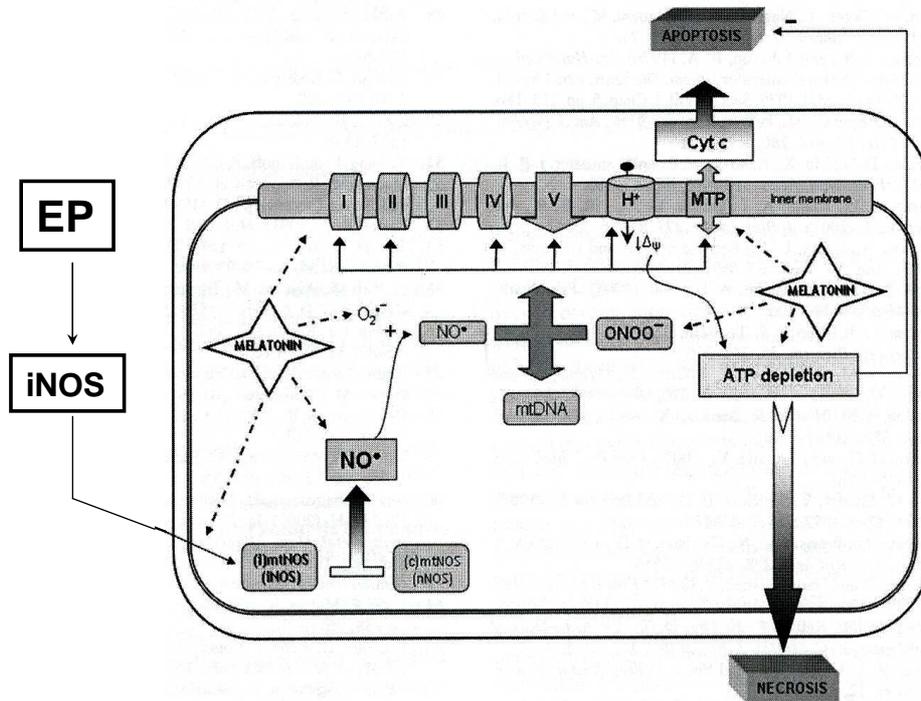


Figura 17. Diferentes efectos de la aMT en la mitocondria: (i) actúa como antioxidante, evitando el daño oxidativo, (ii) interacciona con la mtNOS y el ADNmt y (iii) dona electrones, aumentando la actividad de la CTE. Como consecuencia, tiene lugar un incremento de la síntesis de ATP.

2.3. Papel terapéutico de la melatonina en la fisiopatología del Parkinson.

La producción endógena de aMT disminuye con la edad en todas las especies (Poeggeler, 1993; Reiter, 1995a). Numerosos datos han conducido a la teoría de que el descenso de aMT con la edad, en parte debido a sus propiedades antioxidantes (directas e indirectas), puede tener una relación funcional específica con la aparición de procesos degenerativos, en particular aquellos que afectan a la función cerebral (Reiter y cols., 1994). Según la fisiopatología de la EP y las propiedades y acciones de la aMT, parece obvio que la administración farmacológica de la indolamina podría tener efectos beneficiosos sobre dicha enfermedad. Así, con el objetivo de determinar si la aMT tiene un papel beneficioso en la EP, que cursa con un elevado índice de estrés oxidativo (inhibición del complejo I, descenso de GSH, aumento de LPO, daño en el ADN), se han desarrollado multitud de modelos experimentales de la enfermedad *in vivo* e *in vitro*, en los que se ha visto que la aMT desempeña un papel protector. En el modelo de Parkinson inducido por MPTP en ratones C57/Bl6 nuestro grupo ha demostrado que la aMT previene el desarrollo de la enfermedad y la apoptosis neuronal (Acuña-Castroviejo y cols., 1997; Ortiz GG y cols., 2001; Antolín y cols., 2002); algo similar ocurre en el modelo de 6-OHDA en células PC12 (Mayo y cols., 1998; Mayo y cols., 1999).

La primera evidencia de una relación especial entre aMT y Parkinson proviene de la observación de una disminución en la actividad pineal y por tanto, de una reducción en las concentraciones de aMT en pacientes con la EP (Sandyk, 1990). Conocidas ya las propiedades depuradoras de radicales libres de la aMT, numerosos estudios han sido dirigidos en base a testar la habilidad antioxidante de la aMT en distintos modelos de Parkinson, tanto *'in vitro'* como *'in vivo'*. De esta manera, se ha observado que la indolamina es capaz de inhibir los efectos prooxidantes de la DA y la L-dihidroxifenilalanina (L-dopa) *'in vitro'* (Miller y cols., 1996), datos que fueron confirmados por nuestro grupo (Khaldy y cols., 2000) que además demostró que la aMT era más efectiva que el trolox (análogo de la vitamina E) en la prevención de la autooxidación de la DA. Además, nuestro grupo observó como la aMT prevenía el daño a lípidos (inhibiendo la LPO) inducido por MPTP en el ST y en el hipocampo de ratones (Acuña-Castroviejo y cols., 1997). Jin y cols. (1998) publicaron que una dosis de 10 mg/kg de aMT era suficiente para la protección de las neuronas dopaminérgicas, contrarrestando el incremento de los productos de la LPO en la SN de ratas tratadas con MPP⁺ y además, manteniendo la actividad TH, que normalmente disminuye después del tratamiento con la toxina. Tanto en los tratamientos agudos como en los crónicos, la indolamina es igualmente efectiva en la reducción del daño mediado por MPP⁺ (Jin y cols., 1998). Por otro lado, la aMT aumenta el número de neuronas TH positivas (enzima sintetizador de DA); sin embargo, la indolamina no recupera la actividad de dicho enzima una vez que se ha perdido. Así, la aMT previene la inhibición del complejo I y la autooxidación de la DA, *'in vitro'* (Khaldy y cols., 2000).

Este mismo grupo demostró que la administración de aMT restauraba los déficits motores generados por un tratamiento conjunto de 6-OHDA y apomorfina y además, también observaron que la indolamina prevenía los cambios conductuales asociados a este modelo de Parkinson (Kim y cols., 1998).

Cuando la aMT era suministrada conjuntamente con MPTP, se observó que la indolamina evitaba la muerte de neuronas dopaminérgicas en la SNpc y reducía enormemente la pérdida de inmunoreactividad TH en ST y SN (Antolín y cols., 2002).

En otro estudio, la aMT impedía el aumento de los productos neuronales derivados de la LPO y como recuperaba parcialmente los niveles estriatales dopaminérgicos después de una lesión inducida por 6-OHDA (Joo y cols., 1998).

La aMT protege frente a la desfragmentación del ADN inducida por MPTP (Ortiz y cols., 2001) y frente a la deficiencia en el complejo I tras la administración de MPTP (Khaldy y cols., 2003) y 6-OHDA (Dabbeni-Sala y cols., 2001). La mitocondria desempeña un papel clave en la función neuroprotectora de la aMT en los procesos neurodegenerativos (Acuña-Castroviejo y cols., 2002; León y cols., 2005). Otros trabajos muestran como la aMT mantiene las concentraciones de GSH en la SN de ratas tratadas con MPTP (Chen y cols., 2002; Khaldy y cols., 2003). Parece ser que el principal mecanismo por el cual la aMT protege frente al

Parkinson es su capacidad antioxidante/antiinflamatoria. Así, un reciente estudio demuestra que la aMT reduce la formación *'in vivo'* de OH[•] después de la administración de MPTP, sin afectar a la actividad MAO_B (Thomas y colbs., 2004). En el modelo de EP, producido por la administración de rotenona (Betarbet y colbs., 2000), Couloum y Birman (Coulom y colbs., 2004) observaron que la aMT presentaba mayor eficacia que la L-dopa para contrarrestar la pérdida selectiva de neuronas dopaminérgicas y daño locomotor en la mosca de la fruta.

La evidencia inicial de que la aMT protegía frente a la apoptosis fue proporcionada por Iacovitti, en un modelo de células dopaminérgicas en cultivo (Iacovitti y colbs., 1997). EN otro estudio, estos autores demostraron que las propiedades antioxidantes de la indolamina son las que confieren la mayor parte de la protección (Iacovitti y colbs., 1999).

Las neurotoxinas MPP⁺, 6-OHDA y la DA también causan apoptosis en células PC12; la aMT inhibe la apoptosis y los cambios estructurales inducidos por la 6-OHDA (Mayo y colbs., 1998). La indolamina también protegería frente a la excitotoxicidad producida por el NMDA (Cazevielle y colbs., 1997; Herrera y colbs., 2001).

La toxicidad celular inducida por 6-OHDA está mediada por la formación de radicales libres. Por esta razón, las propiedades antioxidantes de la aMT presumiblemente explicarían su habilidad para suprimir tanto la necrosis como la apoptosis. Existen trabajos que demuestran las acciones antioxidantes directas de la aMT: la indolamina elimina la producción mitocondrial de ROS durante el daño celular inducido por H₂O₂ en astrocitos de rata (Jou y colbs., 2004). Otra prueba que demuestra la acción directa de la aMT es la reducción en los residuos de nitrotirosina durante la neurotoxicidad dopaminérgica (Imam y colbs., 2001).

Además, la aMT previene la reducción de los niveles de ARNm para enzimas antioxidantes, como por ejemplo la CuZn-SOD, Mn-SOD y GPx. La indolamina también estimula la expresión génica de varios enzimas antioxidantes (Mayo y colbs., 2002), limitando el daño generado por los radicales libres. Por tanto, las acciones antioxidantes de la aMT (depurador directo, estimulación de enzimas antioxidantes y fomento en la síntesis de GSH) desempeñan un papel clave en la neuroprotección (Martín y colbs., 2002). Incluso, la indolamina conserva la integridad proteica mediante la depuración de radicales libres y la prevención del daño oxidativo directo a los enzimas antioxidantes (Mayo y colbs., 2003).

Por otro lado, la aMT puede proteger fisiológicamente a través de la activación de la expresión génica del factor neurotrófico derivado de la célula glial (GDNF) (Armstrong y colbs., 2002). Consecuentemente, se ha pensado que estas acciones antioxidantes tanto directas como indirectas, podrían ser importantes mediadores de las acciones antiparkinsonianas de la aMT; además, parece ser que también están implicadas las acciones genómicas de la aMT. La indolamina también desarrolla un papel en la inflamación que aparece en la SN durante la EP. En efecto, se ha observado que la aMT previene la activación de la iNOS (Escames y colbs., 2006) y de la COX-2 (Deng y colbs., 2006), así como previene la activación microglial por parte de la indolamina (Chung y colbs., 2003).

Existen numerosos datos que sugieren o indican que la aMT interviene en la homeostasis mitocondrial manteniendo, entre otros, los niveles de GSH y la actividad de la cadena respiratoria (Martín y colbs., 2000a, b; Acuña-Castroviejo y colbs., 2001; Acuña-Castroviejo y colbs., 2002; León y colbs., 2005). Como se ha descrito, la mitocondria es la mayor fuente de producción de ROS en la célula. Dado el papel crítico que desempeña la mitocondria en la muerte celular programada y en la EP, es lógico pensar que la acción de la aMT a nivel mitocondrial podría explicar sus efectos antiapoptóticos (Dabbeni-Sala y colbs., 2001; Acuña-Castroviejo y colbs., 2002; León y colbs., 2005). También se conoce la capacidad de la aMT para aumentar la síntesis de ATP mediante la inducción de los complejos mitocondriales (Martín y colbs., 2002); ello podría conferir protección en el caso de cambios oxidativos en las células dopaminérgicas. Adicionalmente, la aMT previene el exceso de Ca^{2+} inducido por las ROS y la despolarización de la membrana mitocondrial (Jou y colbs., 2004). La indolamina también protege el ADNmt, el cual es particularmente vulnerable al daño oxidativo, por lo que mantiene indirectamente el metabolismo mitocondrial.

El compendio de todos estos resultados, demuestran que la mitocondria es una de las principales dianas de la aMT, en cuanto a sus acciones neuroprotectoras (figura 18).

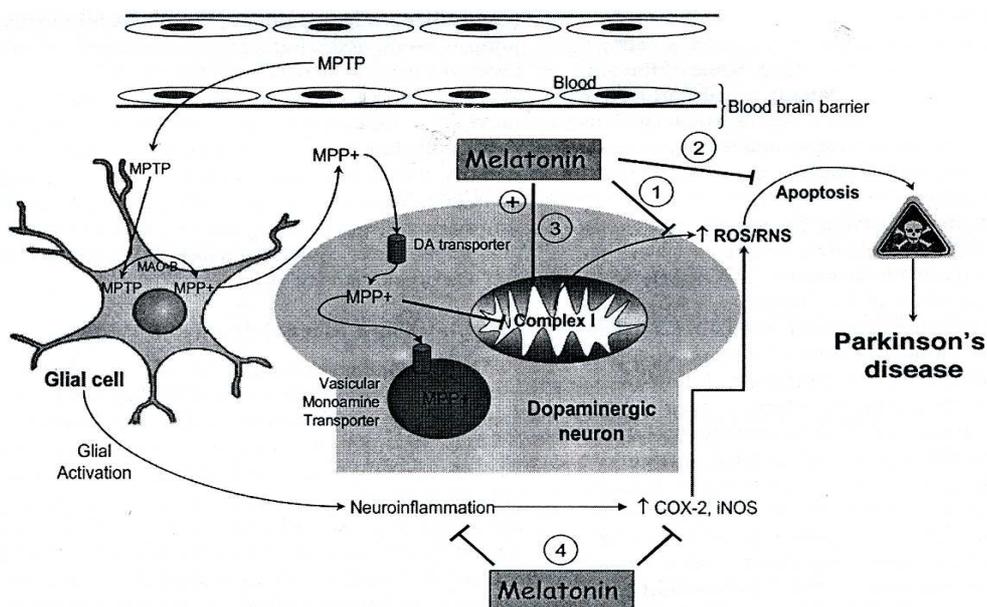


Figura 18. Resumen de las diferentes vías por las cuales la aMT ejerce sus efectos neuroprotectores en la EP, usando MPTP como neurotoxina.

Finalmente, la aMT presenta un efecto sinérgico con el deprenil para recuperar los niveles de DA perdidos tras la exposición al MPTP, así como la actividad locomotora de los ratones tratados (Khaldy y colbs., 2003). Estos resultados sugieren que la terapia combinada entre el efecto antioxidante de la aMT y el efecto del deprenil para inhibir la actividad de la

MAO_B, es una buena estrategia para el tratamiento de la enfermedad. Hay que tener en cuenta también que el deprenil ejerce un efecto antioxidante importante, que puede participar en cierta medida en sus efectos neuroprotectores.

Existen datos experimentales y clínicos sobre el efecto de la aMT en la EP. Dosis de 1-3 g/día de aMT durante 1 mes provocaban la desaparición del temblor en estos pacientes (Anton-Tay y cols., 1974). Hay que tener en cuenta que aunque esas dosis de aMT son muy altas, su vida media en el organismo es de unos 40 min, por lo que no se acumula, y no da lugar a mecanismos de adicción ni tolerancia (Gibbs y cols., 1981).

Objetivos

En los estados iniciales del proceso neurodegenerativo inducido por el MPTP, y precediendo a éste, hay un aumento de NO^{\bullet} derivado de la iNOS microglial. Los ratones iNOS deficientes muestran un menor daño neuronal en la SN tras la administración de MPTP, aunque las fibras dopaminérgicas estriatales degeneran igual que en los ratones normales. Por tanto, gran parte del daño celular se debe al NO^{\bullet} (y ONOO^{-}) derivado de la iNOS en la SN y posiblemente al derivado de nNOS en ST. El aumento de NO^{\bullet} potencia el efecto del MPP^{+} sobre la actividad del complejo I, y sólo cuando la actividad de dicho complejo disminuye de un cierto valor (por encima de un 40% en la SN y de un 20% en el ST), se produce el déficit de ATP; el fracaso bioenergético mitocondrial derivará en la degeneración y muerte neuronal.

Por otro lado, la aMT inhibe la expresión de la iNOS e i-mtNOS así como la actividad de la cNOS y c-mtNOS, disminuyendo la producción de NO^{\bullet} . Además, la aMT es un importante depurador de radicales libres tanto de forma directa como indirecta, con una acción destacada a nivel mitocondrial, y aumenta la actividad de la cadena respiratoria y la producción de ATP.

En consecuencia, nuestra hipótesis de trabajo es que el aumento de iNOS en la SN tras la administración de MPTP condiciona un incremento de la i-mtNOS, que dará lugar a un aumento del NO^{\bullet} intramitocondrial, el cual potencia la inhibición del complejo I producida por el MPP^{+} . Previsiblemente, si en mitocondrias de ST hay un incremento de la mtNOS, éste se haría a expensas de la nNOS, ya que en ST no hay reacción inflamatoria significativa, y por tanto no aumenta la iNOS.

El desarrollo de nuevos fármacos neuroprotectores está frenado por nuestro limitado conocimiento de los mecanismos reales por los cuales mueren las neuronas dopaminérgicas. Si el tratamiento con aMT, y de forma similar su metabolito, va a reducir de forma considerable la actividad de la NOS (tanto citosólica como mitocondrial), principalmente de su componente inducible, disminuyendo el daño oxidativo mitocondrial, el uso de compuestos sintéticos

análogos a la aMT y su metabolito puede proporcionarnos nuevas herramientas farmacológicas con selectividad mayor para inhibir la iNOS/i-mtNOS, y susceptibles de ser usadas en la clínica.

Para comprobar esta hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos:

- 1.- Estudiar *'in vitro'* la potencia y selectividad de una serie de compuestos sintéticos sobre la actividad de las isoenzimas nNOS (Ca^{2+} -dependiente) e iNOS (en ausencia de Ca^{2+}) en homogenados de cerebro de rata.
- 2.- Estudiar el efecto *'in vivo'* de los compuestos sintéticos más eficaces del estudio *'in vitro'*.
- 3.- Estudiar la actividad de la NOS citosólica (nNOS e iNOS) en el ST y la SN de ratones C57/Bl6 con Parkinson inducido por MPTP. Estudiar, asimismo, la CTE (actividad del complejo I), la producción de NO^{\bullet} (nitritos) y el estrés oxidativo (LPO).
- 4.- Evaluar el daño mitocondrial (en ST y SN) inducido por el NO^{\bullet} y el ONOO^{-} generados por la mtNOS, así como la actividad de la mtNOS en ratones tratados con MPTP.

Material y métodos

1. ANIMALES, PROCEDIMIENTO QUIRÚGICO Y TRATAMIENTO.

1.1. Animales y grupos experimentales.

Para el estudio *'in vitro'* se ha utilizado una cepa de ratas Wistar macho y para el correspondiente estudio *'in vivo'* se han empleado ratones normales C57/Bl6. Ambas cepas están estabuladas en el animalario de la Universidad de Granada, en condiciones estériles, bajo un ambiente de fotoperíodo (ciclo de luz-oscuridad de 12:12 horas) y temperatura (22 ± 1 °C) controlados, y con acceso libre al agua y a la comida (dieta estándar de laboratorio). Las ratas utilizadas tienen una edad aproximada de tres meses y un peso entre 200-250 g, mientras que los ratones tienen una edad comprendida entre las 8-12 semanas y un peso entre 22-28 g. Todos los experimentos se han realizado acorde a las guías española y europea de cuidado de los animales.

Las ratas se han utilizado para los estudios *'in vitro'* de la actividad anti NOS constitutiva e inducible de los compuestos estudiados.

En el caso de los ratones, se establecieron 3 grupos experimentales con 96 ratones cada uno:

- Grupo control (vehículo).
- Grupo de MPTP.
- Grupo de MPTP tratado con aMT o compuesto a evaluar.

1.2. Tratamiento y procedimiento quirúrgico.

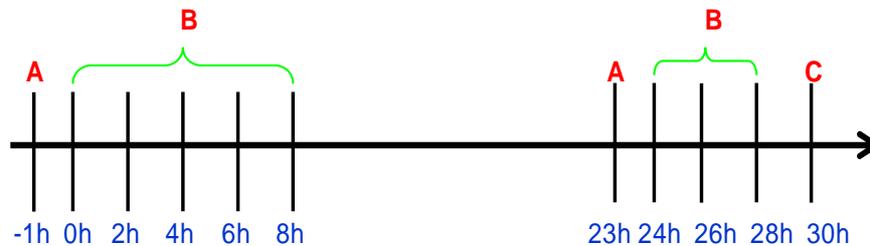
Modelo *'in vitro'*:

Para la medida de la actividad NOS, tanto constitutiva como inducible, las ratas se tratan previamente con LPS para inducir la iNOS. Para ello, el animal se canula por la yugular y se infunde con una dosis de 20 mg/kg de LPS (*Escherichia coli* 0111:B4). Se sacrifica por dislocación cervical a las 6 horas e inmediatamente se extraen los dos ST, se pesan, se homogenizan y se procesan obteniendo el citosol que se congela a -80° C hasta la determinación de la actividad NOS.

Modelo *'in vivo'*:

La aMT o el compuesto a analizar se administran en una dosis de 10 mg/kg una hora antes del tratamiento con la neurotoxina, vía subcutánea. Entonces, el MPTP se administra también subcutáneamente cada dos horas, con un total de cuatro dosis de 15 mg/kg cada una. Al siguiente día y a la misma hora que el día anterior, se administra otra dosis de 10 mg/kg de aMT o del compuesto a analizar y a la hora siguiente, procedemos a la administración

de la primera dosis de MPTP, que en esta ocasión en lugar de cuatro dosis administramos tres (dosis de recuerdo). Los animales son sacrificados por dislocación cervical dos horas después de la última dosis de recuerdo, es decir, a las 31 h de comenzar el tratamiento (figura19). Rápidamente y en frío, se extrae el cerebro, de donde se obtienen el ST y la SN, congelados a -80°C para su posterior análisis.



A: aMT o compuesto a analizar (10 mg/kg o vehículo), sc.

B: MPTP, sc.

C: sacrificio, dc.

Figura 19. Representación esquemática del tratamiento seguido para ratones C57/Bl6.

2. OBTENCIÓN DE LA FRACCIÓN MITOCONDRIAL.

2.1. Aislamiento de la fracción mitocondrial por centrifugación diferencial y gradiente de densidad con Percoll.

Con el mismo método podemos obtener mitocondrias crudas para medir la actividad del complejo I y, tras un gradiente de densidad, mitocondrias puras libres de contaminación citosólica, utilizadas para realizar el resto de técnicas.

Protocolo:

Los animales se sacrifican por dislocación cervical y el cerebro se extrae inmediatamente y las fracciones citosólicas y mitocondriales de la SN y ST se aíslan según el método de Rice (Rice y cols., 1997) pero con **algunas modificaciones**. Rápidamente se disecan el ST y la SN, se pesan y se lavan en solución salina fría y se homogenizan en tampón 0.32M sacarosa, 1 mM EDTA (K^+), 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10% w/v con un homogenizador de teflón (Stuart Scientific, mod. SS2) a 700 rpm. Todas estas manipulaciones se realizan en hielo para mantener una temperatura estable de 4°C . Los homogenizados se centrifugan (centrífuga

Eppendorf 5810R, rotor de ángulo fijo F45-30-11) dos veces a 1.330 g durante 3 minutos a 4° C; los sobrenadantes obtenidos se mezclan y se centrifugan a 21.200 g (centrífuga Beckman Avanti™ 30, rotor de ángulo fijo F3602) durante 10 minutos a 4 °C.

El sobrenadante, que corresponde al citosol crudo, es inmediatamente alicuotado y conservado a -80° C. Por otro lado, el precipitado (correspondiente a las mitocondrias crudas) se resuspende en 15% v/v de Percoll, preparado en el tampón de homogenización, con lo que la concentración del homogenado de cerebro original es de 10 g/ml. El gradiente de densidad de Percoll se realiza depositando (con una jeringa) 1 ml de Percoll 23% (v/v) sobre 1 ml de Percoll 40% (v/v). Finalmente, depositamos 0.850 ml de precipitado mitocondrial en Percoll 15% (v/v) sobre el gradiente preparado anteriormente y se centrifuga (ultracentrífuga Beckman Optima™ TL-100, rotor de ángulo fijo TLA 100.4) a 28.200 g durante 12 minutos a 4 °C. Se obtienen tres bandas, de las cuales nos quedamos con la banda cercana a la interfase entre las dos bandas inferiores de Percoll y la diluimos cuidadosamente 1:1 en tampón de homogenización. A continuación, se centrifuga a 16.800 g durante 10 minutos a 4 °C (ultracentrífuga Beckman Optima™ TL-100, rotor de ángulo fijo TLA 100.4).

Se decanta el sobrenadante y se añaden 100 µl de albúmina bovina libre de ácidos grasos (10 mg/ml) y se completa hasta 1 ml con tampón de homogenización (0.7 ml) para eliminar el Percoll. Finalmente, se centrifuga (centrífuga Beckman Avanti™ 30, rotor de ángulo fijo F3602) a 7.200 g durante 10 minutos a 4° C para sedimentar las mitocondrias, que se congelan a -80° C para su posterior utilización.

3. MÉTODOS ANALÍTICOS.

3.1. Determinación de la concentración de proteínas: método de Lowry.

Todos los resultados obtenidos en este trabajo son referidos a concentración de proteínas de la muestras analizadas (tanto citosólicas como mitocondriales). Para calcular esta concentración de proteínas se utiliza el método de Lowry (Lowry y colbs., 1951) con las modificaciones del método de Biuret (Layne y colbs., 1957). Se trata de una técnica colorimétrica con dos reacciones complementarias:

- a) *Reacción de Biuret*: es específica de los grupos amino de los enlaces peptídicos e implica la formación de un complejo coordinado coloreado de estos grupos con el cobre en medio alcalino. La misión del pH alcalino es facilitar el desplegamiento de las proteínas globulares en medio acuoso, por tanto, actúa como un agente desnaturalizante para que los iones de cobre puedan llegar hasta los grupos amino de los enlaces peptídicos.

b) *Reducción del reactivo de fenol*: es específica de grupos reductores como el fenol. La reducción del reactivo de fenol se produce por el efecto de ciertos radicales aromáticos de los aminoácidos y de los complejos de Biuret. Este reactivo actúa como un indicador redox que al reducirse adquiere un color azul (figura 20). La intensidad de color dependerá de la cantidad de proteínas presentes en la muestra, y puede cuantificarse midiendo la absorbancia a 650 nm.

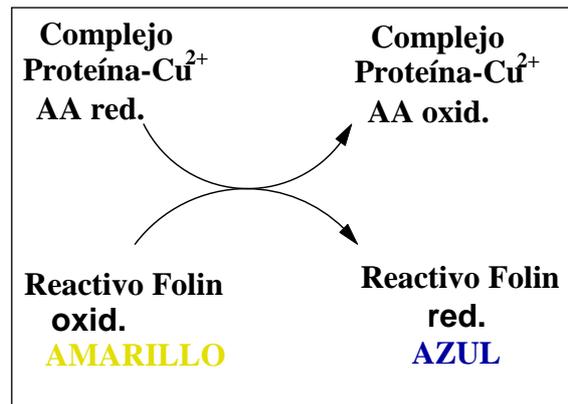


Figura 20. Reacción del reactivo de Folin.

Protocolo:

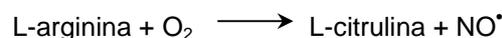
Para medir la concentración de proteínas de cualquier muestra, se ha adaptado el método de Lowry a un micrométodo realizado en microplacas de 96 pocillos.

Para hacer la curva patrón se utiliza albúmina sérica bovina como estándar (disuelta en Tris 20 mM) a concentraciones entre 0,1-0,7 mg/ml.

En primer lugar, se ponen en los pocillos 50 μ l de blanco, patrones o muestras. A continuación se añaden 200 μ l de reactivo de Lowry (carbonato disódico al 2% en NaOH 0,1 M, tartrato de sodio-potasio al 1% y sulfato cúprico al 0,5 % (la proporción de estas soluciones es 98:1:1), se agita (agitador de placas: 1296-001 Delphia Plateshake) y se deja reposar durante 10 minutos. Finalmente, la reacción se revela con 50 μ l de reactivo de fenol diluido 1:10 con agua destilada. Se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente y se mide la absorbancia a 650 nm en un espectrofotómetro de placa (Bio-Tek Power-Wave_x Microplate Scanning Spectrophotometer). Todas las determinaciones se realizan por duplicado.

3.2. Determinación de la actividad de la óxido nítrico sintasa (citósólica y mitocondrial).

Las diferentes isoformas de la NOS catalizan en presencia de sus cofactores la siguiente reacción:



Las llamadas isoformas constitutivas (nNOS y eNOS) son Ca^{2+} -CAM dependientes, mientras que la llamada isoforma inducible (iNOS) es Ca^{2+} -CAM independiente. Esta propiedad es utilizada para diferenciar entre NOS constitutiva e inducible, utilizando un quelante de Ca^{2+} como el EDTA.

La actividad del enzima se expresa en cantidad de producto formado (NO^{\bullet} o citrulina ya que su relación de síntesis es 1:1) a lo largo del tiempo de la reacción, todo ello dividido por la cantidad de proteínas totales. Por tanto, la cuantificación de la actividad NOS puede llevarse a cabo por la monitorización de la conversión de L-(^3H)-arginina en L-(^3H)-citrulina durante un tiempo determinado (Bredt y colbs., 1989).

Protocolo:

Distinguimos entre la fracción citosólica y la fracción mitocondrial. En el primer caso, una vez obtenida la región cerebral se resuspende directamente (0,1g/ml) en un tampón compuesto por Tris-HCl 25 mM, DTT 0,5 mM, leupeptina 10 $\mu\text{g/ml}$, pepstatina 10 $\mu\text{g/ml}$ (tomada de un disolución inicial de 1mg/ml en DMSO), aprotinina 10 $\mu\text{g/ml}$ y PMSF 1 mM (tomado de una disolución inicial 500 mM en etanol), pH 7,6 a 4° C, y se centrifuga a 1.000 g durante 5 min a 4 °C (centrífuga Beckman Avanti™ 30, rotor de ángulo fijo F3602) y se recogen alícuotas del sobrenadante que se usan inmediatamente para medir la actividad de la NOS o se congelan para la posterior determinación de la concentración de proteínas (Lowry y colbs., 1951).

En el caso de la fracción mitocondrial, las mitocondrias obtenidas se descongelan, se resuspenden (0,1g/ml) en un tampón Tris-HCl 25 mM, DTT 0,5 mM, leupeptina 10 $\mu\text{g/ml}$, pepstatina 10 $\mu\text{g/ml}$ (tomada de un disolución inicial de 1mg/ml en DMSO), aprotinina 10 $\mu\text{g/ml}$ y PMSF 1 mM (tomado de una disolución inicial 500 mM en etanol), pH 7,6, a 4° C y se sonicán a 3 ciclos, 20%, 10 segundos (Sonuplus HD-2070) para, de este manera, romperlas. Parte de la muestra se congela para la posterior determinación de la concentración de proteínas (Lowry y colbs., 1951).

En tubos Eppendorf se añaden 10 μl de estas alícuotas y se les añade (volumen final de reacción 100 μl):

- 50 μl de un tampón compuesto por Tris-HCl 25 mM, DTT 1 mM, tetrahidrobiopterina (BH_4) 30 μM , FAD 10 μM , inosina 0,5 mM, BSA 0,5 mg/ml, cloruro de Ca^{2+} 0,1 mM, L-arginina 10 μM y L-(^3H)-arginina 40 nM, pH 7,6 (como concentraciones finales en 100 μl).
- 10 μl de EDTA 10 mM (como concentración final en 100 μl) para medir la isoforma inducible (iNOS).
- Agua, hasta completar el volumen final.

Los tubos se calientan a 37° C durante 30 minutos a partir de la incorporación de 10 µl de una disolución de NADPH cuya concentración final es 0,75 mM. Durante este tiempo la NOS va a transformar la L-arginina, tanto normal como tritiada, en L-citrulina. Una vez transcurridos los 30 minutos se adiciona a cada tubo 400 µl de un tampón frío compuesto por HEPES 0,1 M, EGTA 100 mM y L-citrulina 0,175 mg/ml, pH 5,5, lo que provoca la parada de la reacción. De los 500 µl resultantes de todo el proceso, 400 µl se pasan a través de una columna con resina de intercambio iónico Dowex-50w en forma sódica, encargada de retener la L-(³H)-arginina que no se transforma en L-citrulina y, posteriormente, se eluyen con 1,2 ml de agua. La eficacia de retención de la L-(³H)-arginina por la columna es superior al 98 %.

Para cuantificar la cantidad de L-(³H)-citrulina formada se mide la radiación emitida en un contador β de centelleo líquido, mezclando 600 µl de eluido final con 4 ml de líquido de centelleo. El valor de actividad total es proporcionado por la medida de 50 µl de tampón de incubación. La actividad enzimática se expresa en picomoles de L-citrulina formada por minuto de reacción y dividida por los miligramos de proteínas presentes en la muestra (pmol cit/min x mg prot).

3.3 Determinación de la actividad específica de la NADH ubiquinona (CoQ) oxidoreductasa (Complejo I de la CTE).

El método utilizado para determinar la actividad del complejo I de la CTE es una técnica espectrofotométrica que posee tres grandes ventajas:

- Al trabajar con partículas submitocondriales que conservan un perfecto estado catalítico de la maquinaria enzimática de la CTE, se pueden utilizar aceptores y donantes de electrones endógenos y artificiales.
- Se trata de técnicas colorimétricas, que presentan todas las ventajas de selectividad, reproducibilidad y sensibilidad que derivan de las leyes de Lambert Beer.
- La característica cromófora de los aceptores y donantes de electrones empleados permite que la medida de actividad específica en cada caso sea directa, siguiendo los cambios de absorbancia experimentados.

Las fracciones mitocondriales (previamente descongeladas), se resuspenden en 180 µl de medio de incubación (sacarosa 250 mM, fosfato potásico 50 mM, PH 7,4) y se sonicán a 3 ciclos, 20%, 10 segundos (Sonuplus HD-2070) para obtener las partículas submitocondriales. Alícuotas de cada muestra se usan tanto para la medida de los complejos como para determinar la concentración de proteínas (Lowry y cols., 1951).

Protocolo:

Para determinar la actividad del complejo I, se incuban alícuotas de la fracción submitocondrial (0,6 mg/ml) durante 3 minutos a temperatura ambiente en un medio que contiene sacarosa 250 mM, fosfato potásico 50 mM, PH 7,4, KCN 1 mM, decilubiquinona 50 μ M y antimicina 0,8 μ M, pH 7,4. La reacción se inicia por la adición de NADH 100 μ M (volumen final de reacción 500 μ l) y la actividad del complejo I (expresada en nmol de NADH oxidado/min mg prot) se mide siguiendo la oxidación del NADH a 340 nm en un espectrofotómetro de cubeta modelo UV1603 Shimadzu spectrophotometer (IZASA, Sevilla, España) (Estornell y cols., 1993).

3.4. Determinación de los niveles de nitritos.

Dado que el NO[•] es una molécula muy inestable, la medida directa de su contenido es difícil, por lo que se suele utilizar un método indirecto de mayor estabilidad como es la determinación de nitritos. El NO[•] reacciona rápidamente con el agua para producir nitritos, siendo su concentración directamente proporcional a la cantidad de NO[•].

La concentración de nitritos presentes en la muestra puede determinarse mediante una técnica colorimétrica basada en la reacción de Griess (Green y cols., 1981); el reactivo de Griess se combina con los nitritos para formar un compuesto nitrogenado coloreado. La intensidad de color púrpura producido es proporcional a la cantidad de cromógeno formado y, en consecuencia, a la cantidad de nitritos existentes según la ley de Lambert-Beer.

Protocolo:

Cada fracción mitocondrial se descongela, se resuspende en 270 μ l de agua destilada y se sonica a 3 ciclos, 20%, 10 segundos (Sonuplus HD-2070) para romper las membranas mitocondriales. Las alícuotas de cada muestra son guardadas a -80 °C para medir la concentración de proteínas (Lowry y cols., 1951) o utilizadas inmediatamente para calcular la concentración de nitritos. La cantidad de nitritos presentes en la muestra se mide siguiendo la reacción de Griess (Green y cols., 1981). Se incuban en una microplaca 100 μ l de reactivo de Griess con 100 μ l de muestra a temperatura ambiente; el reactivo de Griess está compuesto por sulfanilamida al 1 % en ácido fosfórico al 5 % y NEDA al 0.1 % en proporción 1:1. Tras 20 minutos de incubación se mide la absorbancia a 550 nm en un espectrofotómetro de placa (Bio-Tek Power-Wave_x Microplate Scanning Spectrophotometer). La concentración de nitritos se calcula comparando las absorbancias de la muestra con las de una curva estándar con concentraciones conocidas de nitrito sódico (2-20 nmol/ml) disuelto en agua. Los datos se expresan en nmol nitritos/mg prot.

3.5 Determinación de la peroxidación lipídica.

La medición de LPO se hace utilizando un kit comercial (Bioxytech LPO-586; Cayman Chemical) que está basado en la reacción de un reactivo cromógeno, el N-metil-2-fenilindol (NMFI), con el malonildialdehído (MDA) ó 4-hidroxinonanal (4-HNE), a una temperatura de 45° C. Los niveles de MDA y 4-HNE así medidos reflejan directamente los niveles de LPO (Esterbauer y Cheeseman, 1990). La condensación de una molécula de MDA ó 4-HNE con dos moléculas de NMFI produce un cromóforo estable que, en presencia del ácido metanosulfónico tiene una absorbancia máxima a 586 nm.

Protocolo:

Cada fracción mitocondrial se descongela, se resuspende en 270 µl agua y se sonica a 3 ciclos, 20%, 10 segundos (Sonuplus HD-2070) para romper las membranas mitocondriales. Las alícuotas de estas muestras se guardan a -80 °C para determinar la concentración de proteínas (Lowry y colbs., 1951) o se usan para calcular la LPO. En un tubo de vidrio, se colocan 200 µl de muestra y 650 µl de un reactivo compuesto por NMFI 10.3 mM en acetonitrilo, y metanol, en relación 1:3 (v/v). Tras agitar durante 3-4 segundos, se añaden 150 µl de ácido metanosulfónico y cerramos los tubos. Inmediatamente, los introducimos en un baño y se incuban durante 40 minutos a 45° C. Transcurrida la incubación se colocan los tubos en hielo, se añade 100 µl a cada pocillo de la placa y se mide la absorbancia a 586 nm en un espectrofotómetro de placa (Bio-Tek Power-Wave_x Microplate Scanning Spectrophotometer).

Para construir la recta de calibrado se utilizan diluciones de concentración conocida (2,5-20 nmol/ml), a partir de una disolución stock procedente del kit LPO-586. Todas las determinaciones se hacen por duplicado. Los resultados son expresados en nmol MDA + 4HNE/mg prot.

Nota: Las mitocondrias obtenidas para la determinación de la LPO son lavadas dos veces al final de proceso de preparación con tampón de lavado (Tris-HCl 25 mM) para eliminar cualquier resto posible de sacarosa, ya que ésta interfiere en la medida.

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los datos se expresan como la media ± error estándar de la media (SEM) de cuatro a seis experimentos por duplicado. Para el análisis estadístico, se ha realizado un análisis de la varianza de una vía (ANOVA de una vía) seguido del test de comparación múltiple Student-Newman-Keuls. Los datos de las figuras y el texto corresponden a la media ± error estándar de la media (SEM) de n datos, donde n representa el número de animales estudiados. Un valor de P igual o inferior a 0.05 se ha considerado estadísticamente significativo.

5. REACTIVOS UTILIZADOS.

Para el modelo de EP y disolución de los compuestos.

- aMT (N-acetil-5-metotriptamina) (SIGMA).
- MPTP-HCL (1 metil-4 fenil 1-2-3-6 tetrahidropiridina) (RBI).
- Etanol absoluto (PANREAC).
- Dimetil sulfóxido (PANREAC).
- Compuestos: kinureninas, kinurenaminas, pirazolininas, pirazolidinas, pirazoles y pirroles, sintetizados en la Facultad de Farmacia, por el Departamento de Química Farmacéutica (Camacho y cols., 2002; Camacho y cols., 2004; Carrión y cols., 2004; Entrena y cols., 2005).

Aislamiento de la fracción mitocondrial.

- Solución salina isotónica (FRESENIUS KABI).
- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), albúmina sérica bovina (BSA), percoll™ (SIGMA).
- Ácido clorhídrico al 35%, sacarosa y tris-(hidroximetil)-aminometano (TRIS-base) (PANREAC).

Determinación de la concentración de proteínas.

- Albúmina sérica bovina (BSA) (SIGMA).
- Ácido clorhídrico al 35%, carbonato disódico, hidróxido sódico, hidroximetil aminometano (TRIS-base), reactivo de fenol (Folin-Ciocalteu), sulfato cúprico y tartrato de sodio y potasio (PANREAC).

Determinación de la actividad NOS.

- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido hidroxietil-1-piperazin-etanosulfónico (Hepes), aprotinina, albúmina sérica bovina (BSA), dicloruro de 5,6,7,8-tetrahidro-L-

- biopterina (BH₄), dinucleótido de flavina y adenina (FAD), DL-ditiotreitol (DTT), fluoruro de fenilmetansulfonilo (PMSF), fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina (forma reducida) (NADPH), hipoxantina-9-D-ribofuranóxido (inosina), L-arginina, L-citrulina, leupeptina, pepstatina y resina Dowex-50w, forma Na⁺ (SIGMA).
- Ácido clorhídrico al 35 %, cloruro de Ca²⁺, dimetilsulfóxido (DMSO), etanol absoluto, hidróxido sódico e hidroximetil aminometano (TRIS-base) (PANREAC).
 - L-(2,3,4,5-³H)-arginina (5.8 Ci/mmol) (AMERSHAM, BUCKS, UK).
 - Líquido de centelleo (BECKMAN).

Determinación de la actividad del complejo I de la CTE.

- Antimicina A, decilubiquinona (DB), dinucleótido de nicotidamina y adenina (forma reducida) (NADH), fosfato monopotásico (KH₂PO₄), hidróxido potásico (KOH) (SIGMA).
- Ácido sulfúrico 96 % etanol absoluto, hidroximetil aminometano (TRIS-base), sacarosa (PANREAC).
- Cianuro potásico (KCN) (FLUKA).

Determinación de nitritos.

- Naftil-etilen-diamina (NEDA), nitrito sódico (NaNO₂) y sulfanilamida (SIGMA).

Determinación de peroxidación lipídica (LPO).

- Acetonitrilo, ácido metanosulfónico y metanol (SIGMA).
- Ácido clorhídrico al 35 % e hidroximetil aminometano (TRIS-base) (PANREAC).
- Kit LPO-586 (BIOXYTECH).

Resultados

1. RESULTADOS 'IN VITRO'.

En primer lugar, para el desarrollo de este estudio se ha llevado a cabo una clasificación de todos los compuestos analizados según el porcentaje de inhibición de cada fármaco sobre la actividad nNOS e iNOS y además su grado de selectividad frente a dichas isoformas 'in vitro'. Posteriormente, se han seleccionado los compuestos con mayor capacidad de inhibición y con mayor selectividad respecto a las diferentes isoformas constitutiva e inducible, para su posterior evaluación 'in vivo'.

1.1. MELATONINA.

En la tabla 3 se representa la estructura química de la aMT, así como los porcentajes de inhibición sobre la nNOS e iNOS.

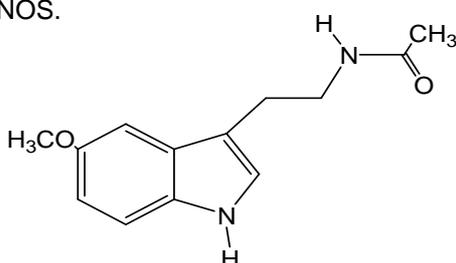


Tabla 3.

COMPUESTO	R	PM (gr mol ⁻¹)	% INHIBICIÓN nNOS	% INHIBICIÓN iNOS
QFF-1/aMT	-NH ₂	186.210	41.48 ± 1.14	7.21 ± 5.43

La figura 21 muestra los cambios en la actividad nNOS e iNOS en presencia de 1 mM de aMT. Como se puede observar, la aMT inhibe significativamente la isoforma constitutiva, pero no la inducible.

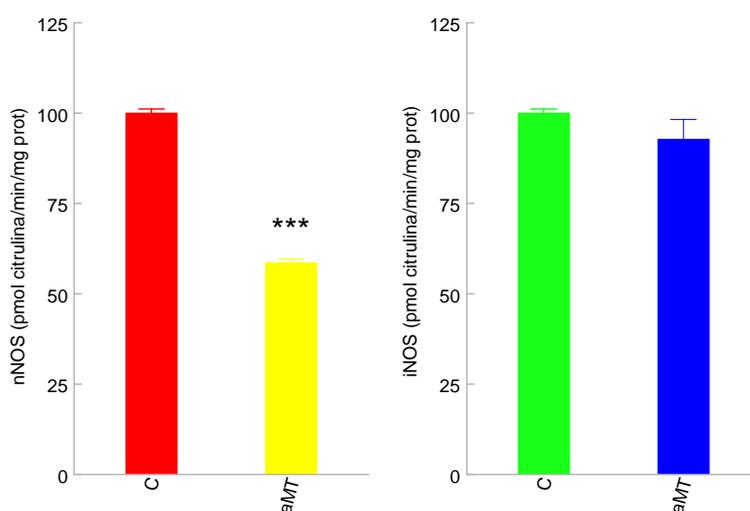


Figura 21. Efecto de la aMT (1 mM) sobre la actividad nNOS e iNOS. *** P<0.001 vs control.

1.2. FAMILIA KINURENÍNICA.

DERIVADOS DEL ÁCIDO 2-ACILAMIDO-4-FENILSUSTITUIDO-4-OXOBUTÍRICO.

En la tabla 4 se representa la estructura química y los sustituyentes R₁ y R₂ de estos derivados, así como los porcentajes de inhibición sobre la nNOS e iNOS.

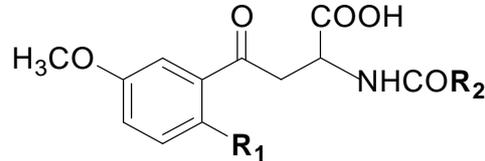


Tabla 4.

COMPUESTO	R ₁	R ₂	PM (gr mol ⁻¹)	% INHIBICIÓN nNOS	% INHIBICIÓN iNOS
QFF-100-KI/C.A	-H	-CH ₃	265.26	4.26 ± 0.53	34.39 ± 0.34
QFF-101-KI/C.B	-NH ₂	-CH ₃	280.28	68.5 ± 2.21	20.44 ± 3.86
QFF-102-KI/C.C	-H	-C ₃ H ₇	293.32	-5.32 ± 1.18	34.07 ± 1.05
QFF-103-KI/C.D	-NH ₂	-C ₃ H ₇	308.33	45.05 ± 1.85	31.64 ± 1.23

La figura 22 muestra los cambios en la actividad nNOS e iNOS en presencia de los compuestos evaluados. Solamente los compuestos QFF-101-KI y QFF-103-KI son efectivos frente al componente constitutivo, mientras que todos ellos inhiben al componente inducible.

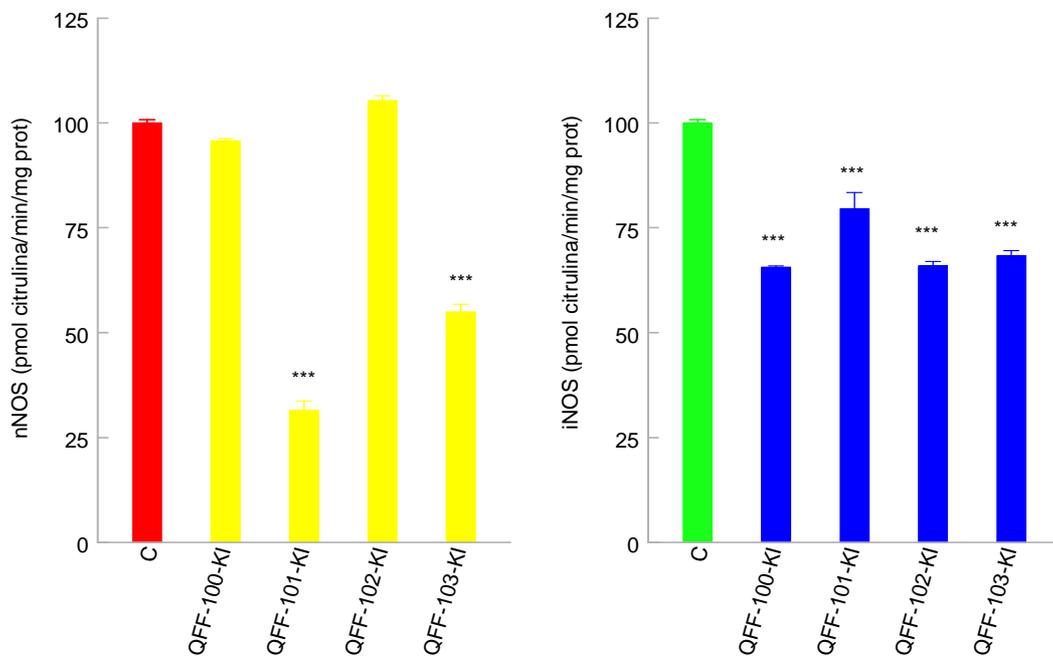


Figura 22. Efectos de los derivados del ácido 2-acilamido-4-fenilsustituido-4-oxobutírico (1 mM) sobre la actividad nNOS e iNOS. *** P<0.001 vs control.

1.3. FAMILIA KINURENAMÍNICA.

DERIVADOS DEL N-ACETIL-5-METOXIKINURENAMINA o N-[3-(2-AMINO-5-METOXIFENIL)-3-OXOPROPIL]ACILAMIDA.

En la tabla 5 se representa la estructura química y los sustituyentes R de estos derivados, así como los porcentajes de inhibición sobre la nNOS e iNOS.

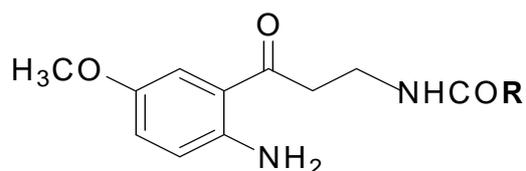


Tabla 5.

COMPUESTO	R	PM (gr mol ⁻¹)	% INHIBICIÓN nNOS	% INHIBICIÓN iNOS
QFF-104-KIN/AMK	-CH ₃	238	65.36 ± 5.6	30.9 ± 2.92
QFF-105-KIN/GV-209	-CH ₂ CH ₃	250.29	50.87 ± 1.9	0.24 ± 1.95
QFF-106-KIN/GV-211	-CH ₂ CH ₂ CH ₃	264.32	42.81 ± 1.9	7.35 ± 4.48
QFF-107-KIN/GV-213	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	278.35	39.68 ± 1.17	14.11 ± 0.89
QFF-108-KIN/GV-215		262.13	40.44 ± 1.84	2.66 ± 1.4
QFF-109-KIN/GV-217		276.15	33.75 ± 1.39	-6.01 ± 1.52
QFF-110-KIN/GV-219		290.16	45.04 ± 1.97	-0.61 ± 2.49
QFF-111-KIN/GV-221		304.18	48.24 ± 2.42	9.24 ± 2.1
QFF-112-KIN/GV-223		298.13	46.47 ± 2.36	10.86 ± 3.73

La figura 23a muestra los cambios en la actividad nNOS en presencia de las kinurenaminas evaluadas. Todos estos compuestos inhiben significativamente a la nNOS, siendo el más potente el QFF-104-KIN. La figura 23b muestra los cambios en la actividad iNOS en presencia de estos compuestos. La máxima inhibición de la iNOS se alcanzó con el QFF-104-KIN,

mientras que QFF-106-KIN, QFF-111-KIN y QFF-112-KIN tienen un efecto inhibitor frente a la iNOS bastante menor.

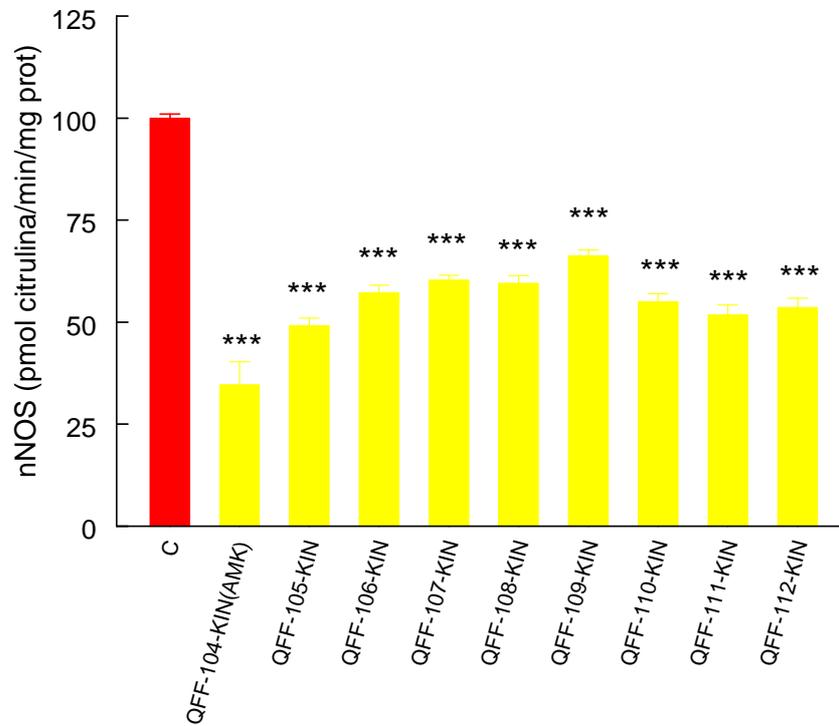


Figura 23a. Efectos de los derivados del N-acetil-5-metoxikinurenamina o N-[3-(2-amino-5-metoxifenil)-3-oxopropil]acilamida (1 mM) sobre la actividad nNOS. *** P<0.001 vs control.

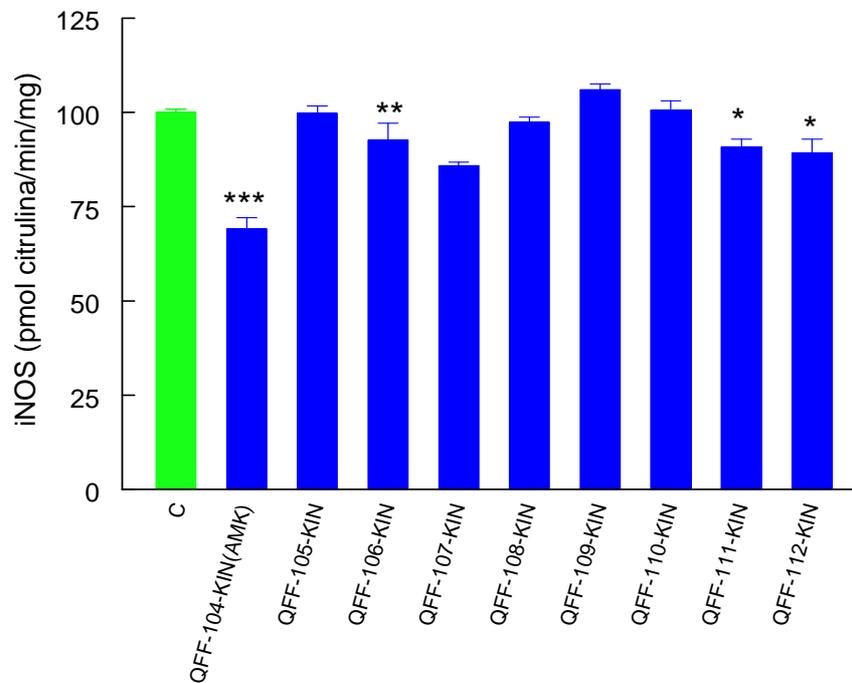


Figura 23b. Efectos de los derivados del N-acetil-5-metoxikinurenamina o N-[3-(2-amino-5-metoxifenil)-3-oxopropil]acilamida (1 mM) sobre la actividad iNOS. * P<0.05, **P<0.01 y *** P<0.001 vs control.

DERIVADOS DEL N-[3-(2-AMINO-5-CLOROFENIL)-3-OXOPROPIL ACILAMIDA.

En la tabla 6 se representa la estructura química y los sustituyentes R de estos derivados, así como los porcentajes de inhibición sobre la nNOS e iNOS.

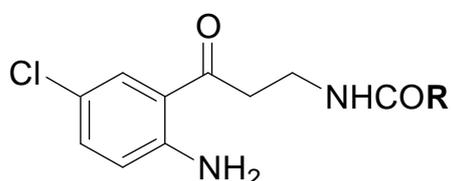


Tabla 6.

COMPUESTO	R	PM (gr mol ⁻¹)	% INHIBICIÓN nNOS	% INHIBICIÓN iNOS
QFF-113-KIN/AC-62b	-CH ₃	240.68	19.7 ± 0.57	17.7 ± 1.13
QFF-114-KIN/AC-63b		266.7	5.37 ± 2.59	9.66 ± 4.17
QFF-115-KIN/AC-64b		302.7	26.6 ± 4.52	7.2 ± 1.29

La figura 24 muestra los cambios en la actividad nNOS e iNOS en presencia de estos compuestos. Los derivados QFF-113-KIN y QFF-115-KIN inhiben la actividad nNOS, mientras que los compuestos QFF-113-KIN y QFF-114-KIN inhiben parcialmente la iNOS.

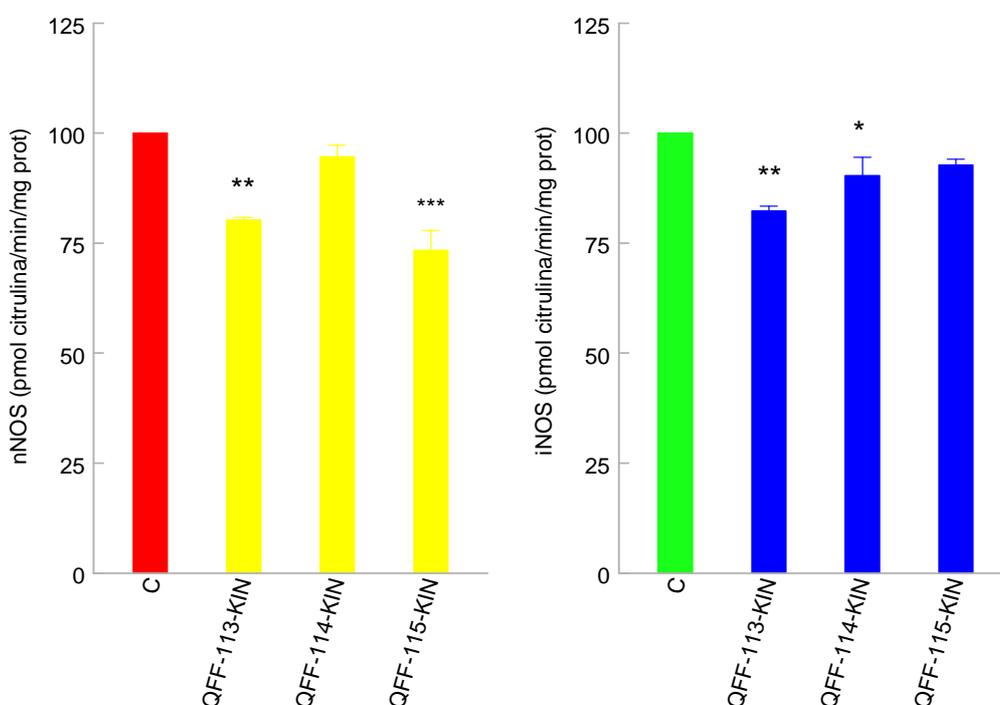


Figura 24. Efectos de los derivados del N-[3-(2-amino-5-clorofenil)-3-oxopropil acilamida (1 mM) sobre la actividad nNOS e iNOS. * P<0.05, ** P<0.01 y *** P<0.001 vs control.

1.4. FAMILIA PIRAZOLÍNICA.

1.4.1. PIRAZOLINAS.

DERIVADOS DEL 1-ACIL-3-(5-METOXI-2-AMINOFENIL)-4,5-DIHI-DRO-1H-PIRAZOL.

En la tabla 7 se representa la estructura química y los sustituyentes R de estos derivados, así como los porcentajes de inhibición sobre la nNOS e iNOS.

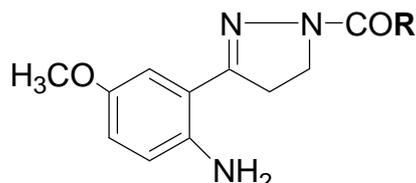


Tabla 7.

COMPUESTO	R	PM (gr mol ⁻¹)	% INHIBICIÓN nNOS	% INHIBICIÓN iNOS
QFF-116-PI/GV-7	-CH ₃	239	38.02 ± 1.39	20.39 ± 0.42
QFF-117-PI/GV-9	-CH ₂ CH ₃	245	53.27 ± 1.85	20.39 ± 1.55
QFF-118-PI/GV-11	-CH ₂ CH ₂ CH ₃	261.32	34.69 ± 1.54	13.09 ± 1.2
QFF-119-PI/GV-25	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	275.35	49.74 ± 1.57	-2.18 ± 1.4
QFF-120-PI/GV-15		259.30	62.24 ± 3.91	19.9 ± 2.11
QFF-121-PI/GV-21		273.33	38.33 ± 1.91	1.91 ± 2.1
QFF-122-PI/GV-23		287.36	49.88 ± 2.39	1.85 ± 1.2
QFF-123-PI/GV-19		301.38	62.21 ± 2.05	13.25 ± 1.32
QFF-124-PI/GV-13		295.34	58.91 ± 2.04	12.18 ± 0.55

La figura 25a muestra como todas las pirazolininas evaluadas inhiben significativamente la actividad nNOS. En la figura 25b se muestra como los compuestos QFF-116-PI, QFF-117-PI, QFF-118-PI, QFF-119-PI, QFF-120-PI y QFF-121-PI presentan la máxima inhibición para la actividad iNOS.

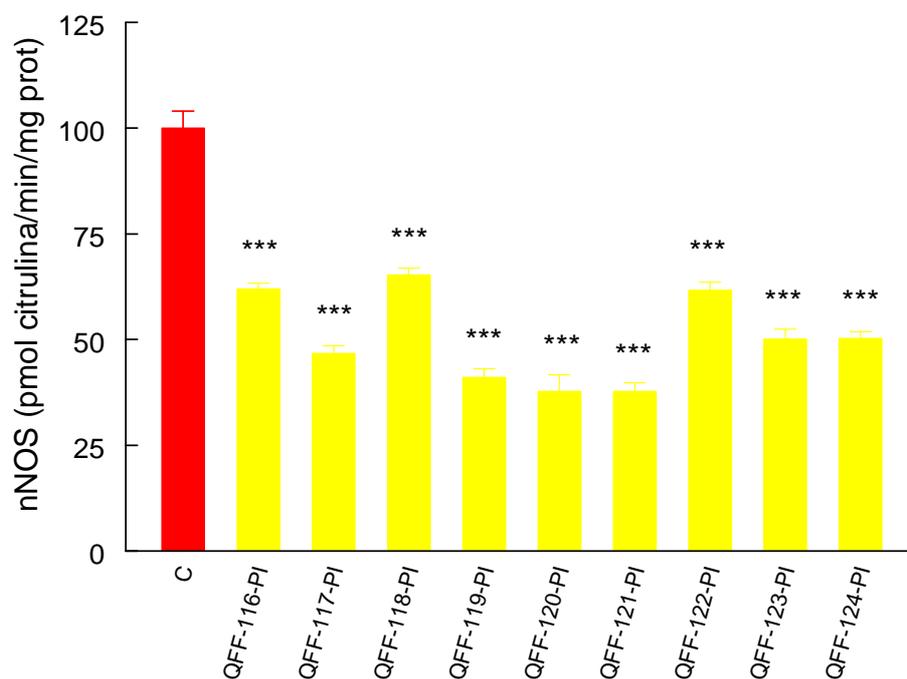


Figura 25a. Efectos de los derivados del 1-acil-3-(5-metoxi-2-aminofenil)-4,5-dihidro-1*H*-pirazol (1 mM) sobre la actividad nNOS. *** P<0.001 vs control.

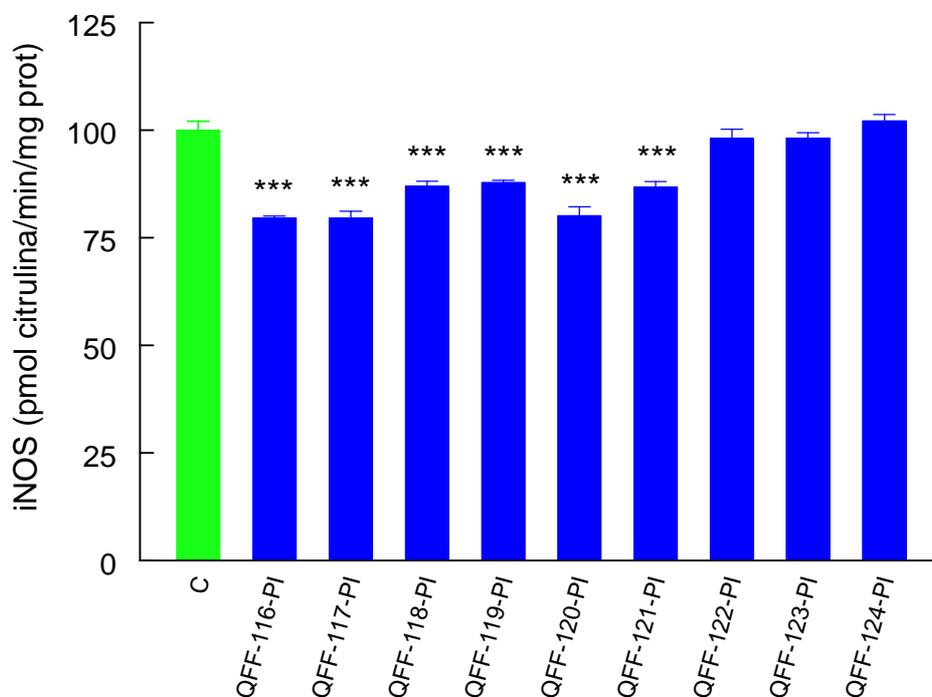


Figura 25b. Efectos de los derivados del 1-acil-3-(5-metoxi-2-aminofenil)-4,5-dihidro-1*H*-pirazol (1 mM) sobre la actividad iNOS. *** P<0.001 vs control.

DERIVADOS DEL 1-ACIL-3-(2-AMINO-5-CLOROFENIL)-4,5-DIHIDRO-1H-PIRAZOL.

En la tabla 8 se representa la estructura química y los sustituyentes R de estos derivados, así como los porcentajes de inhibición sobre la nNOS e iNOS.

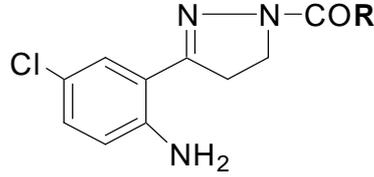


Tabla 8.

COMPUESTO	R	PM (gr mol ⁻¹)	% INHIBICIÓN nNOS	% INHIBICIÓN iNOS
QFF-125-PI/GV-307	-CH ₃	203.11	33.7 ± 5.83	1.03 ± 2.31
QFF-126-PI/GV-309	-CH ₂ CH ₃	217.12	36.46 ± 5.95	13.72 ± 2.88
QFF-127-PI/GV-311	-CH ₂ CH ₂ CH ₃	231.14	52.38 ± 3.15	-1.99 ± 3.26
QFF-128-PI/GV-315		229.12	38.8 ± 4.24	18.89 ± 2.16
QFF-129-PI/GV-313		265.12	57.06 ± 4.07	17.04 ± 2.55

La figura 26a muestra que todos los compuestos de esta serie inhiben significativamente la actividad nNOS. A excepción de QFF-125-PI y QFF-127-PI, el resto de pirazolinas inhiben también la actividad iNOS, aunque con menos eficacia que la nNOS (figura 26b).

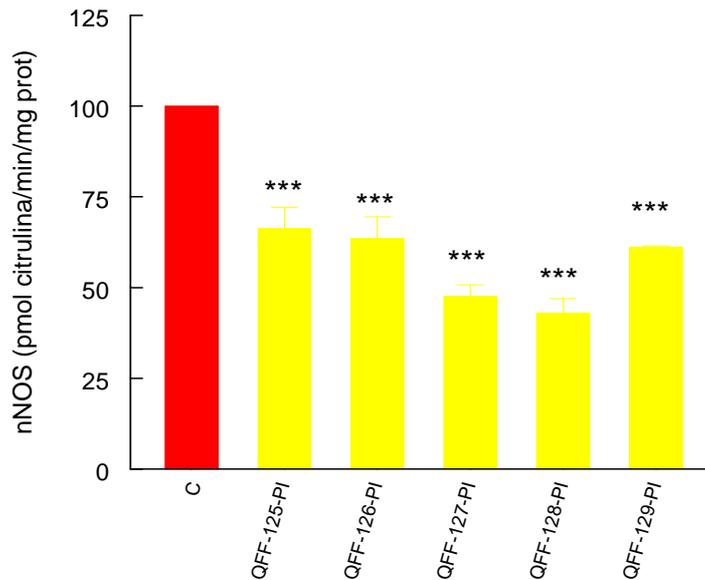


Figura 26a. Efectos de los derivados del 1-acil-3-(2-amino-5-clorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol (1 mM) sobre la actividad nNOS. *** P<0.001 vs control.

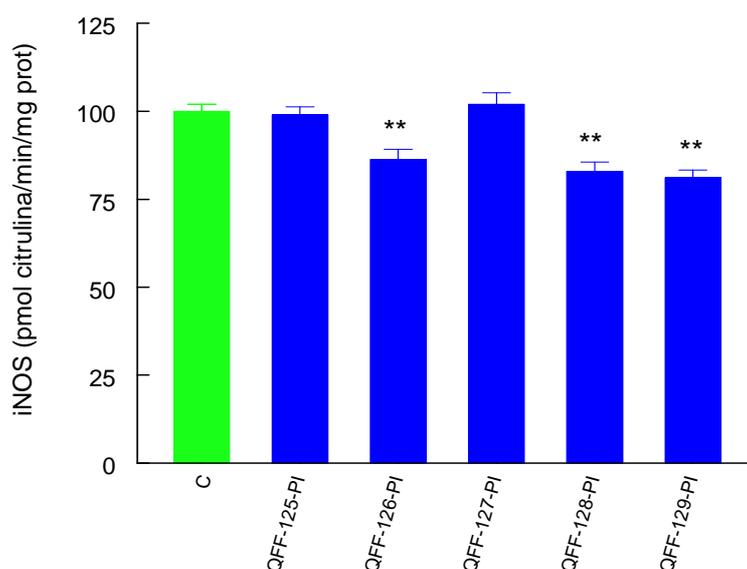


Figura 26b. Efectos de los derivados del 1-acil-3-(2-amino-5-clorofenil)-4,5-dihidro-1*H*-pirazol (1 mM) sobre la actividad iNOS. ** P<0.01 vs control.

DERIVADOS DEL 1-ACIL-3-(2-AMINOFENIL)-4,5-DIHIDRO-1*H*-PIRAZOL.

En la tabla 9 se representa la estructura química y los sustituyentes R de estos derivados, así como los porcentajes de inhibición sobre la nNOS e iNOS.

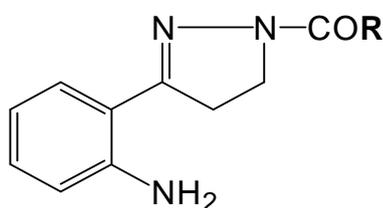
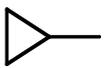
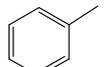


Tabla 9.

COMPUESTO	R	PM (gr mol ⁻¹)	% INHIBICIÓN nNOS	% INHIBICIÓN iNOS
QFF-130-PI/GV-407	-CH ₃	237.07	47.55 ± 1.83	7.73 ± 1.6
QFF-131-PI/GV-409	-CH ₂ CH ₃	251.08	46.12 ± 2.46	6.88 ± 0.95
QFF-132-PI/GV-411	-CH ₂ CH ₂ CH ₃	265.10	34.42 ± 1.61	-1.35 ± 1.75
QFF-133-PI/GV-415		263.08	70.22 ± 2.7	14.8 ± 1.64
QFF-134-PI/GV-413		299.08	61.12 ± 1.55	8.7 ± 2.18

La figura 27a muestra que estos compuestos inhiben significativamente la actividad nNOS. La figura 27b muestra los cambios en la actividad iNOS en presencia de estos compuestos; la máxima inhibición de la iNOS se alcanzó con el QFF-134-PI, mientras que QFF-130-PI, QFF-131-PI y QFF-133-PI tienen un efecto inhibitor frente a la iNOS menor.

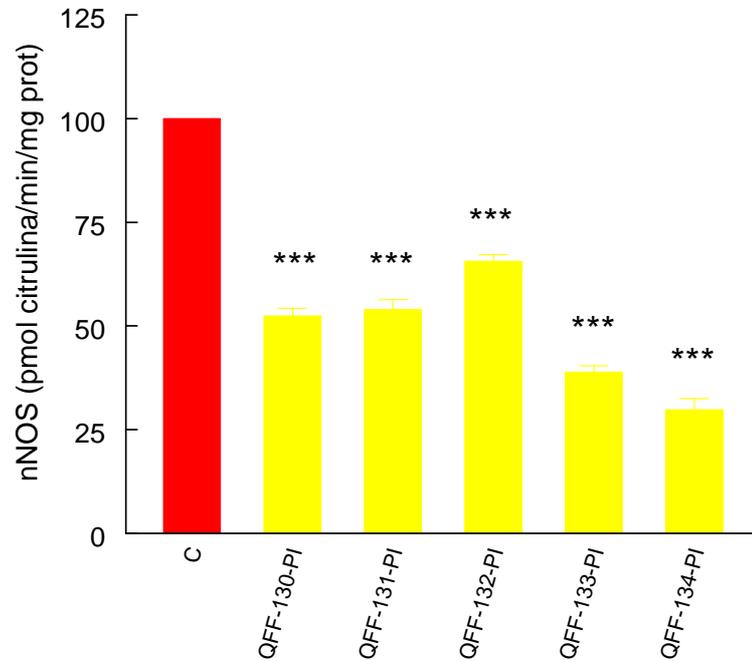


Figura 27a. Efectos de los derivados del 1-acil-3-(2-aminofenil)-4,5-dihidro-1*H*-pirazol (1 mM) sobre la actividad nNOS. *** P<0.001 vs control.

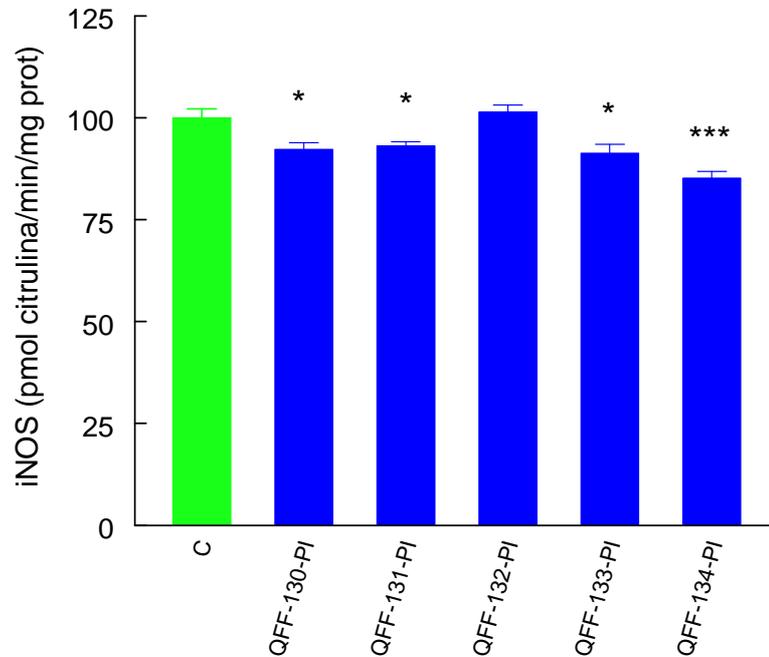


Figura 27b. Efectos de los derivados del 1-acil-3-(2-aminofenil)-4,5-dihidro-1*H*-pirazol (1 mM) sobre la actividad iNOS. * P<0.05 y *** P<0.001 vs control.

DERIVADOS DEL 3-(2-AMINO-5-METOXIBENZOIL)-4,5-DIHIDRO-1H-PIRAZOL-5-CARBOXILATO DE ETILO, ACILADOS EN POSICIÓN 1.

En la tabla 10 se representa la estructura química y los sustituyentes R de estos derivados, así como los porcentajes de inhibición sobre la nNOS e iNOS.

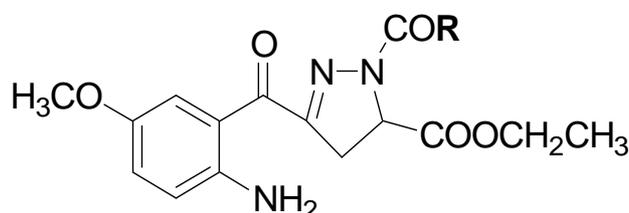


Tabla 10.

COMPUESTO	R	PM (gr mol ¹)	% INHIBICIÓN nNOS	% INHIBICIÓN iNOS
QFF-135-PI/AC-14b	-CH ₃	333	21.74 ± 4.2	7.07 ± 3.52
QFF-136-PI/AC-17b	-CH ₂ CH ₃	347	15.35 ± 3.61	13.48 ± 3.38
QFF-137-PI/AC-15b	-CH ₂ CH ₂ CH ₃	361	11.49 ± 4.08	-6.69 ± 1.82
QFF-138-PI/AC-22b	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	375	13.32 ± 1.71	1.47 ± 1.05
QFF-139-PI/AC-18b		359.3	7.07 ± 2.33	-6.55 ± 1.7
QFF-140-PI/AC-20b		373	7.36 ± 1.18	9.47 ± 2.22
QFF-141-PI/AC-21b		387	11.63 ± 1.14	14.1 ± 1.79
QFF-142-PI/AC-23b		429	21.58 ± 3.48	13.16 ± 2.94
QFF-143-PI/AC-19b		395	7.83 ± 2.24	3.09 ± 1.17

En la figura 28a muestra los cambios en la actividad nNOS en presencia de estas pirazolininas, siendo QFF-135-PI y QFF-143-PI los compuestos con mayor inhibición sobre la actividad nNOS, mientras que QFF-137-PI y QFF-142-PI presentan menor porcentaje de inhibición de la actividad nNOS. La figura 28b muestra como solamente QFF-137-PI y QFF-141-PI tienen un efecto inhibitorio frente a la iNOS.

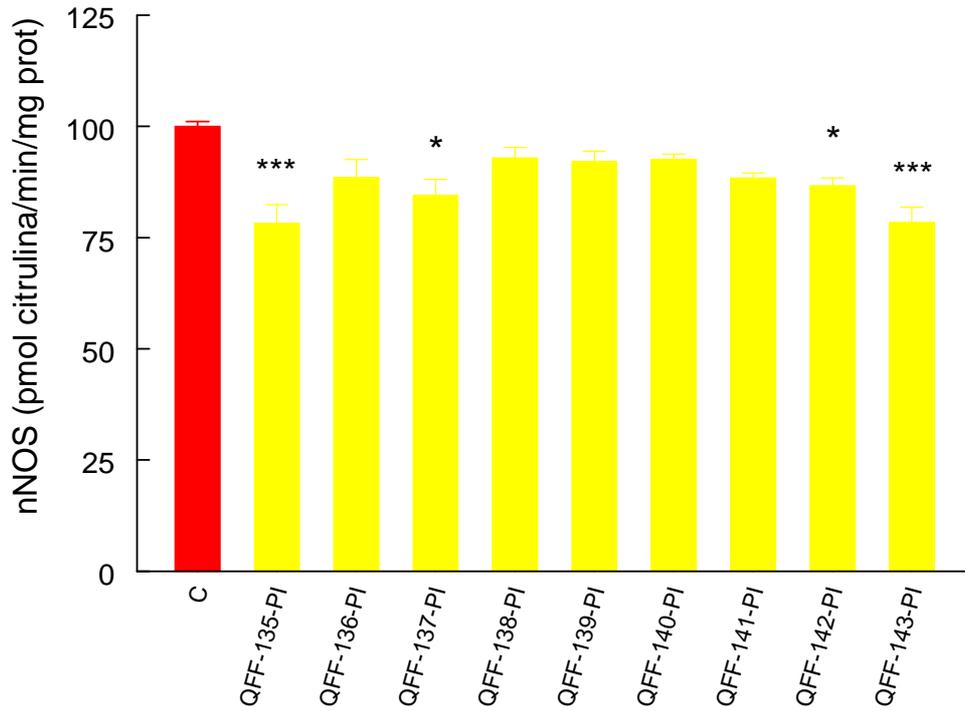


Figura 28a. Efectos de los derivados del 3-(2-amino-5-metoxibenzoil)-4,5-dihidro-1*H*-pirazol-5-carboxilato de etilo, acilados en posición 1 (1 mM) sobre la actividad nNOS. * P<0.05 y *** P<0.001 vs control.

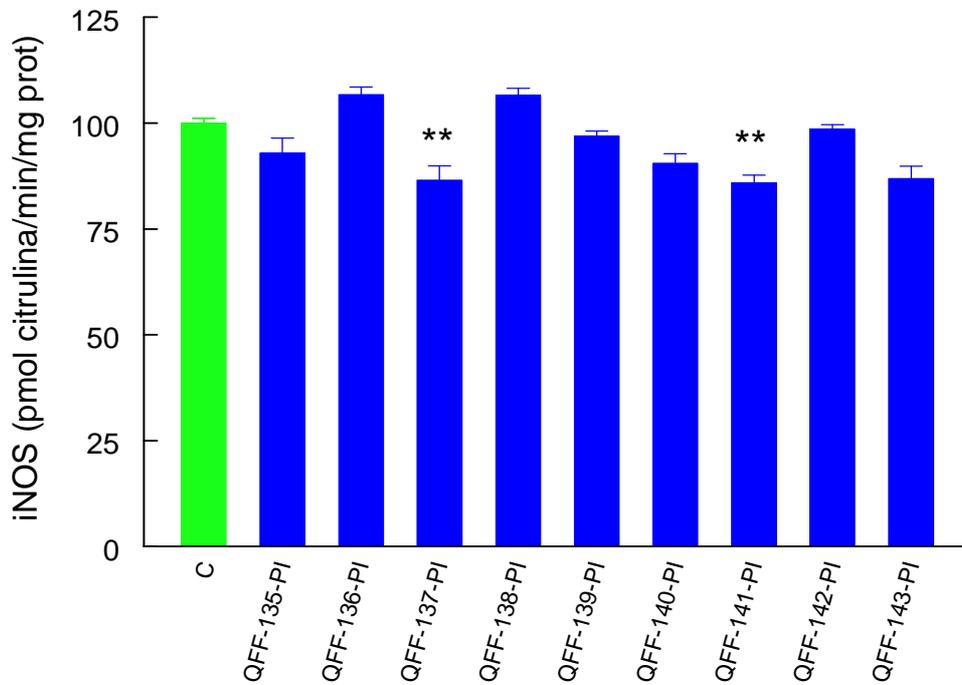


Figura 28b. Efectos de los derivados del 3-(2-amino-5-metoxibenzoil)-4,5-dihidro-1*H*-pirazol-5-carboxilato de etilo, acilados en posición 1 (1 mM) sobre la actividad iNOS. ** P<0.01 vs control.

DERIVADOS DEL 3-(2-AMINO-5-CLOROBENZOIL)-4,5-DIHIDRO-1H-PIRAZOL-5-CARBOXILATO DE ETILO, ACILADOS EN POSICIÓN 1.

En la tabla 11 se representa la estructura química y los sustituyentes R de estos derivados, así como los porcentajes de inhibición sobre la nNOS e iNOS.

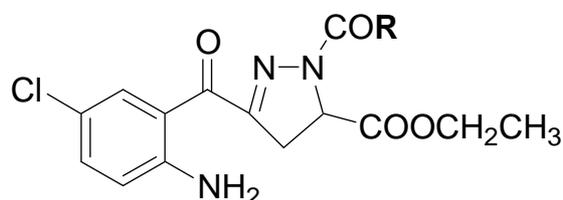
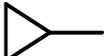
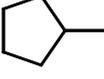
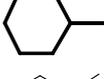
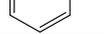


Tabla 11.

COMPUESTO	R	PM (gr mol ⁻¹)	% INHIBICIÓN nNOS	% INHIBICIÓN iNOS
QFF-144-PI/AC-41b	-CH ₃	337.35	2.37 ± 3.68	23.88 ± 3.02
QFF-145-PI/AC-42b	-CH ₂ CH ₃	351.78	3.9 ± 5.29	21.14 ± 3.10
QFF-146-PI/AC-44b	-CH ₂ CH ₂ CH ₃	365.81	3.71 ± 3.53	12.9 ± 4.13
QFF-147-PI/AC-45b	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	379.8	4.57 ± 3.21	8.86 ± 7.39
QFF-148-PI/AC-43b		363.7	4.71 ± 1.33	22.33 ± 2.25
QFF-149-PI/AC-46b		377	-0.49 ± 3.45	19.17 ± 5.25
QFF-150-PI/AC-47b		391	0.62 ± 4.67	20.15 ± 2.72
QFF-151-PI/AC-48b		405	-1.22 ± 5.92	4.94 ± 1.37
QFF-152-PI/AC-49b		399	-0.94 ± 5.59	31.45 ± 2.02

La figura 29a muestra como ningún compuesto presenta capacidad para inhibir la actividad nNOS. La figura 29b muestra la existencia de compuestos con diferente grado de inhibición de la actividad iNOS; así, las pirazolinas QFF-148-PI, QFF-149-PI y QFF-150-PI inhiben en menor proporción, a continuación QFF-144-PI y QFF-146-PI y finalmente, la máxima inhibición se alcanza con QFF-152-PI.

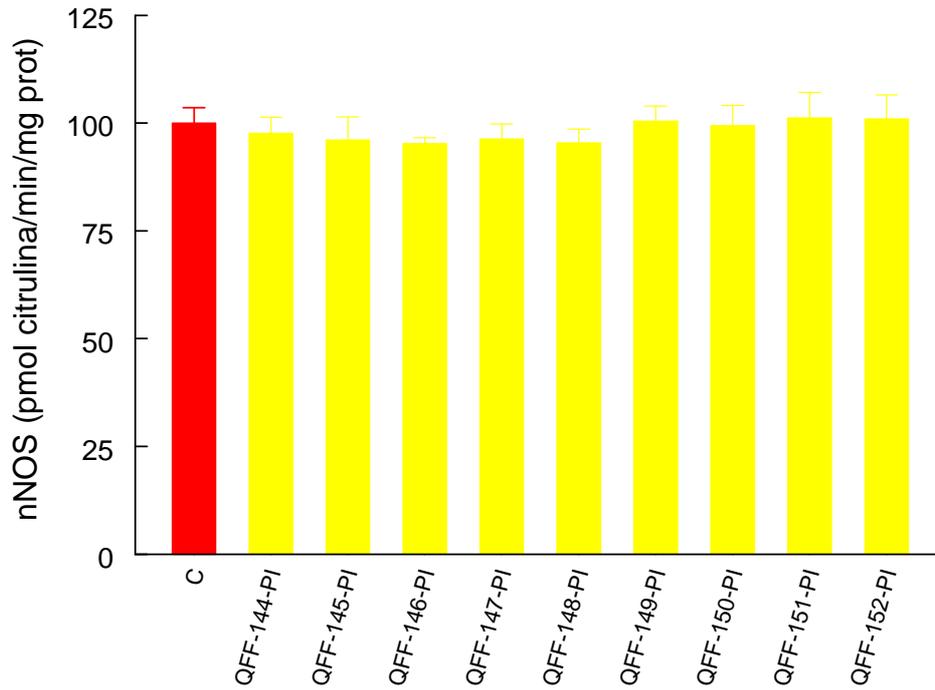


Figura 29a. Efectos de los derivados del 3-(2-amino-5-clorobenzoil)-4,5-dihidro-1*H*-pirazol-5-carboxilato de etilo, acilados en posición 1 (1 mM) sobre la actividad nNOS.

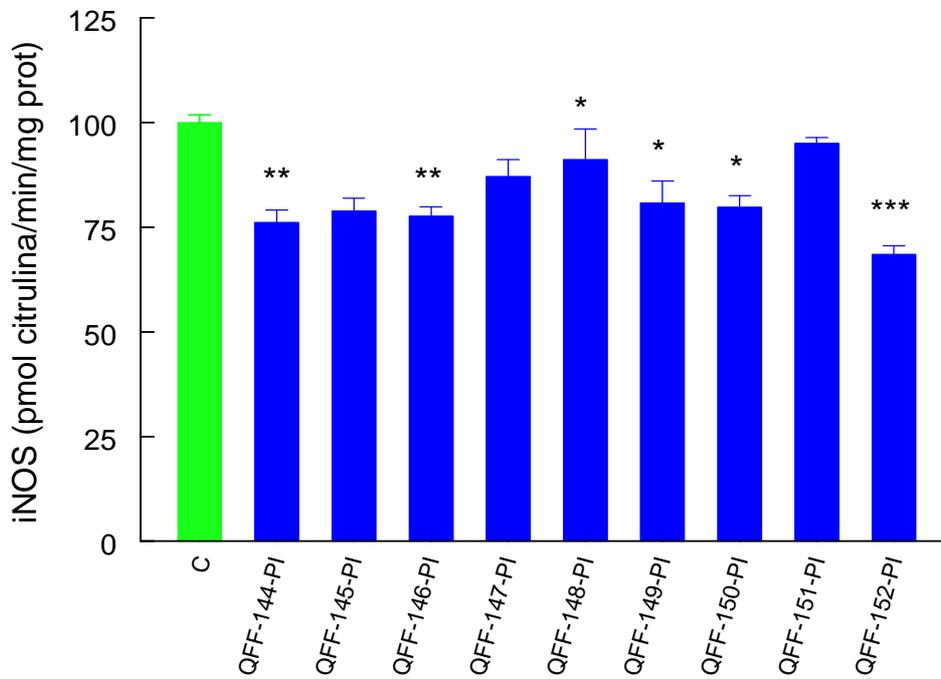


Figura 29b. Efectos de los derivados del 3-(2-amino-5-clorobenzoil)-4,5-dihidro-1*H*-pirazol-5-carboxilato de etilo, acilados en posición 1 (1 mM) sobre la actividad iNOS. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ vs control.

DERIVADOS DEL 3-(2-AMINOENZOIL)-4,5-DIHIDRO-1H-PIRAZOL-5-CARBOXILATO DE ETILO, ACILADOS EN POSICIÓN 1.

En la tabla 12 se representa la estructura química y los sustituyentes R de estos derivados, así como los porcentajes de inhibición sobre la nNOS e iNOS.

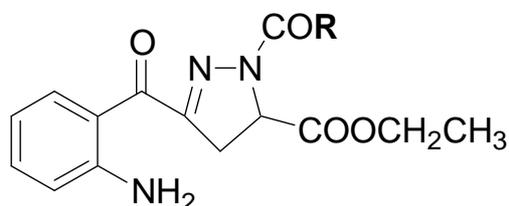


Tabla 12.

COMPUESTO	R	PM (gr mol ⁻¹)	% INHIBICIÓN nNOS	% INHIBICIÓN iNOS
QFF-153-PI/AC-31b	-CH ₃	303.3	-0.43 ± 0.74	17.15 ± 1.94
QFF-154-PI/AC-32b	-CH ₂ CH ₃	317.3	5.41 ± 2.75	11.84 ± 3.72
QFF-155-PI/AC-34b	-CH ₂ CH ₂ CH ₃	331.3	-4.9 ± 2.66	22.09 ± 1.26
QFF-156-PI/AC-35b	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	345.3	-0.27 ± 0.53	9.38 ± 3.4
QFF-157-PI/AC-33b		329.3	5.49 ± 0.34	21.8 ± 5.92
QFF-158-PI/AC-36b		343	-4.96 ± 7.4	21.51 ± 3.7
QFF-159-PI/AC-37b		357	-0.33 ± 0.75	23.31 ± 3.14
QFF-160-PI/AC-38b		371	4.32 ± 4.49	25.46 ± 1.22
QFF-161-PI/AC-39b		366	-3.61 ± 1.01	32.43 ± 0.51

La figura 30a muestra la incapacidad de los compuestos para inhibir la actividad nNOS. La figura 30b muestra como la mayoría de estas pirazolinas inhiben la actividad iNOS, siendo los que presentan mayor inhibición QFF-159-PI, QFF-160-PI y QFF-161-PI.

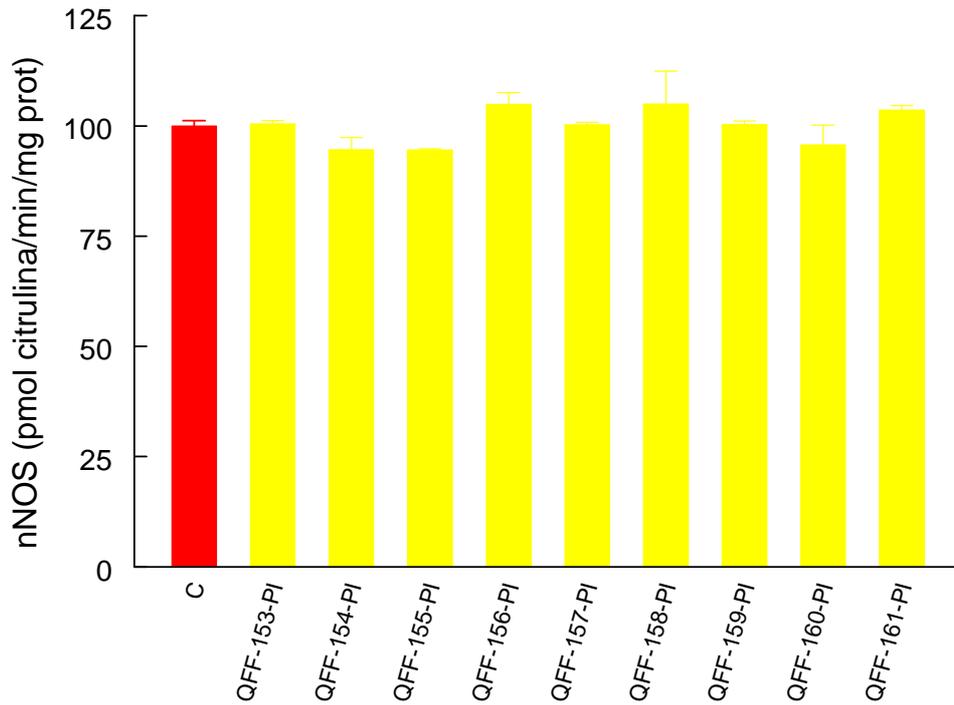


Figura 30a. Efectos de los derivados del 3-(2-aminobenzoil)-4,5-dihidro-1*H*-pirazol-5-carboxilato de etilo, acilados en posición 1 (1 mM) sobre la actividad nNOS.

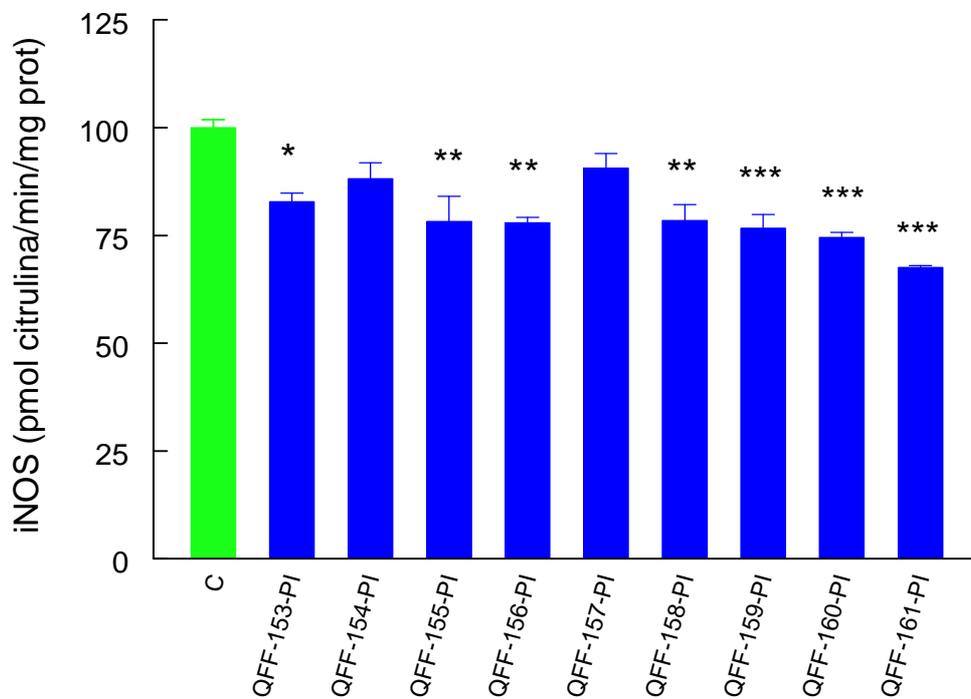


Figura 30b. Efectos de los derivados del 3-(2-aminobenzoil)-4,5-dihidro-1*H*-pirazol-5-carboxilato de etilo, acilados en posición 1 (1 mM) sobre la actividad iNOS. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ vs control.

DERIVADOS DEL 3-(2-AMINOBENZOIL)-1-METIL-4,5-DIHIDRO-1H-PIRAZOL-5-CARBOXILATO DE ETILO.

En la tabla 13 se representa la estructura química y los sustituyentes R de estos derivados, así como los porcentajes de inhibición sobre la nNOS e iNOS.

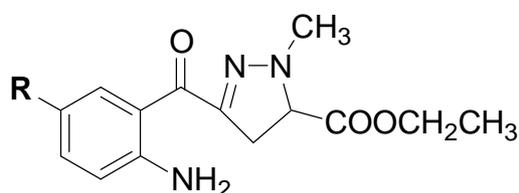


Tabla 13.

COMPUESTO	R	PM (gr mol ⁻¹)	% INHIBICIÓN nNOS	% INHIBICIÓN iNOS
QFF-162-PI/AC-8c	-OCH ₃	303	-7.85 ± 4.03	0.64 ± 4.05
QFF-163-PI/AC-30c	-H	271	-9.8 ± 2.99	12.72 ± 5.24
QFF-164-PI/AC-40c	-Cl	305	1.33 ± 2.32	22.93 ± 0.92

La figura 31 muestra los cambios en la actividad nNOS e iNOS en presencia de estas pirazolinas. Como se puede observar, no existe inhibición alguna de la actividad nNOS y solamente el compuesto QFF-164-PI inhibe significativamente la iNOS.

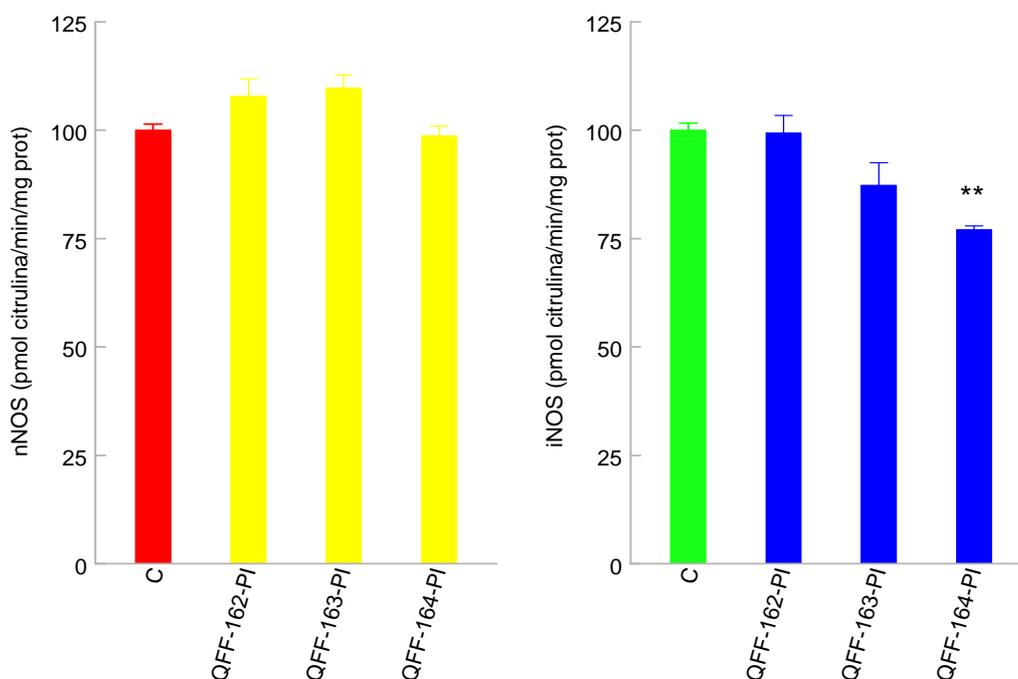


Figura 31. Efectos de los derivados del 3-(2-aminobenzoil)-1-metil-4,5-dihidro-1H-pirazol-5-carboxilato de etilo (1 mM) sobre la actividad nNOS e iNOS. ** P<0.01 vs control.

DERIVADOS DEL 3-(5-METOXIBENZO[C]ISOXAZOL-3-IL)-4,5-DIHI-DRO-1H-PIRAZOL-5-CARBOXILATO DE ETILO, ACILADOS EN POSICIÓN 1.

En la tabla 14 se representa la estructura química y los sustituyentes R de estos derivados, así como los porcentajes de inhibición sobre la nNOS e iNOS.

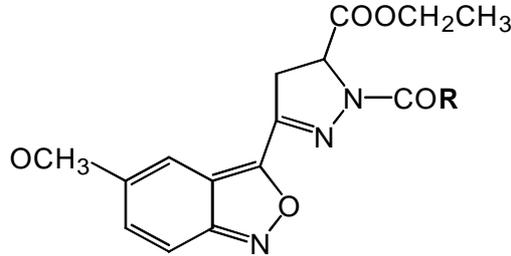


Tabla 14.

COMPUESTO	R	PM (gr mol ⁻¹)	% INHIBICIÓN nNOS	% INHIBICIÓN iNOS
QFF-165-PI/AC-14	-CH ₃	319	2.67 ± 3.33	18.46 ± 2.98
QFF-166-PI/AC-16	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃	323	10.96 ± 4.35	5.5 ± 0.94

La figura 32 muestra los cambios en la actividad nNOS e iNOS en presencia de estas pirazolininas. Ningún derivado inhibe la actividad nNOS, mientras que el compuesto QFF-165-PI inhibe parcialmente la iNOS.

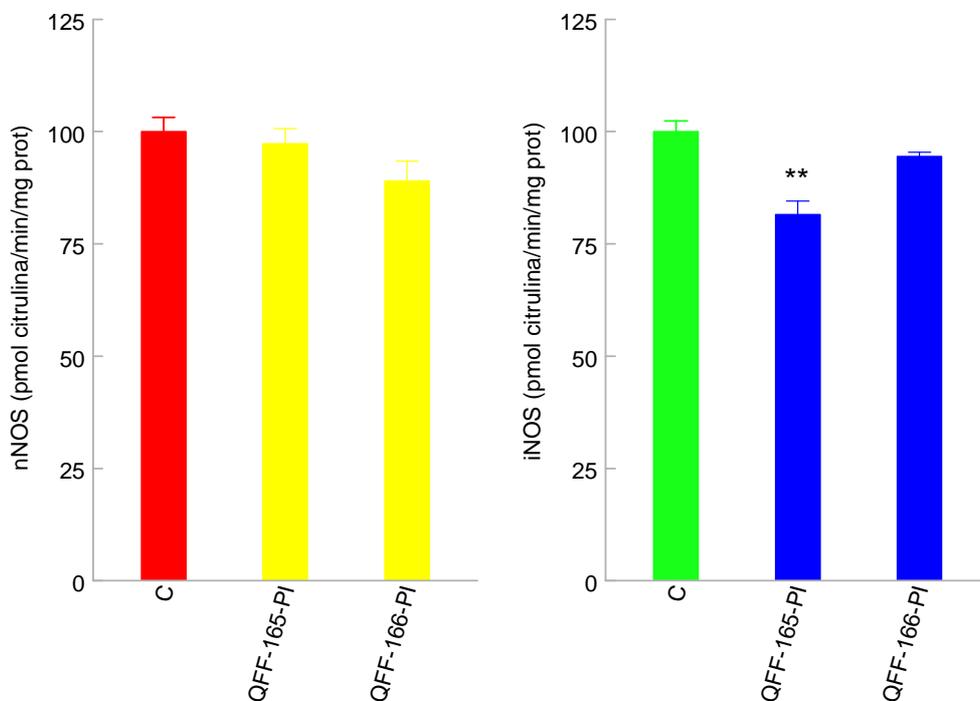


Figura 32. Efectos de los derivados del 3-(5-metoxibenzo[c]isoxazol-3-IL)-4,5-dihidro-1H-pirazol-5-carboxilato de etilo, acilados en posición 1 (1 mM) sobre la actividad nNOS e iNOS. ** P<0.01 vs control.

3-(2-AMINO-5-METOXI- α -HIDROXIBENCIL)-1-BENZOIL-4,5-DIHIDRO-1H-PIRAZOL-5-CARBOXILATO DE ETILO.

En la tabla 15 se representa la estructura química y los sustituyentes R de estos derivados, así como los porcentajes de inhibición sobre la nNOS e iNOS.

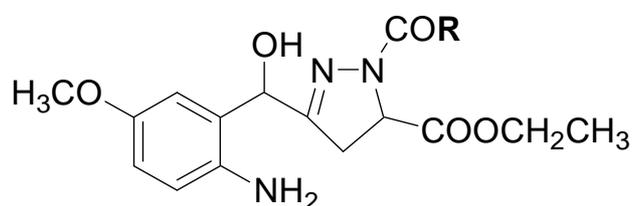


Tabla 15.

COMPUESTO	R	PM (gr mol ⁻¹)	% INHIBICIÓN nNOS	% INHIBICIÓN iNOS
QFF-167-PI/AC-19d		395	-4.72 ± 3.12	21.64 ± 1.96

La figura 33 muestra cómo el compuesto QFF-167-PI no inhibe ni la actividad nNOS ni la iNOS.

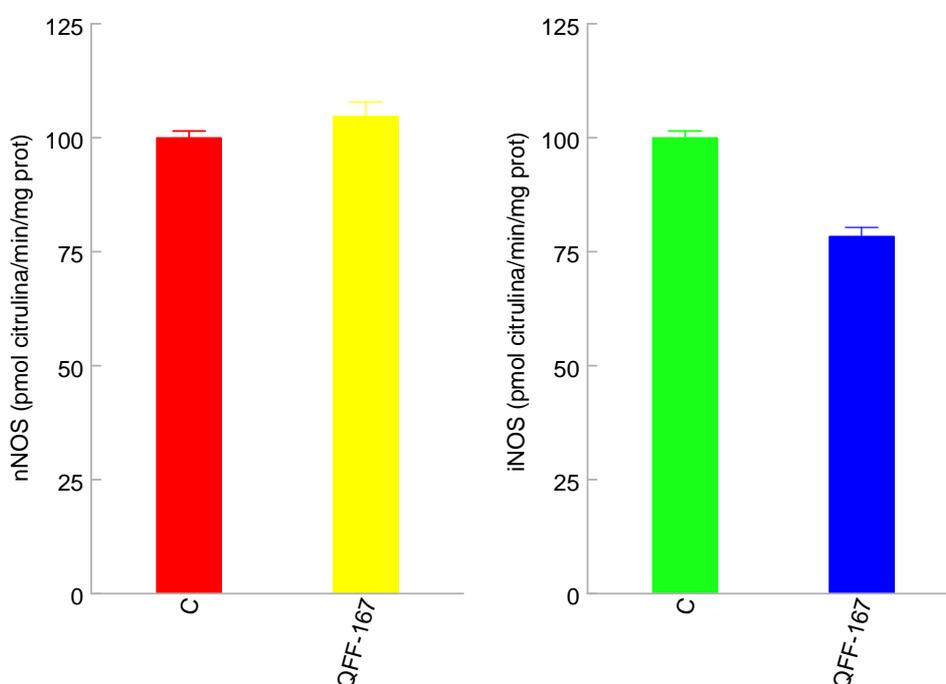


Figura 33. Efecto del 3-(2-amino-5-metoxi- α -hidroxibencil)-1-benzoil-4,5-dihidro-1H-pirazol-5-carboxilato de etilo (1 mM) sobre la actividad nNOS e iNOS.

DERIVADOS DEL ÁCIDO 3-(2-AMINO-5-METOXIBENZOIL)-4,5-DIHIDRO-1H-PIRAZOL-5-CARBOXÍLICO, ACILADOS EN POSICIÓN 1.

En la tabla 16 se representa la estructura química y los sustituyentes R de estos derivados, así como los porcentajes de inhibición sobre la nNOS e iNOS.

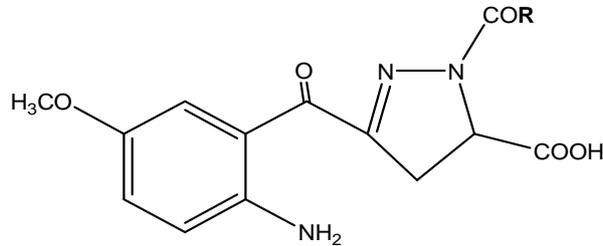
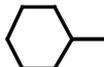


Tabla 16.

COMPUESTO	R	PM (gr mol ⁻¹)	% INHIBICIÓN nNOS	% INHIBICIÓN iNOS
QFF-168-PI/AC-14d	-CH ₃	305.28	6.12 ± 3.11	22.66 ± 6.07
QFF-169-PI/AC-23d		373.4	3.89 ± 4.94	20.22 ± 3.96

La figura 34 muestra que ambos compuestos solo tienen efecto inhibitorio sobre la actividad iNOS.

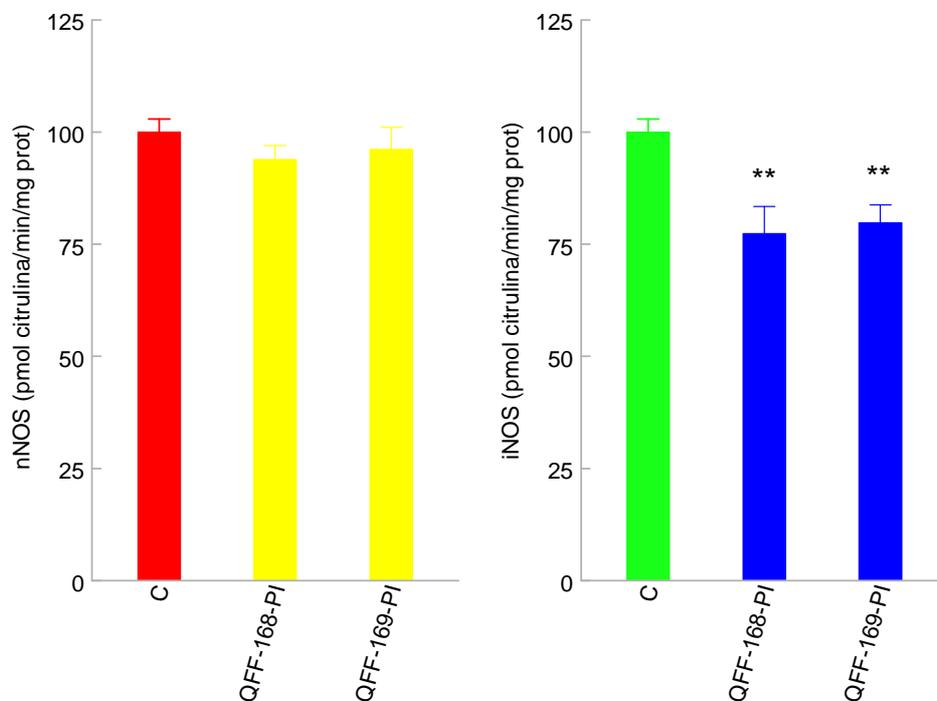


Figura 34. Efectos del ácido 3-(2-amino-5-metoxibenzoil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-5-carboxílico, acilados en posición 1 (1 mM) sobre la actividad nNOS e iNOS. ** P<0.01 vs control.

1.4.2. PIRAZOLIDINAS.

DERIVADOS DEL 5-(2-AMINO-5-METOXIBENZOIL)-PIRAZOLIDINA-3-CARBOXILATO DE ETILO, ACILADOS EN POSICIÓN 2.

En la tabla 17 se representa la estructura química y los sustituyentes R de estos derivados, así como los porcentajes de inhibición sobre la nNOS e iNOS.

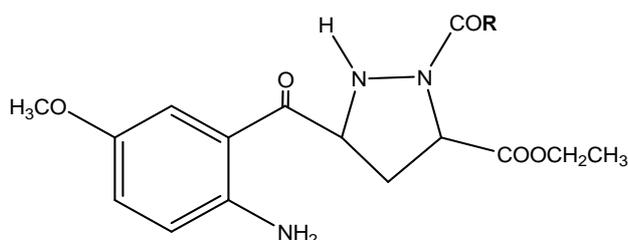


Tabla 17.

COMPUESTO	R	PM (gr mol ⁻¹)	% INHIBICIÓN nNOS	% INHIBICIÓN iNOS
QFF-170-PID/AC-17c	-CH ₂ CH ₃	361	-15.59 ± 4.39	23.93 ± 4.21
QFF-171-PID/AC-18c		349.3	-3.48 ± 2.35	22.05 ± 4.19

La figura 35 muestra los cambios en la actividad nNOS e iNOS en presencia de los compuestos evaluados. Solamente son efectivos frente al componente inducible.

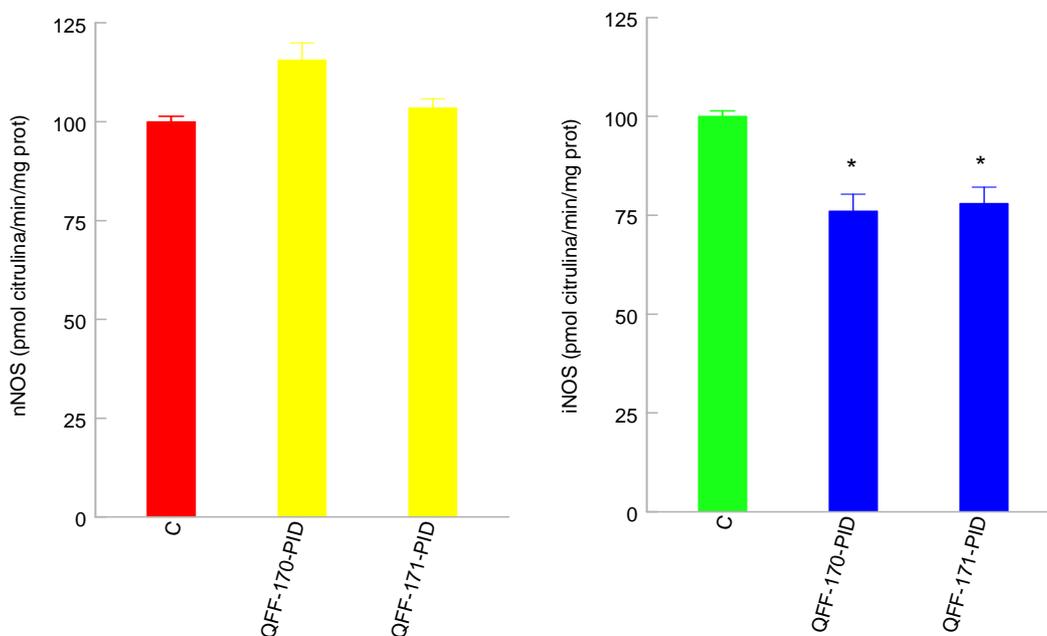


Figura 35. Efectos del 5-(2-amino-5-metoxibenzoil)-pirazolidina-3-carboxilato de etilo, acilados en posición 2 (1 mM) sobre la actividad nNOS e iNOS. * P<0.05 vs control.

DERIVADOS DEL 3-(2-AMINO-5-METOXIBENZOIL)-4,5-DIHIDRO-1H-PIRAZOL-5-CARBOXILATO DE ETILO-1-SUSTITUIDOS.

En la tabla 18 se representa la estructura química y los sustituyentes R de estos derivados, así como los porcentajes de inhibición sobre la nNOS e iNOS.

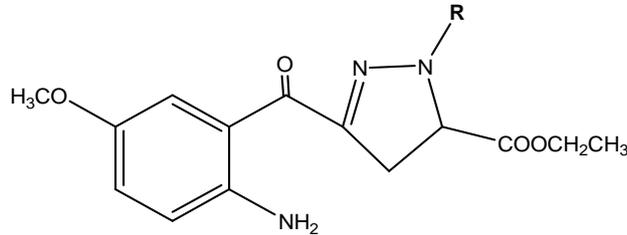


Tabla 18.

COMPUESTO	R	PM (gr mol ⁻¹)	% INHIBICIÓN nNOS	% INHIBICIÓN iNOS
QFF-172-PID/LCLC-Q.2	-CH ₂ CH ₃	319	1.68 ± 2.7	17.11 ± 0.75
QFF-173-PID/LCLC-N.2b	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	347.412	-9.98 ± 2.32	18.61 ± 1.24
QFF-174-PID/LCLC-N.4b	-CH ₂ Ph	381.17	9.35 ± 1.21	10.55 ± 2.65

La figura 36 muestra como el compuesto QFF-174-PID inhibe parcialmente la actividad nNOS y como todas las pirazolidinas actúan inhibiendo significativamente el componente inducible.

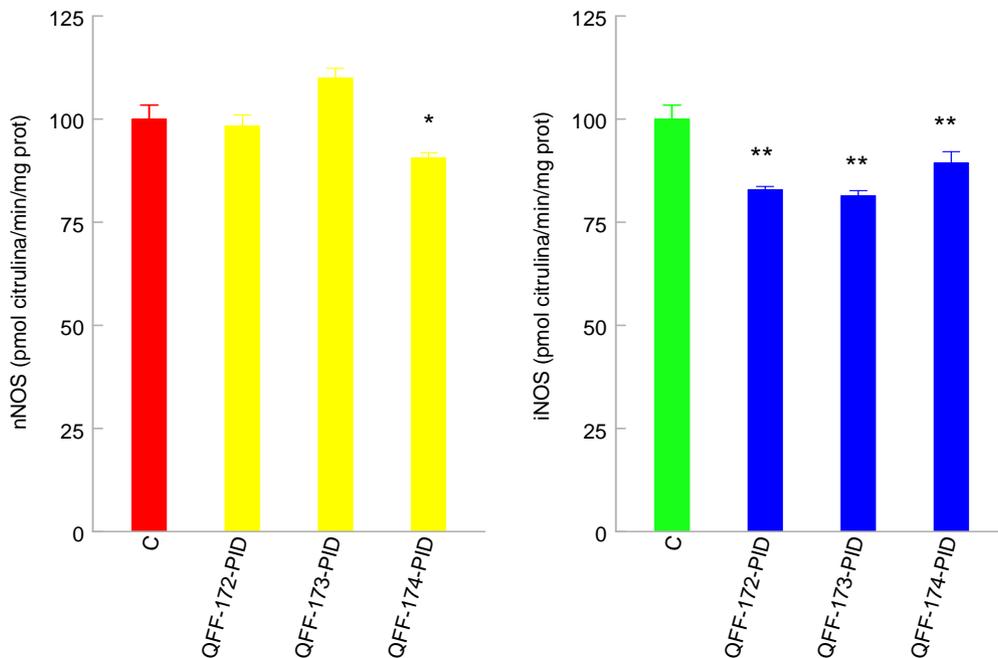


Figura 36. Efectos del 3-(2-amino-5-metoxibenzoil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-5-carboxilato de etilo-1-sustituidos (1 mM) sobre la actividad nNOS e iNOS. * P<0.05 y ** P<0.01 vs control.

DERIVADOS DEL 3-(2-AMINO-5-CLOROBENZOIL)-4,5-DIHIDRO-1H-PIRAZOL-5-CARBOXILATO DE ETILO-1-SUSTITUIDOS.

En la tabla 19 se representa la estructura química y los sustituyentes R de estos derivados, así como los porcentajes de inhibición sobre la nNOS e iNOS.

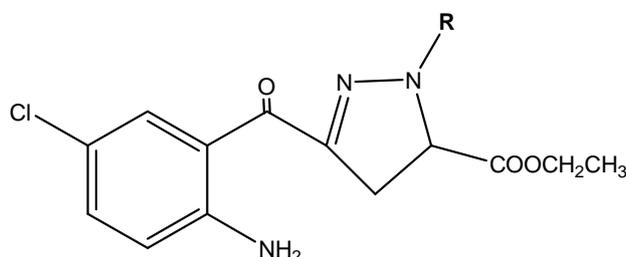


Tabla 19.

COMPUESTO	R	PM (gr mol ⁻¹)	% INHIBICIÓN nNOS	% INHIBICIÓN iNOS
QFF-175-PID/LCLC-P.2	-H	295.724	32.14 ± 2.24	19.11 ± 0.66
QFF-176-PID/LCLC-A.2	-CH ₂ CH ₃	323	41.55 ± 2.19	14.66 ± 3.23
QFF-177-PID/LCLC-L.2	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	351	38.53 ± 3.47	10.05 ± 3.62
QFF-178-PID/LCLC-X.2b	-CH ₂ Ph	385.84	18.33 ± 0.43	17.33 ± 0.62

La figura 37 muestra como todos los compuestos, a excepción de QFF-178-PID, inhiben de forma máxima la actividad nNOS, mientras que QFF-175-PID y QFF-178-PID inhiben en mayor porcentaje la actividad iNOS.

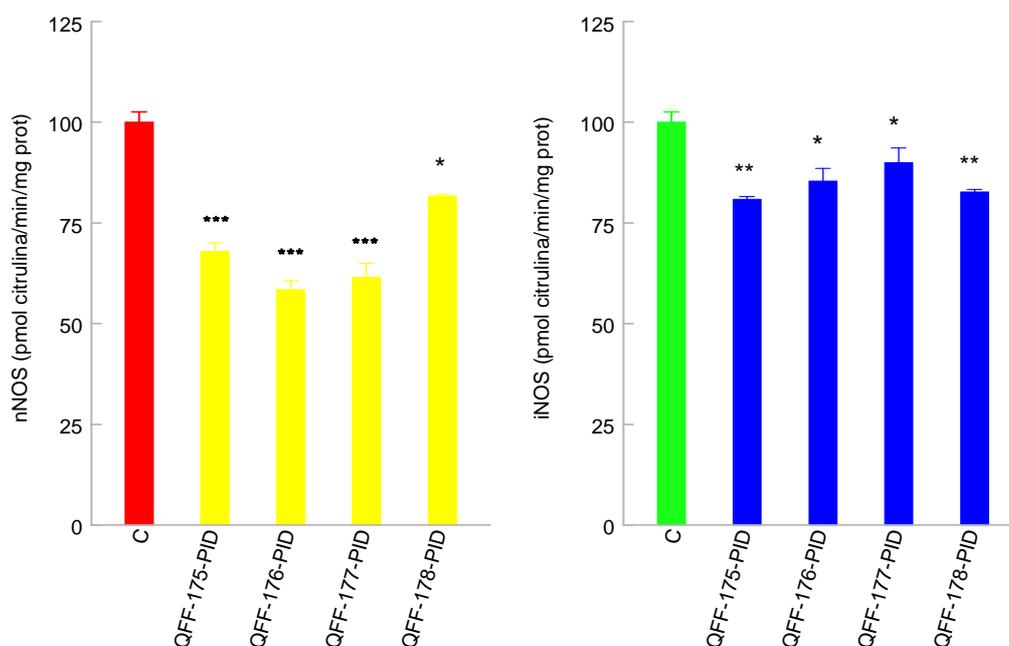


Figura 37. Efectos del 3-(2-amino-5-clorobenzoil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-5-carboxilato de etilo-1-sustituidos (1 mM) sobre la actividad nNOS e iNOS. * P<0.05, ** P<0.01 y *** P<0.001 vs control.

DERIVADOS DEL 3-(2-AMINOENZOIL)-1H-PIRAZOL-5-CARBOXILATO DE ETILO-1-SUSTITUIDOS.

En la tabla 20 se representa la estructura química y los sustituyentes R de estos derivados, así como los porcentajes de inhibición sobre la nNOS e iNOS.

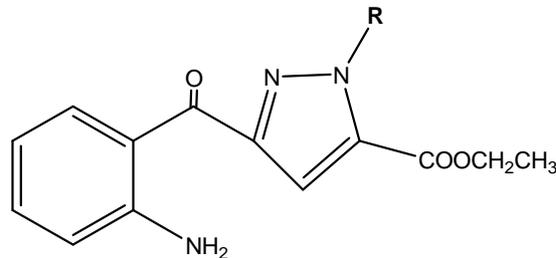


Tabla 20.

COMPUESTO	R	PM (gr mol ⁻¹)	% INHIBICIÓN nNOS	% INHIBICIÓN iNOS
QFF-179-PID/LCLC-S.2b	-CH ₂ CH ₃	289.33	22.09 ± 4.36	-1.46 ± 1.72
QFF-180-PID/LCLC-S.4b	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	317.38	29.62 ± 2.12	12.22 ± 1.43
QFF-181-PID/LCLC-S.7b	-CH ₂ Ph	351.16	28.38 ± 5.78	9.39 ± 1.37

La figura 38 muestra los cambios en la actividad nNOS e iNOS en presencia de las pirazolidinas evaluadas. Todos estos compuestos inhiben significativamente a la nNOS, siendo el menos potente el QFF-179-PID. La máxima inhibición de la iNOS se alcanzó con el QFF-180-PID, mientras que QFF-181-PID tiene un efecto inhibitor frente a la iNOS menor.

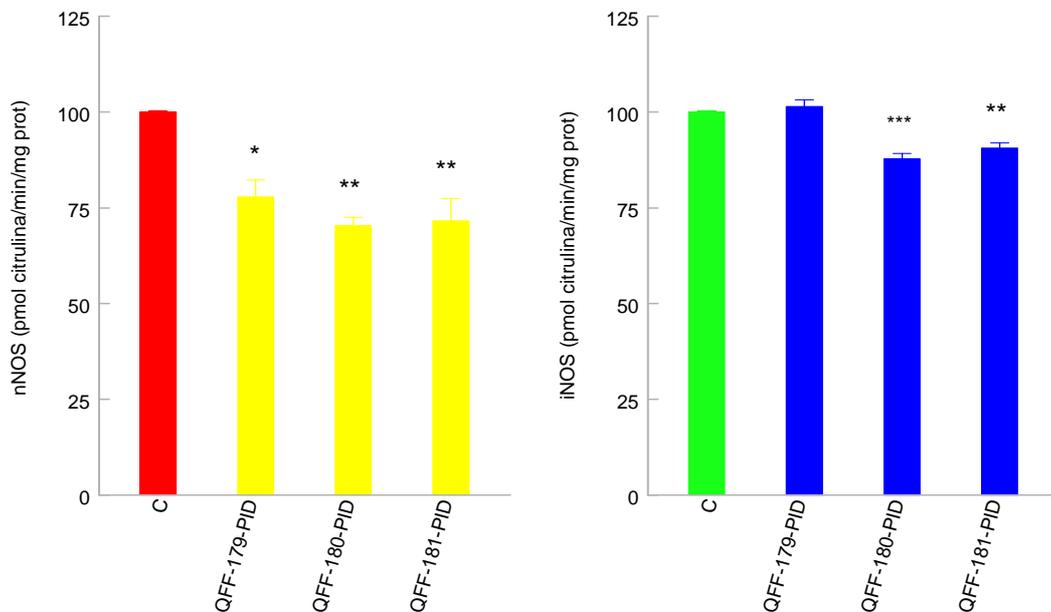


Figura 38. Efectos del 3-(2-aminobenzoyl)-1H-pirazol-5-carboxilato de etilo-1-sustituidos (1 mM) sobre la actividad nNOS e iNOS. * P<0.05, ** P<0.01 y *** P<0.001 vs control.

1.4.3. PIRAZOLES.

DERIVADOS DEL 3-(2-AMINO-5-METOXIBENZOIL)-1H-PIRAZOL-5-CARBOXILATO DE ETILO-1-SUSTITUIDOS.

En la tabla 21 se representa la estructura química y los sustituyentes R de estos derivados, así como los porcentajes de inhibición sobre la nNOS e iNOS.

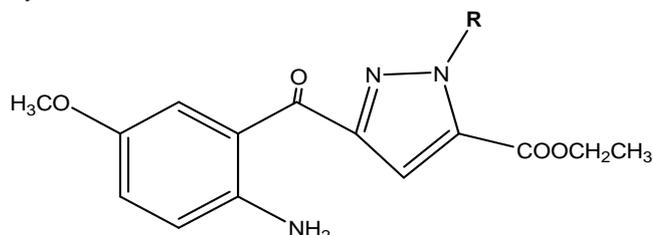


Tabla 21.

COMPUESTO	R	PM (gr mol ⁻¹)	% INHIBICIÓN nNOS	% INHIBICIÓN iNOS
QFF-182-PIZ/LCLC-G.2	-CH ₂ CH ₃	317.3	20.27 ± 0.49	24.56 ± 1.08
QFF-183-PIZ/LCLC-N.2a	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	345.396	26.19 ± 0.89	20.49 ± 0.39
QFF-184-PIZ/LCLC-N.4a	-CH ₂ Ph	379	19.38 ± 2.87	30.54 ± 0.81

La figura 39 muestra como todos los pirazoles inhiben significativamente tanto la actividad nNOS como la iNOS.

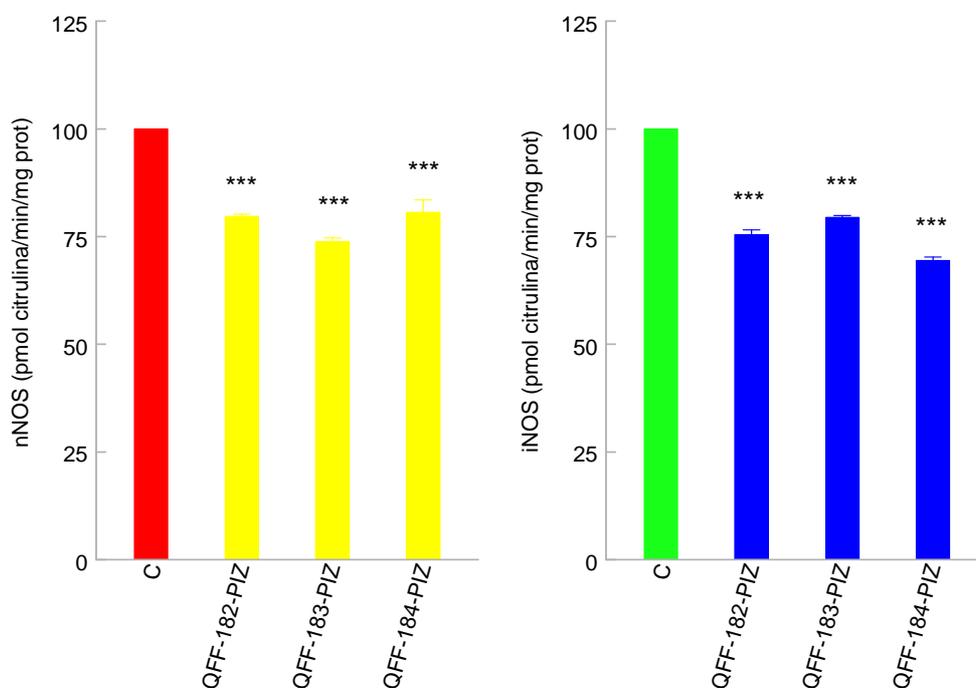


Figura 39. Efectos del 3-(2-amino-5-metoxibenzoil)-1H-pirazol-5-carboxilato de etilo-1-sustituidos (1 mM) sobre la actividad nNOS e iNOS. *** P<0.001 vs control.

DERIVADOS DEL 3-(2-AMINO-5-CLOROBENZOIL)-1H-PIRAZOL-5-CARBOXILATO DE ETILO-1-SUSTITUIDOS.

En la tabla 22 se representa la estructura química y los sustituyentes R de estos derivados, así como los porcentajes de inhibición sobre la nNOS e iNOS.

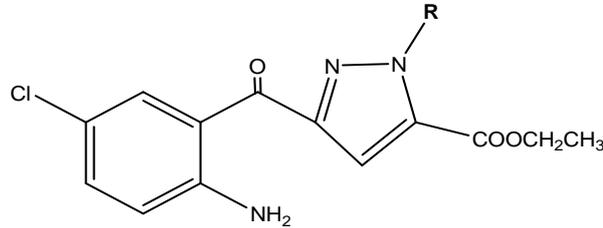


Tabla 22.

COMPUESTO	R	PM (gr mol ⁻¹)	% INHIBICIÓN nNOS	% INHIBICIÓN iNOS
QFF-185-PIZ/LCLC-H.2	-H	293.706	40.2 ± 2.18	12.83 ± 4.57
QFF-186-PIZ/LCLC-M.2	-CH ₃	307.73	14.55 ± 6.19	7.32 ± 3.9
QFF-187-PIZ/LCLC-T.2	-CH ₂ CH ₃	321.762	35.47 ± 1.37	27.49 ± 2.1
QFF-188-PIZ/LCLC-X.3a	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	249.81	7.86 ± 0.51	18.71 ± 1.01
QFF-189-PIZ/LCLC-X.2	-CH ₂ C ₆ H ₅	383.283	2.69 ± 1.37	50.36 ± 3.19

La figura 40a muestra los cambios en la actividad nNOS en presencia de estos compuestos. QFF-186-PIZ y QFF-187-PIZ son los pirazoles que inhiben en mayor proporción la actividad nNOS. La figura 40b muestra como la máxima inhibición de la iNOS se alcanzó con los pirazoles QFF-185-PIZ y QFF-187-PIZ.

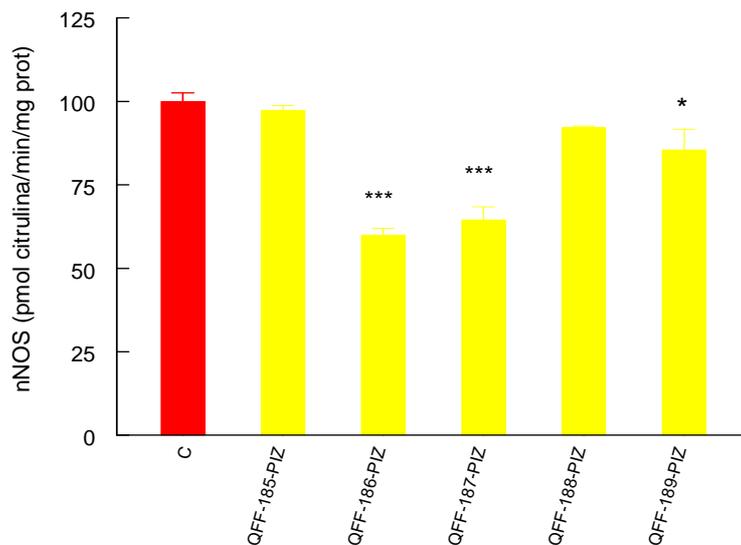


Figura 40a. Efectos del 3-(2-amino-5-clorobenzoil)-1H-pirazol-5-carboxilato de etilo-1-sustituidos (1 mM) sobre la actividad nNOS. * P<0.05 y *** P<0.001 vs control.

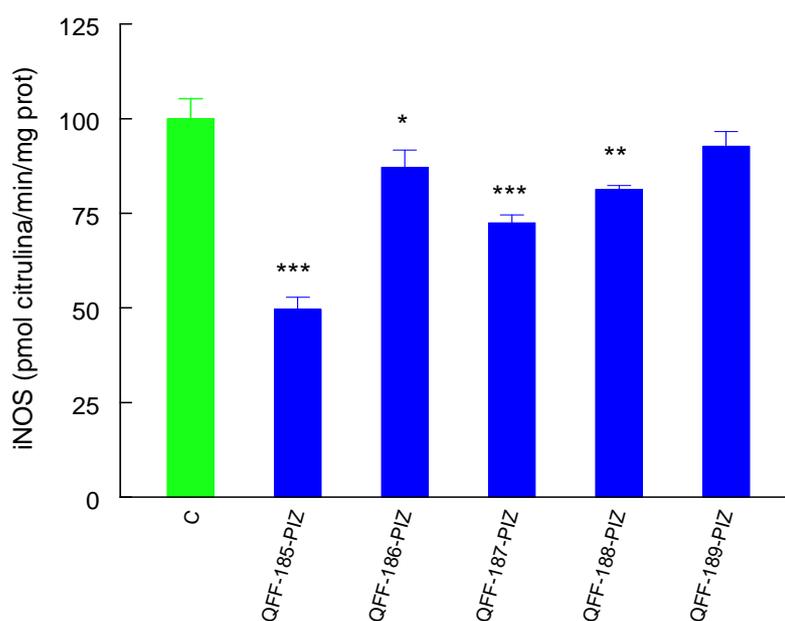


Figura 40b. Efectos del 3-(2-amino-5-clorobenzoil)-1*H*-pirazol-5-carboxilato de etilo-1-sustituidos (1 mM) sobre la actividad iNOS. * P<0.05, ** P<0.01 y *** P<0.001 vs control.

DERIVADOS DEL 3-(2-AMINOBENZOIL)-1*H*-PIRAZOL-5-CARBOXILATO DE ETILO-1-SUSTITUIDOS.

En la tabla 23 se representa la estructura química y los sustituyentes R de estos derivados, así como los porcentajes de inhibición sobre la nNOS e iNOS.

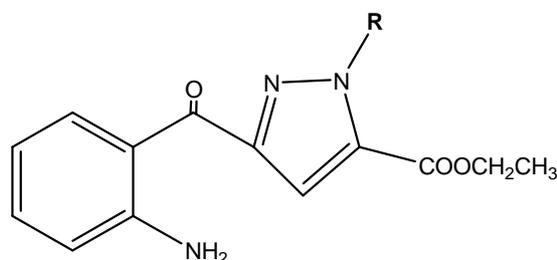


Tabla 23.

COMPUESTO	R	PM (gr mol ⁻¹)	% INHIBICIÓN nNOS	% INHIBICIÓN iNOS
QFF-190-PIZ/LCLC-R.2	-CH ₂ CH ₃	287.316	39.49 ± 1.64	12.53 ± 2.12
QFF-191-PIZ/LCLC-S.4a	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	315.87	21.98 ± 3.11	5.39 ± 0.89
QFF-192-PIZ/LCLC-S.7a	-CH ₂ Ph	349.14	21.95 ± 0.45	13.47 ± 4.37

La figura 41 muestra los cambios en la actividad nNOS e iNOS en presencia de los compuestos evaluados. Todos ellos inhiben de forma máxima el componente constitutivo, mientras que QFF-190-PIZ y QFF-192-PIZ inhiben de forma parcial la iNOS.

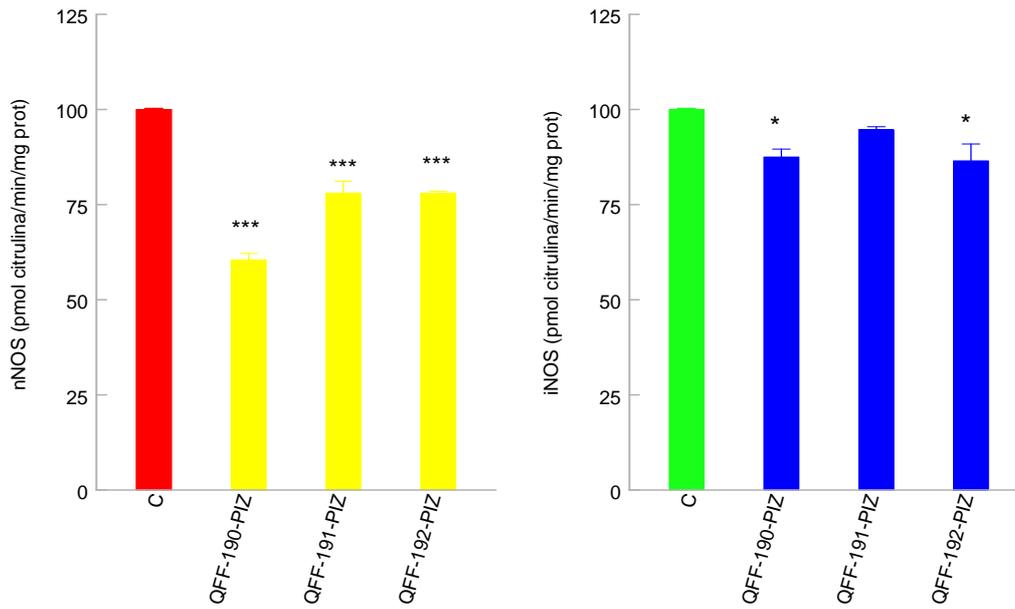


Figura 41. Efectos del 3-(2-aminobenzoil)-1*H*-pirazol-5-carboxilato de etilo-1-sustituidos (1 mM) sobre la actividad nNOS. *** P<0.001 vs control y sobre la actividad iNOS. * P<0.05 vs control.

1.4.4. PIRROLES.

DERIVADOS DEL 5-(2-AMINO-5-METOXIFENIL)-1*H*-PIRROL-2-CARBOXAMIDA.

En la tabla 24 se representa la estructura química y los sustituyentes R de estos derivados, así como los porcentajes de inhibición sobre la nNOS e iNOS.

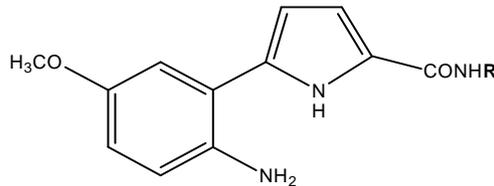


Tabla 24.

COMPUESTO	R	PM (gr mol ⁻¹)	% INHIBICIÓN nNOS	% INHIBICIÓN iNOS
QFF-193-PIR/LCLC-C.5	-H	231.251	-18.14 ± 2.01	8.95 ± 0.5
QFF-194-PIR/LCLC-C.8-1	-CH ₃	245.277	-47.97 ± 2.6	26.17 ± 6.85
QFF-195-PIR/LCLC-C.8-3	-CH ₂ CH ₂ CH ₃	273.330	43.75 ± 3.38	6.78 ± 3.93
QFF-195-PIR/LCLC-C.8-5		271	32.54 ± 2.63	21.36 ± 4.68
QFF-196-PIR/LCLC-C.8-8		299.35	15.33 ± 2.42	26.25 ± 3.22
QFF-197-PIR/LCLC-C.8-9	-CH ₂ Ph	321.373	8.89 ± 1.13	22.41 ± 1.94

La figura 42a muestra los cambios en la actividad nNOS en presencia de los pirroles evaluados. Mientras que QFF-193-PIR y QFF-194-PIR inducen la actividad nNOS, el resto de compuestos la inhiben, especialmente el QFF-195-PIR y el QFF-196-PIR. La figura 42b muestra los cambios en la actividad iNOS en presencia de estos compuestos. Excepto QFF-193-PIR y QFF-195-PIR, los demás compuestos tienen un efecto inhibitorio similar frente a la iNOS.

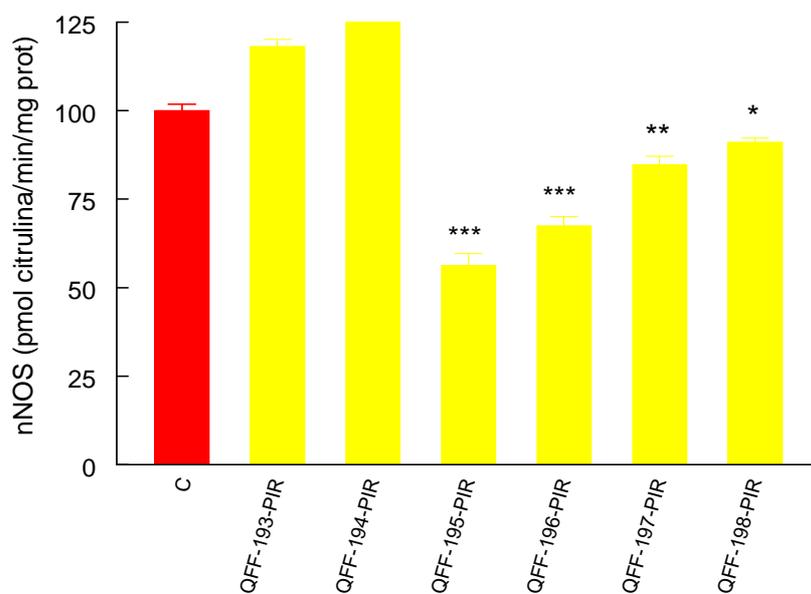


Figura 42a. Efectos del 5-(2-amino-5-metoxifenil)-1*H*-pirrol-2-carboxamida (1 mM) sobre la actividad nNOS. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ vs control.

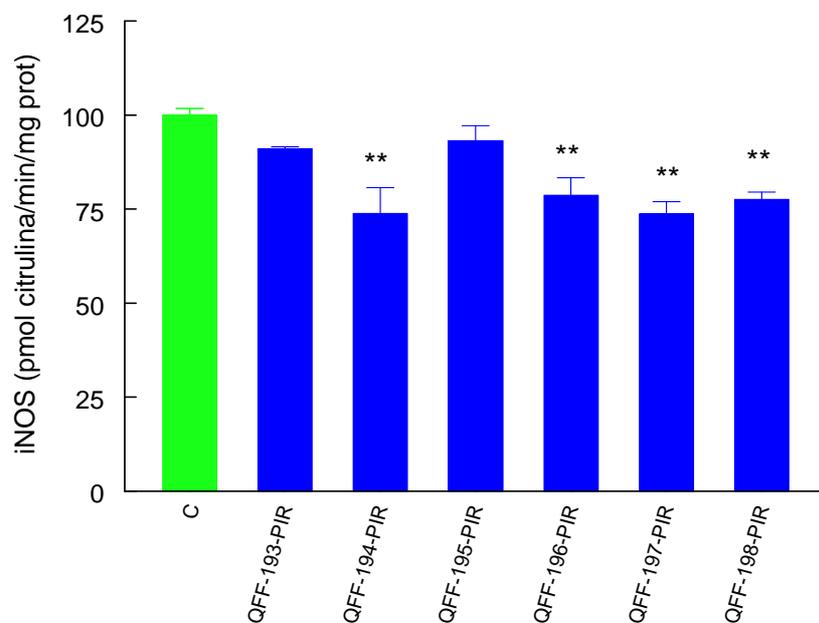


Figura 42b. Efectos del 5-(2-amino-5-metoxifenil)-1*H*-pirrol-2-carboxamida (1 mM) sobre la actividad iNOS. ** $P < 0.01$ vs control.

DERIVADOS DEL 5-(2-AMINO-5-CLOROFENIL)-1H-PIRROL-2-CARBOXAMIDA.

En la tabla 25 se representa la estructura química y los sustituyentes R de estos derivados, así como los porcentajes de inhibición sobre la nNOS e iNOS.

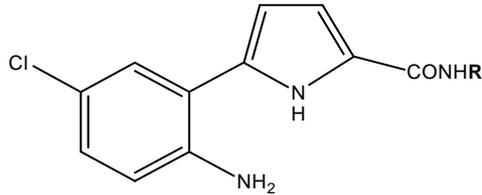
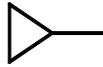


Tabla 25.

COMPUESTO	R	PM (gr mol ⁻¹)	% INHIBICIÓN nNOS	% INHIBICIÓN iNOS
QFF-199-PIR/LCLC-B.7	-H	235.669	34.48 ± 0.99	5.34 ± 2.34
QFF-200-PIR/LCLC-B.7-1	-CH ₃	249.619	17.11 ± 0.74	1.27 ± 3.39
QFF-201-PIR/LCLC-B.7-2	-CH ₂ CH ₃	263.723	33.4 ± 2.46	2.8 ± 1.75
QFF-202-PIR/LCLC-B.7-4	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	291.776	36.46 ± 4.13	3.33 ± 1.27
QFF-203-PIR/LCLC-B.7-5		275.733	48.07 ± 1.3	7.2 ± 0.31

La figura 43a muestra como todos los pirroles inhiben la actividad nNOS. La figura 43b muestra que solo el compuesto QFF-203-PIR inhibe parcialmente el componente inducible.

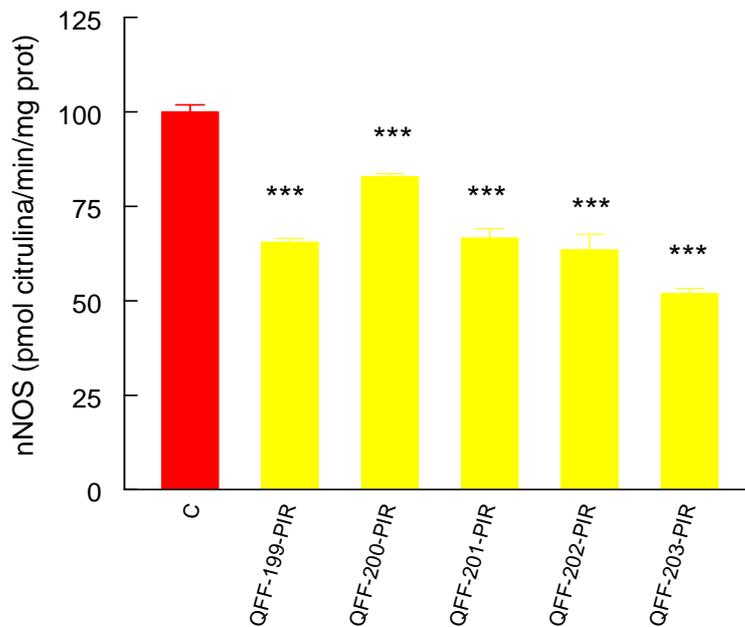


Figura 43a. Efectos del 5-(2-amino-5-clorofenil)-1H-pirrol-2-carboxamida (1 mM) sobre la actividad nNOS. *** P<0.001 vs control.

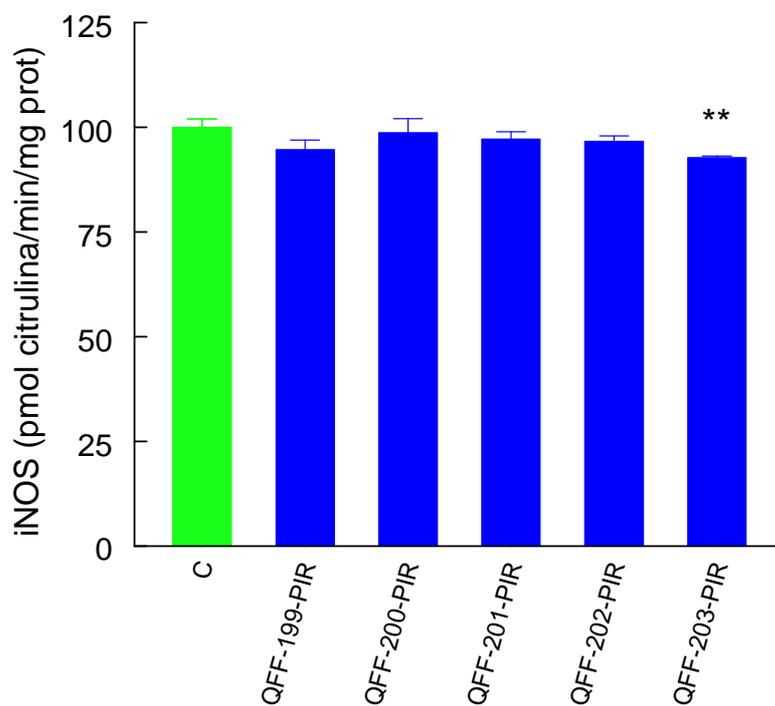


Figura 43b. Efectos del 5-(2-amino-5-clorofenil)-1*H*-pirrol-2-carboxamida (1 mM) sobre la actividad iNOS. ** $P < 0.01$ vs control.

DERIVADOS DEL 5-(2-AMINOFENIL)-1*H*-PIRROL-2-CARBOXAMIDA.

En la tabla 26 se representa la estructura química y los sustituyentes R y R₁ de estos derivados, así como los porcentajes de inhibición sobre la nNOS e iNOS.

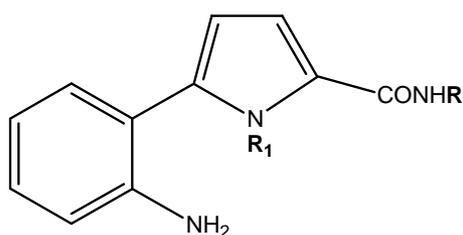


Tabla 26.

COMPUESTO	R	R ₁	PM (gr mol ⁻¹)	% INHIBICIÓN nNOS	% INHIBICIÓN iNOS
QFF-204-PIR/LCLC-A.8-6	-H		201.225	15.01 ± 2.66	3.07 ± 1.79
QFF-205-PIR/LCLCA.8-2	-CH ₃	-H	215.251	-12.79 ± 0.21	32.68 ± 2.78
QFF-206-PIR/LCLC-A.8-5	-CH ₂ CH ₃	-H	229.258	4.15 ± 0.97	20.49 ± 5.19
QFF-207-PIR/LCLC-A.8-3	-CH ₂ CH ₂ CH ₃	-H	243.304	-12.93 ± 2.17	13.17 ± 5.2
QFF-208-PIR/LCLC-A.8-1	- CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	-H	257.314	-0.01 ± 1.8	7.53 ± 2.76
QFF-209-PIR/LCLC-A.8-4	-CH ₂ Ph	-H	291.347	7.52 ± 2.5	28.11 ± 2.39
QFF-210-PIR/LCLC-A.8-7		-H	241.289	2.92 ± 0.87	-1.1 ± 1.75
QFF-211-PIR/LCLC-A.8-8		-H	255.315	8.44 ± 1.87	20.1 ± 4.78
QFF-212-PIR/LCLC-A.8-9		-H	269.342	5.36 ± 3.19	52.79 ± 1.7
QFF-213-PIR/LCLC-A.8-10		-H	285.368	13.4 ± 0.46	17.2 ± 7.54
QFF-214-PIR/LCLC-A.9-2	-H	-CH ₃	215.254	9.56 ± 1.19	15.97 ± 1.62

La figura 44a muestra los cambios en la actividad nNOS en presencia de los compuestos evaluados. Solamente QFF-209-PIR, QFF-213-PIR y QFF-214-PIR inhiben la nNOS, siendo QFF-209-PIR el de mayor porcentaje de inhibición. La figura 44b muestra los cambios en la actividad iNOS en presencia de estos pirroles. La máxima inhibición de la iNOS se alcanzó con el QFF-205-PIR y el QFF-212-PIR -KIN, mientras que QFF-207-PIR, QFF-208-PIR y QFF-211-PIR tienen un efecto inhibitorio frente a la iNOS bastante menor.

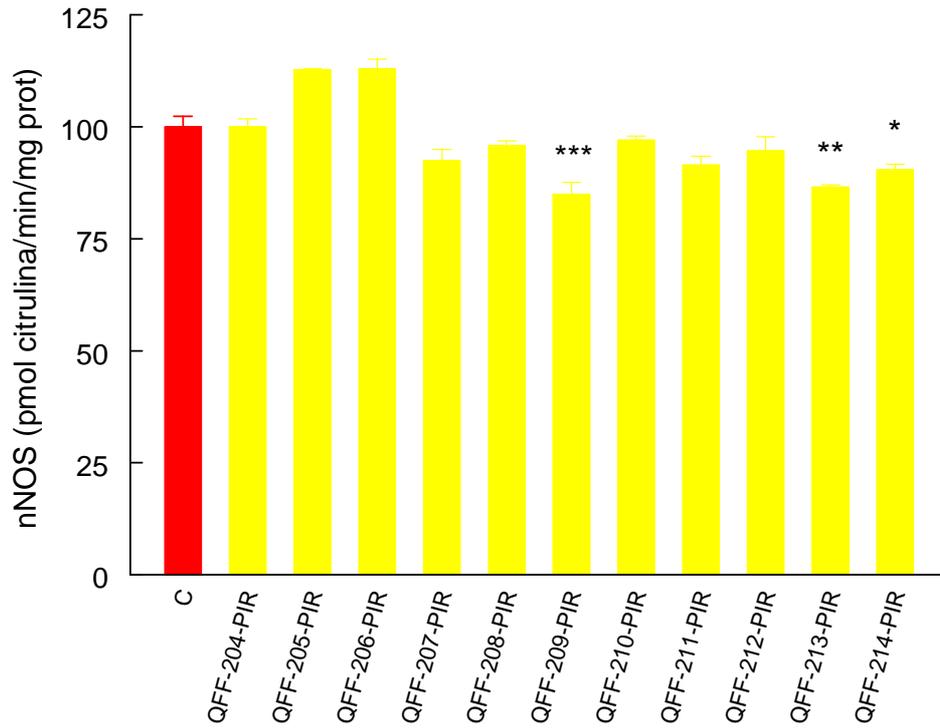


Figura 44a. Efectos del 5-(2-aminofenil)-1*H*-pirrol-2-carboxamida (1 mM) sobre la actividad nNOS. * P<0.05, ** P<0.01y *** P<0.001 vs control.

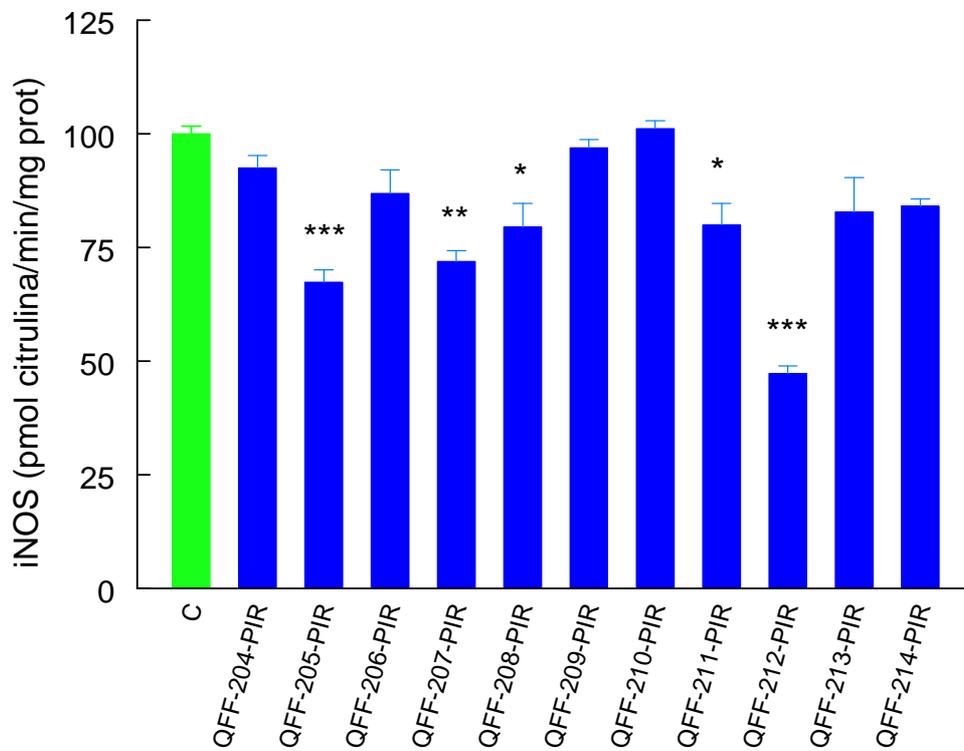


Figura 44b. Efectos del 5-(2-aminofenil)-1*H*-pirrol-2-carboxamida (1 mM) sobre la actividad iNOS. * P<0.05, ** P<0.01y *** P<0.001 vs control.

5-FENIL-1H-PIRROL-2-CARBOXAMIDA.

En la tabla 27 se representa la estructura química y los sustituyentes R y R₁ de estos derivados, así como los porcentajes de inhibición sobre la nNOS e iNOS.

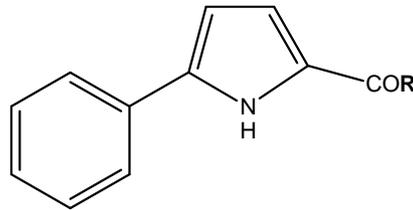


Tabla 27.

COMPUESTO	R	PM (gr mol ⁻¹)	% INHIBICIÓN nNOS	% INHIBICIÓN iNOS
QFF-215/-LCLC-A.B	-NH ₂	186.210	13.74 ± 1.47	3.32 ± 3.47

La figura 45 muestra los cambios en la actividad nNOS e iNOS en presencia de 1 mM de QFF-215. Como se puede observar, este compuesto no presenta ninguna capacidad de inhibición frente al componente constitutivo ni inducible.

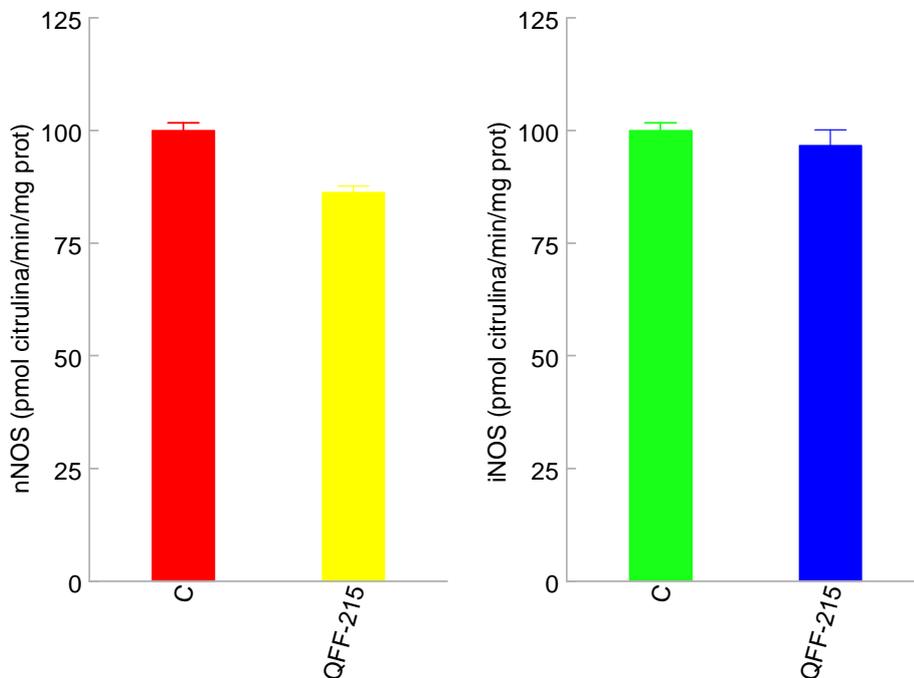


Figura 45. Efecto del 5-fenil-1H-pirrol-2-carboxamida (1 mM) sobre la actividad nNOS e iNOS.

1.5. CLASIFICACIÓN COMPUESTOS POR MAYOR GRADO DE INHIBICIÓN DE LA nNOS.

Tabla 28.

COMPUESTO	R	FAMILIA	% INHIBICIÓN nNOS	% INHIBICIÓN iNOS
QFF-133		Pirazolina	70.22 ± 2.7	14.8 ± 1.64
QFF-101	-NH ₂	Kinurenina	68.5 ± 2.21	20.44 ± 3.86
QFF-104	-CH ₃	Kinurenamina (AMK)	65.36 ± 5.6	30.9 ± 2.92
QFF-120		Pirazolina	62.24 ± 3.91	19.9 ± 2.11
QFF-123		Pirazolina	62.21 ± 2.05	13.25 ± 1.32
QFF-134		Pirazolina	61.12 ± 1.55	8.7 ± 2.18
QFF-124		Pirazolina	58.91 ± 2.04	12.18 ± 0.55
QFF-129		Pirazolina	57.06 ± 4.07	17.04 ± 2.55
QFF-117	-CH ₂ CH ₃	Pirazolina	53.27 ± 1.85	20.39 ± 1.55
QFF-127	-CH ₂ CH ₂ CH ₃	Pirazolina	52.38 ± 3.15	-1.99 ± 3.26
QFF-105	-CH ₂ CH ₃	Kinurenamina	50.87 ± 1.9	0.24 ± 1.95
QFF-122		Pirazolina	49.88 ± 2.39	1.85 ± 1.2
QFF-119	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	Pirazolina	49.74 ± 1.57	-2.18 ± 1.4
QFF-111		Kinurenamina	48.24 ± 2.42	9.24 ± 2.1
QFF-203		Pirrol	48.07 ± 1.3	7.2 ± 0.31
QFF-130	-CH ₃	Pirazolina	47.55 ± 1.83	7.73 ± 1.6
QFF-112		Kinurenamina	46.47 ± 2.36	10.86 ± 3.73
QFF-131	-CH ₂ CH ₃	Pirazolina	46.12 ± 2.46	6.88 ± 0.95
QFF-103	-NH ₂	Kinurenina	45.05 ± 1.85	31.64 ± 1.23

Tabla 29.

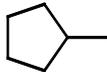
COMPUESTO	R	FAMILIA	% INHIBICIÓN nNOS	% INHIBICIÓN iNOS
QFF-110		Kinurenamina	45.04 ± 1.97	-0.61 ± 2.49
QFF-195	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	Pirrol	43.75 ± 3.38	6.78 ± 3.93
QFF-106	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	Kinurenamina	42.81 ± 1.9	7.35 ± 4.48
QFF-176	$-\text{CH}_2\text{CH}_3$	Pirazolidina	41.55 ± 2.19	14.66 ± 3.23
QFF-1	$-\text{NH}_2$	Melatonina	41.48 ± 1.14	7.21 ± 5.43
QFF-108		Kinurenamina	40.44 ± 1.84	2.66 ± 1.4
QFF-185	-H	Pirazol	40.2 ± 2.18	12.83 ± 4.57
QFF-107	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	Kinurenamina	39.68 ± 1.17	14.11 ± 0.89
QFF-190	$-\text{CH}_2\text{CH}_3$	Pirazol	39.49 ± 1.64	12.53 ± 2.12
QFF-128		Pirazolina	38.8 ± 4.24	18.89 ± 2.16
QFF-177	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	Pirazolidina	38.53 ± 3.47	10.05 ± 3.62
QFF-121		Pirazolina	38.33 ± 1.91	1.91 ± 2.1
QFF-116	$-\text{CH}_3$	Pirazolina	38.02 ± 1.39	20.39 ± 0.42
QFF-126	$-\text{CH}_2\text{CH}_3$	Pirazolina	36.46 ± 5.95	13.72 ± 2.88
QFF-202	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	Pirrol	36.46 ± 4.13	3.33 ± 1.27
QFF-187	$-\text{CH}_2\text{CH}_3$	Pirazol	35.47 ± 1.37	27.49 ± 2.1
QFF-118	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	Pirazolina	34.69 ± 1.54	13.09 ± 1.2
QFF-199	-H	Pirrol	34.48 ± 0.99	5.34 ± 2.34
QFF-132	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	Pirazolina	34.42 ± 1.61	-1.35 ± 1.75
QFF-109		Kinurenamina	33.75 ± 1.39	-6.01 ± 1.52
QFF-125	$-\text{CH}_3$	Pirazolina	33.7 ± 5.83	1.03 ± 2.31
QFF-201	$-\text{CH}_2\text{CH}_3$	Pirrol	33.4 ± 2.46	2.8 ± 1.75

Tabla 30.

COMPUESTO	R	FAMILIA	% INHIBICIÓN nNOS	% INHIBICIÓN iNOS
QFF-196		Pirrol	32.54 ± 2.63	21.36 ± 4.68
QFF-175	-H	Pirazolidina	32.14 ± 2.24	19.11 ± 0.66
QFF-180	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	Pirazolidina	29.62 ± 2.12	12.22 ± 1.43
QFF-181	$-\text{CH}_2\text{Ph}$	Pirazolidina	28.38 ± 5.78	9.39 ± 1.37
QFF-115		Kinurenamina	26.6 ± 4.52	7.2 ± 1.29
QFF-183	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	Pirazol	26.19 ± 0.89	20.49 ± 0.39
QFF-179	$-\text{CH}_2\text{CH}_3$	Pirazolidina	22.09 ± 4.36	-1.46 ± 1.72
QFF-191	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	Pirazol	21.98 ± 3.11	5.39 ± 0.89
QFF-192	$-\text{CH}_2\text{Ph}$	Pirazol	21.95 ± 0.45	13.47 ± 4.37
QFF-135	$-\text{CH}_3$	Pirazolina	21.74 ± 4.2	7.07 ± 3.52
QFF-142		Pirazolina	21.58 ± 3.48	13.16 ± 2.94
QFF-182	$-\text{CH}_2\text{CH}_3$	Pirazol	20.27 ± 0.49	24.56 ± 1.08
QFF-113	$-\text{CH}_3$	Kinurenamina	19.7 ± 0.57	17.7 ± 1.13
QFF-184	$-\text{CH}_2\text{Ph}$	Pirazol	19.38 ± 2.87	30.54 ± 0.81
QFF-178	$-\text{CH}_2\text{Ph}$	Pirazolidina	18.33 ± 0.43	17.33 ± 0.62
QFF-200	$-\text{CH}_3$	Pirrol	17.11 ± 0.74	1.27 ± 3.39
QFF-136	$-\text{CH}_2\text{CH}_3$	Pirazolina	15.35 ± 3.61	13.48 ± 3.38
QFF-197		Pirrol	15.33 ± 2.42	26.25 ± 3.22
QFF-204	-H	Pirrol	15.01 ± 2.66	3.07 ± 1.79
QFF-186	$-\text{CH}_3$	Pirazol	14.55 ± 6.19	7.32 ± 3.9
QFF-215	$-\text{NH}_2$	-	13.74 ± 1.47	3.32 ± 3.47
QFF-213		Pirrol	13.4 ± 0.46	17.2 ± 7.54

Tabla 31.

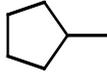
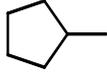
COMPUESTO	R	FAMILIA	% INHIBICIÓN nNOS	% INHIBICIÓN iNOS
QFF-138	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	Pirazolina	13.32 ± 1.71	1.47 ± 1.05
QFF-141		Pirazolina	11.63 ± 1.14	14.1 ± 1.79
QFF-137	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	Pirazolina	11.49 ± 4.08	-6.69 ± 1.82
QFF-166	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	Pirazolina	10.96 ± 4.35	5.5 ± 0.94
QFF-214	-H	Pirrol	9.56 ± 1.19	15.97 ± 1.62
QFF-174	$-\text{CH}_2\text{Ph}$	Pirazolidina	9.35 ± 1.21	10.55 ± 2.65
QFF-198	$-\text{CH}_2\text{Ph}$	Pirrol	8.89 ± 1.13	22.41 ± 1.94
QFF-211		Pirrol	8.44 ± 1.87	20.1 ± 4.78
QFF-188	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	Pirazol	7.86 ± 0.51	18.71 ± 1.01
QFF-143		Pirazolina	7.83 ± 2.24	3.09 ± 1.17
QFF-209	$-\text{CH}_2\text{Ph}$	Pirrol	7.52 ± 2.5	28.11 ± 2.39
QFF-140		Pirazolina	7.36 ± 1.18	9.47 ± 2.22
QFF-139		Pirazolina	7.07 ± 2.33	-6.55 ± 1.7
QFF-168	$-\text{CH}_3$	Pirazolina	6.12 ± 3.11	22.66 ± 6.07
QFF-157		Pirazolina	5.49 ± 0.34	21.8 ± 5.92
QFF-154	$-\text{CH}_2\text{CH}_3$	Pirazolina	5.41 ± 2.75	11.84 ± 3.72
QFF-114		Kinurenamina	5.37 ± 2.59	9.66 ± 4.17
QFF-212		Pirrol	5.36 ± 3.19	52.79 ± 1.7
QFF-148		Pirazolina	4.71 ± 1.33	22.33 ± 2.25

Tabla 32.

COMPUESTO	R	FAMILIA	% INHIBICIÓN nNOS	% INHIBICIÓN iNOS
QFF-147	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	Pirazolina	4.57 ± 3.21	8.86 ± 7.39
QFF-160		Pirazolina	4.32 ± 4.49	25.46 ± 1.22
QFF-100	-H	Kinurenina	4.26 ± 0.53	34.39 ± 0.34
QFF-206	$-\text{CH}_2\text{CH}_3$	-H	4.15 ± 0.97	20.49 ± 5.19
QFF-145	$-\text{CH}_2\text{CH}_3$	Pirazolina	3.9 ± 5.29	21.14 ± 3.10
QF-169		Pirazolina	3.89 ± 4.94	20.22 ± 3.96
QFF-146	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	Pirazolina	3.71 ± 3.53	12.9 ± 4.13
QFF-210		Pirrol	2.92 ± 0.87	-1.1 ± 1.75
QFF-189	$-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$	Pirazol	2.69 ± 1.37	50.36 ± 3.19
QFF-165	$-\text{CH}_3$	Pirazolina	2.67 ± 3.33	18.46 ± 2.98
QFF-144	$-\text{CH}_3$	Pirazolina	2.37 ± 3.68	23.88 ± 3.02
QFF-172	$-\text{CH}_2\text{CH}_3$	Pirazolidina	1.68 ± 2.7	17.11 ± 0.75
QFF-164	-Cl	Pirazolina	1.33 ± 2.32	22.93 ± 0.92
QFF-150		Pirazolina	0.62 ± 4.67	20.15 ± 2.72
QFF-208	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	Pirrol	-0.01 ± 1.8	7.53 ± 2.76
QFF-156	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	Pirazolina	-0.27 ± 0.53	9.38 ± 3.4
QFF-159		Pirazolina	-0.33 ± 0.75	23.31 ± 3.14
QFF-153	$-\text{CH}_3$	Pirazolina	-0.43 ± 0.74	17.15 ± 1.94
QFF-149		Pirazolina	-0.49 ± 3.45	19.17 ± 5.25
QFF-152		Pirazolina	-0.94 ± 5.59	31.45 ± 2.02

Tabla 33.

COMPUESTO	R	FAMILIA	% INHIBICIÓN nNOS	% INHIBICIÓN iNOS
QFF-151		Pirazolina	-1.22 ± 5.92	4.94 ± 1.37
QFF-171		Pirazolidina	-3.48 ± 2.35	22.05 ± 4.19
QFF-161		Pirazolina	-3.61 ± 1.01	32.43 ± 0.51
QFF-167		Pirazolina	-4.72 ± 3.12	21.64 ± 1.96
QFF-155	-CH ₂ CH ₂ CH ₃	Pirazolina	-4.9 ± 2.66	22.09 ± 1.26
QFF-158		Pirazolina	-4.96 ± 7.4	21.51 ± 3.7
QFF-102	-H	Kinurenina	-5.32 ± 1.18	34.07 ± 1.05
QFF-162	-OCH ₃	Pirazolina	-7.85 ± 4.03	0.64 ± 4.05
QFF-163	-H	Pirazolina	-9.8 ± 2.99	12.72 ± 5.24
QFF-173	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	Pirazolidina	-9.98 ± 2.32	18.61 ± 1.24
QFF-205	-CH ₃	Pirrol	-12.79 ± 0.21	32.68 ± 2.78
QFF-207	-CH ₂ CH ₂ CH ₃	Pirrol	-12.93 ± 2.17	13.17 ± 5.2
QFF-170	-CH ₂ CH ₃	Pirazolidina	-15.59 ± 4.39	23.93 ± 4.21
QFF-193	-H	Pirrol	-18.14 ± 2.01	8.95 ± 0.5
QFF-194	-CH ₃	Pirrol	-47.97 ± 2.6	26.17 ± 6.85

1.6 CLASIFICACIÓN COMPUESTOS POR MAYOR GRADO DE INHIBICIÓN DE LA iNOS.

Tabla 34.

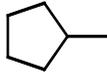
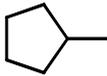
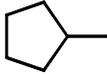
COMPUESTO	R	FAMILIA	% INHIBICIÓN nNOS	% INHIBICIÓN iNOS
QFF-212		Pirrol	5.36 ± 3.19	52.79 ± 1.7
QFF-189	-CH ₂ C ₆ H ₅	Pirazol	2.69 ± 1.37	50.36 ± 3.19
QFF-100	-H	Kinurenina	4.26 ± 0.53	34.39 ± 0.34
QFF-102	-H	Kinurenina	-5.32 ± 1.18	34.07 ± 1.05
QFF-205	-CH ₃	Pirrol	-12.79 ± 0.21	32.68 ± 2.78
QFF-161		Pirazolina	-3.61 ± 1.01	32.43 ± 0.51
QFF-103	-NH ₂	Kinurenina	45.05 ± 1.85	31.64 ± 1.23
QFF-152		Pirazolina	-0.94 ± 5.59	31.45 ± 2.02
QFF-104	-CH ₃	Kinurenamina (AMK)	65.36 ± 5.6	30.9 ± 2.92
QFF-184	-CH ₂ Ph	Pirazol	19.38 ± 2.87	30.54 ± 0.81
QFF-209	-CH ₂ Ph	Pirrol	7.52 ± 2.5	28.11 ± 2.39
QFF-187	-CH ₂ CH ₃	Pirazol	35.47 ± 1.37	27.49 ± 2.1
QFF-197		Pirrol	15.33 ± 2.42	26.25 ± 3.22
QFF-194	-CH ₃	Pirrol	-47.97 ± 2.6	26.17 ± 6.85
QFF-160		Pirazolina	4.32 ± 4.49	25.46 ± 1.22
QFF-182	-CH ₂ CH ₃	Pirazol	20.27 ± 0.49	24.56 ± 1.08
QFF-170	-CH ₂ CH ₃	Pirazolidina	-15.59 ± 4.39	23.93 ± 4.21
QFF-144	-CH ₃	Pirazolina	2.37 ± 3.68	23.88 ± 3.02
QFF-159		Pirazolina	-0.33 ± 0.75	23.31 ± 3.14
QFF-164	-Cl	Pirazolina	1.33 ± 2.32	22.93 ± 0.92
QFF-168	-CH ₃	Pirazolina	6.12 ± 3.11	22.66 ± 6.07

Tabla 35.

COMPUESTO	R	FAMILIA	% INHIBICIÓN nNOS	% INHIBICIÓN iNOS
QFF-198	-CH ₂ Ph	Pirrol	8.89 ± 1.13	22.41 ± 1.94
QFF-148		Pirazolina	4.71 ± 1.33	22.33 ± 2.25
QFF-155	-CH ₂ CH ₂ CH ₃	Pirazolina	-4.9 ± 2.66	22.09 ± 1.26
QFF-171		Pirazolidina	-3.48 ± 2.35	22.05 ± 4.19
QFF-157		Pirazolina	5.49 ± 0.34	21.8 ± 5.92
QFF-167		Pirazolina	-4.72 ± 3.12	21.64 ± 1.96
QFF-158		Pirazolina	-4.96 ± 7.4	21.51 ± 3.7
QFF-196		Pirrol	32.54 ± 2.63	21.36 ± 4.68
QFF-145	-CH ₂ CH ₃	Pirazolina	3.9 ± 5.29	21.14 ± 3.10
QFF-183	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	Pirazol	26.19 ± 0.89	20.49 ± 0.39
QFF-206	-CH ₂ CH ₃	Pirrol	4.15 ± 0.97	20.49 ± 5.19
QFF-101	-NH ₂	Kinurenina	68.5 ± 2.21	20.44 ± 3.86
QFF-116	-CH ₃	Pirazolina	38.02 ± 1.39	20.39 ± 0.42
QFF-117	-CH ₂ CH ₃	Pirazolina	53.27 ± 1.85	20.39 ± 1.55
QFF-169		Pirazolina	3.89 ± 4.94	20.22 ± 3.96
QFF-150		Pirazolina	0.62 ± 4.67	20.15 ± 2.72
QFF-211		Pirrol	8.44 ± 1.87	20.1 ± 4.78
QFF-120		Pirazolina	62.24 ± 3.91	19.9 ± 2.11

Tabla 36.

COMPUESTO	R	FAMILIA	% INHIBICIÓN nNOS	% INHIBICIÓN iNOS
QFF-149		Pirazolina	-0.49 ± 3.45	19.17 ± 5.25
QFF-175	-H	Pirazolidina	32.14 ± 2.24	19.11 ± 0.66
QFF-128		Pirazolina	38.8 ± 4.24	18.89 ± 2.16
QFF-188	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	Pirazol	7.86 ± 0.51	18.71 ± 1.01
QFF-173	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	Pirazolidina	-9.98 ± 2.32	18.61 ± 1.24
QFF-165	-CH ₃	Pirazolina	2.67 ± 3.33	18.46 ± 2.98
QFF-113	-CH ₃	Kinurenamina	19.7 ± 0.57	17.7 ± 1.13
QFF-178	-CH ₂ Ph	Pirazolidina	18.33 ± 0.43	17.33 ± 0.62
QFF-213		Pirrol	13.4 ± 0.46	17.2 ± 7.54
QFF-153	-CH ₃	Pirazolina	-0.43 ± 0.74	17.15 ± 1.94
QFF-172	-CH ₂ CH ₃	Pirazolidina	1.68 ± 2.7	17.11 ± 0.75
QFF-129		Pirazolina	57.06 ± 4.07	17.04 ± 2.55
QFF-214	-H	Pirrol	9.56 ± 1.19	15.97 ± 1.62
QFF-133		Pirazolina	70.22 ± 2.7	14.8 ± 1.64
QFF-176	-CH ₂ CH ₃	Pirazolidina	41.55 ± 2.19	14.66 ± 3.23
QFF-107	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	Kinurenamina	39.68 ± 1.17	14.11 ± 0.89
QFF-141		Pirazolina	11.63 ± 1.14	14.1 ± 1.79
QFF-126	-CH ₂ CH ₃	Pirazolina	36.46 ± 5.95	13.72 ± 2.88
QFF-136	-CH ₂ CH ₃	Pirazolina	15.35 ± 3.61	13.48 ± 3.38
QFF-192	-CH ₂ Ph	Pirazol	21.95 ± 0.45	13.47 ± 4.37

Tabla 37.

COMPUESTO	R	FAMILIA	% INHIBICIÓN nNOS	% INHIBICIÓN iNOS
QFF-123		Pirazolina	62.21 ± 2.05	13.25 ± 1.32
QFF-207	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	Pirrol	-12.93 ± 2.17	13.17 ± 5.2
QFF-142		Pirazolina	21.58 ± 3.48	13.16 ± 2.94
QFF-118	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	Pirazolina	34.69 ± 1.54	13.09 ± 1.2
QFF-146	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	Pirazolina	3.71 ± 3.53	12.9 ± 4.13
QFF-185	-H	Pirazol	40.2 ± 2.18	12.83 ± 4.57
QFF-163	-H	Pirazolina	-9.8 ± 2.99	12.72 ± 5.24
QFF-190	$-\text{CH}_2\text{CH}_3$	Pirazol	39.49 ± 1.64	12.53 ± 2.12
QFF-180	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	Pirazolidina	29.62 ± 2.12	12.22 ± 1.43
QFF-124		Pirazolina	58.91 ± 2.04	12.18 ± 0.55
QFF-154	$-\text{CH}_2\text{CH}_3$	Pirazolina	5.41 ± 2.75	11.84 ± 3.72
QFF-112		Kinurenamina	46.47 ± 2.36	10.86 ± 3.73
QFF-174	$-\text{CH}_2\text{Ph}$	Pirazolidina	9.35 ± 1.21	10.55 ± 2.65
QFF-177	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	Pirazolidina	38.53 ± 3.47	10.05 ± 3.62
QFF-114		Kinurenamina	5.37 ± 2.59	9.66 ± 4.17
QFF-140		Pirazolina	7.36 ± 1.18	9.47 ± 2.22
QFF-181	$-\text{CH}_2\text{Ph}$	Pirazolidina	28.38 ± 5.78	9.39 ± 1.37
QFF-156	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	Pirazolina	-0.27 ± 0.53	9.38 ± 3.4
QFF-111		Kinurenamina	48.24 ± 2.42	9.24 ± 2.1
QFF-193	-H	Pirrol	-18.14 ± 2.01	8.95 ± 0.5

Tabla 38.

COMPUESTO	R	FAMILIA	% INHIBICIÓN nNOS	% INHIBICIÓN iNOS
QFF-147	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	Pirazolina	4.57 ± 3.21	8.86 ± 7.39
QFF-134		Pirazolina	61.12 ± 1.55	8.7 ± 2.18
QFF-130	$-\text{CH}_3$	Pirazolina	47.55 ± 1.83	7.73 ± 1.6
QFF-208	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	Pirrol	-0.01 ± 1.8	7.53 ± 2.76
QFF-106	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	Kinurenamina	42.81 ± 1.9	7.35 ± 4.48
QFF-186	$-\text{CH}_3$	Pirazol	14.55 ± 6.19	7.32 ± 3.9
QFF-1	$-\text{NH}_2$	Melatonina	41.48 ± 1.14	7.21 ± 5.43
QFF-115		Kinurenamina	26.6 ± 4.52	7.2 ± 1.29
QFF-203		Pirrol	48.07 ± 1.3	7.2 ± 0.31
QFF-135	$-\text{CH}_3$	Pirazolina	21.74 ± 4.2	7.07 ± 3.52
QFF-131	$-\text{CH}_2\text{CH}_3$	Pirazolina	46.12 ± 2.46	6.88 ± 0.95
QFF-195	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	Pirrol	43.75 ± 3.38	6.78 ± 3.93
QFF-166	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	Pirazolina	10.96 ± 4.35	5.5 ± 0.94
QFF-191	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	Pirrol	21.98 ± 3.11	5.39 ± 0.89
QFF-199	$-\text{H}$	Pirrol	34.48 ± 0.99	5.34 ± 2.34
QFF-151		Pirazolina	-1.22 ± 5.92	4.94 ± 1.37
QFF-202	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	Pirrol	36.46 ± 4.13	3.33 ± 1.27
QFF-215	$-\text{NH}_2$	Pirrol	13.74 ± 1.47	3.32 ± 3.47
QFF-143		Pirazolina	7.83 ± 2.24	3.09 ± 1.17
QFF-204	$-\text{H}$	Pirrol	15.01 ± 2.66	3.07 ± 1.79
QFF-201	$-\text{CH}_2\text{CH}_3$	Pirrol	33.4 ± 2.46	2.8 ± 1.75
QFF-108		Kinurenamina	40.44 ± 1.84	2.66 ± 1.4

Tabla 39.

COMPUESTO	R	FAMILIA	% INHIBICIÓN nNOS	% INHIBICIÓN iNOS
QFF-121		Pirazolina	38.33 ± 1.91	1.91 ± 2.1
QFF-122		Pirazolina	49.88 ± 2.39	1.85 ± 1.2
QFF-138	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	Pirazolina	13.32 ± 1.71	1.47 ± 1.05
QFF-200	$-\text{CH}_3$	Pirrol	17.11 ± 0.74	1.27 ± 3.39
QFF-125	$-\text{CH}_3$	Pirazolina	33.7 ± 5.83	1.03 ± 2.31
QFF-162	$-\text{OCH}_3$	Pirazolina	-7.85 ± 4.03	0.64 ± 4.05
QFF-105	$-\text{CH}_2\text{CH}_3$	Kinurenamina	50.87 ± 1.9	0.24 ± 1.95
QFF-110		Kinurenamina	45.04 ± 1.97	-0.61 ± 2.49
QFF-210		Pirrol	2.92 ± 0.87	-1.1 ± 1.75
QFF-132	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	Pirazolina	34.42 ± 1.61	-1.35 ± 1.75
QFF-179	$-\text{CH}_2\text{CH}_3$	Pirazolidina	22.09 ± 4.36	-1.46 ± 1.72
QFF-127	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	Pirazolina	52.38 ± 3.15	-1.99 ± 3.26
QFF-119	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	Pirazolina	49.74 ± 1.57	-2.18 ± 1.4
QFF-109		Kinurenamina	33.75 ± 1.39	-6.01 ± 1.52
QFF-139		Pirazolina	7.07 ± 2.33	-6.55 ± 1.7
QFF-137	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	Pirazolina	11.49 ± 4.08	-6.69 ± 1.82

2. RESULTADOS 'IN VIVO'

La producción de NO^{*} en la EP, así como el daño producido en la CTE pueden provocar un incremento del estrés oxidativo mitocondrial, dañándose los componentes mitocondriales como proteínas, lípidos y ADN. Para comprobar esta hipótesis, hemos analizado distintos parámetros relacionados, como son la actividad del complejo I de la CTE, la actividad del enzima NOS (tanto citosólica como mitocondrial), la producción de NO^{*} (nitritos) y el estrés oxidativo, concretamente la oxidación de los lípidos de membrana (LPO). En la tabla 40 se muestran los compuestos seleccionados para el estudio *'in vivo'*, que se corresponden con aquellos que presentan un mayor grado de inhibición de ambos componentes de la NOS, especialmente el inducible.

Tabla 40.

COMPUESTO	FAMILIA	% INHIBICIÓN nNOS	% INHIBICIÓN iNOS
QFF-1 (aMT)	INDOLAMINA	41.48 ± 1.14	7.21 ± 5.43
QFF-100-KI	KINURENINA	4.26 ± 0.53	34.39 ± 0.34
QFF-101-KI	KINURENINA	68.5 ± 2.21	20.44 ± 3.86
QFF-102-KI	KINURENINA	-5.32 ± 1.18	34.07 ± 1.05
QFF-103-KI	KINURENINA	45.05 ± 1.85	31.64 ± 1.23
QFF-104-KIN	KINURENAMINA	65.36 ± 5.6	30.9 ± 2.92
QFF-108-KIN	KINURENAMINA	40.44 ± 1.84	2.66 ± 1.4
QFF-111-KIN	KINURENAMINA	48.24 ± 2.42	9.24 ± 2.1
QFF-118-PI	PIRAZOLINA	34.69 ± 1.54	13.09 ± 1.2
QFF-205-PIR	PIRROL	-12.79 ± 0.21	32.68 ± 2.78
QFF-212-PIR	PIRROL	5.36 ± 3.19	52.79 ± 1.7

2.1.- Actividad del complejo I de la CTE.

2.1.1. Kinureninas.

Para los estudios *in vivo*, se han evaluado las kinureninas descritas anteriormente en la tabla 30, comparando su efecto con el de la aMT.

La administración de MPTP (15 mg/kg cada dosis) inhibe la actividad del complejo I en la SN (9.95 ± 0.49 versus 5.17 ± 0.54 nmol/min/mg prot, $P < 0.01$) y ST (7.87 ± 0.4 versus 5.59 ± 0.4 nmol/min/mg prot, $P < 0.01$) de ratones C57/Bl6. El porcentaje de inhibición del complejo I producido por el MPTP es significativamente mayor en la SN que en el ST (28.9% versus 48.04%, $P < 0.001$) (figura 46). Los efectos generados por el MPTP son contrarrestados por la aMT y todas las kinureninas, QFF-100-KI, QFF-101-KI, QFF-102-KI y QFF-103-KI, (aunque la aMT lo hace de forma más significativa respecto a las kinureninas), que actúan recuperando los valores controles, principalmente en la SN (13.99 ± 0.14 , 10.72 ± 0.49 , 10.05 ± 0.33 nmol/min/mg prot, $P < 0.001$ y 9.07 ± 0.22 , 10.37 ± 0.55 nmol/min/mg prot respectivamente, $P < 0.01$) y en menor proporción en el ST (9.41 ± 0.47 , 11.88 ± 0.3 , 7.4 ± 0.14 nmol/min/mg prot, $P < 0.001$ y 8.64 ± 0.24 , 7.25 ± 0.03 nmol/min/mg prot, $P < 0.01$) (figura 46).

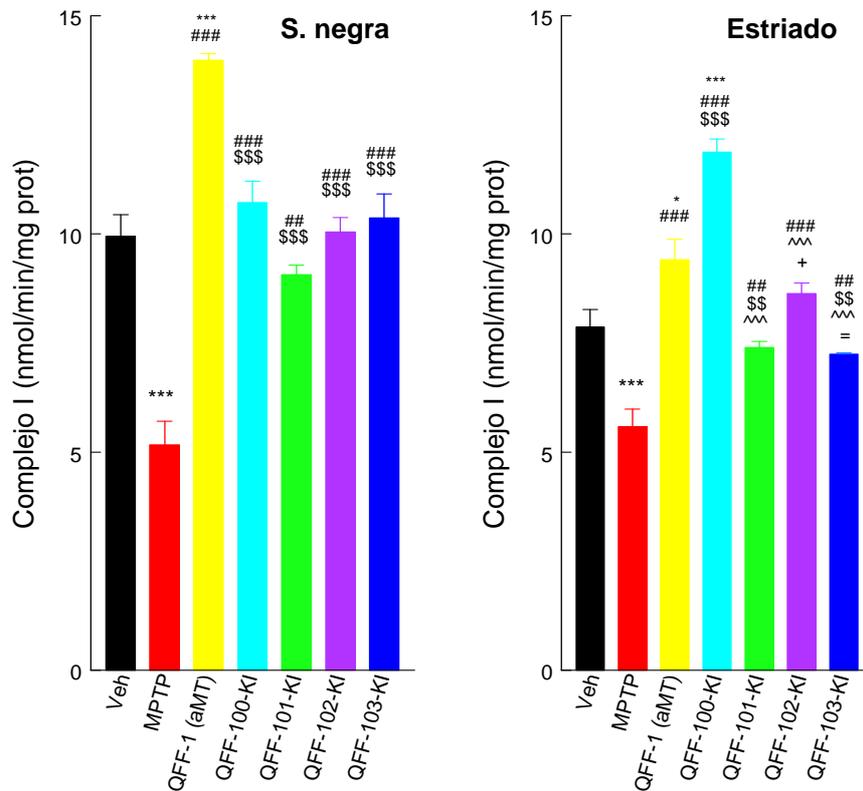


Figura 46. Cambios en la actividad del complejo I de la CTE según las distintas kinureninas, tanto en la SN como en el ST de ratones C57/Bl6. Los datos se corresponden a la media ± EE de 2 animales por grupo, por triplicado cada experimento. * $P < 0.05$ y *** $P < 0.001$ vs control; ## $P < 0.01$ y ### $P < 0.001$ vs MPTP; \$\$ $P < 0.01$ y \$\$\$ $P < 0.001$ vs QFF-1; ^^ $P < 0.001$ vs QFF-100; + $P < 0.05$ vs QFF-101; = $P < 0.05$ vs QFF-102.

2.1.2. Kinurenaminas.

Para los estudios *'in vivo'*, se han evaluado las kinurenaminas descritas anteriormente en la tabla 30, comparando su efecto con el de la aMT.

En la figura 47 observamos que los efectos debidos al MPTP son contrarrestados por las kinurenaminas, restableciendo los valores controles, fundamentalmente en la SN (13.86 ± 0.24 , 9.67 ± 0.24 y 9.24 ± 0.27 nmol/min/mg prot respectivamente, $P < 0.001$) y en menor proporción en el ST (8.33 ± 0.1 , 7.77 ± 0.45 y 7.66 ± 0.16 nmol/min/mg prot, $P < 0.01$). Cabe destacar que el compuesto QFF-104 AMK, metabolito de la aMT, presenta unos valores muy similares a la aMT, recuperando la actividad del complejo I por encima de los valores controles, especialmente en la SN.

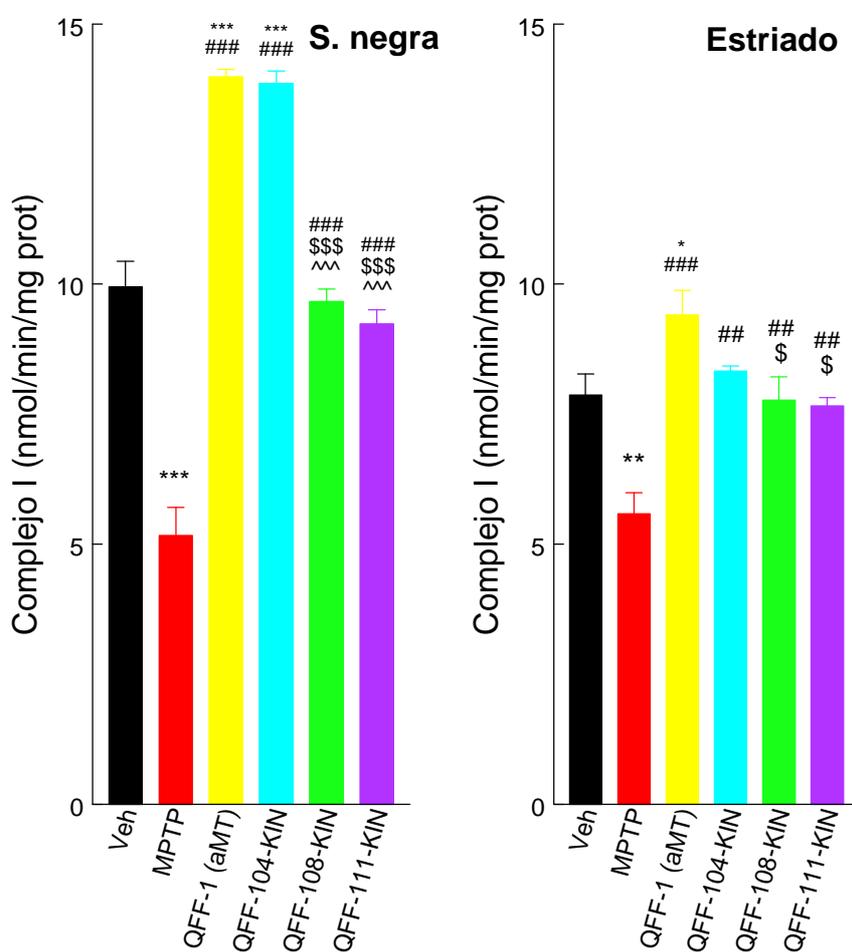


Figura 47. Cambios en la actividad del complejo I de la CTE según las distintas kinurenaminas, tanto en la SN como en el ST de ratones C57/Bl6. Los datos se corresponden a la media \pm EE de 2 animales por grupo, por triplicado cada experimento. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ vs control; ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs MPTP; \$ $P < 0.01$ y \$\$\$ $P < 0.001$ vs QFF-1; ^^^ $P < 0.001$ vs QFF-104.

2.1.3. Pirazolinas.

Para los estudios *'in vivo'*, se han evaluado las pirazolinas descritas anteriormente en la tabla 30, comparando su efecto con el de la aMT.

Este tipo de compuestos, recuperan la actividad del complejo I reducida por el tratamiento con la neurotoxina. Como la gráfica indica, el efecto de QFF-118-PI es prácticamente igual al de la aMT en la SN (14.07 ± 0.1 nmol/min/mg prot, $P < 0.001$), siendo incluso más significativo en el ST (10.86 ± 0.36 nmol/min/mg prot, $P < 0.001$) (figura 48).

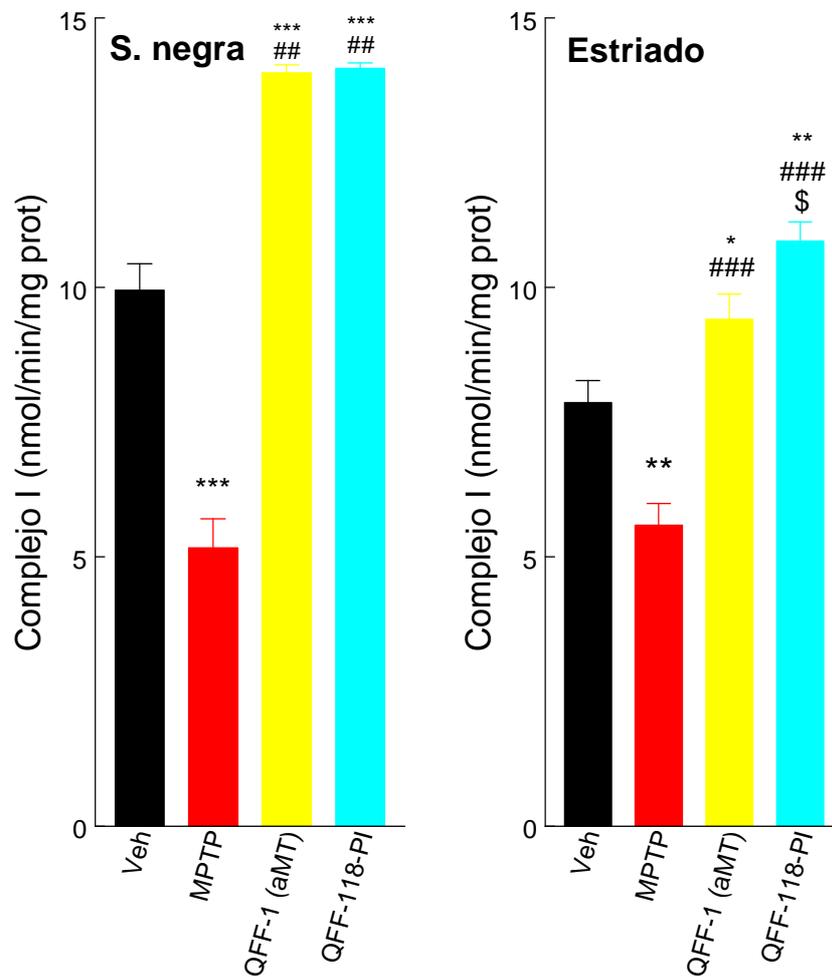


Figura 48. Cambios en la actividad del complejo I de la CTE según la pirazolina, tanto en la SN como en el ST de ratones C57/Bl6. Los datos se corresponden a la media \pm EE de 2 animales por grupo, por triplicado cada experimento. ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ vs control; ### $P < 0.001$ vs MPTP; \$ $P < 0.05$ vs QFF-1.

2.1.4. Pirroles.

Para los estudios *'in vivo'*, se han evaluado los pirroles descritos anteriormente en la tabla 30, comparando su efecto con el de la aMT.

El uso de pirroles durante el tratamiento con MPTP son también efectivos para contrarrestar los efectos tóxicos de dicha neurotoxina. En el caso de la SN, los pirroles presentan menor efectividad que la aMT, más aún recuperan la actividad del complejo I a nivel de los valores controles (9.63 ± 0.39 y 11.87 ± 0.28 nmol/min/mg prot respectivamente, $P < 0.001$); en el ST, estos compuestos QFF-205-PIR y QFF-212-PIR presentan una recuperación algo menor que la aMT, restableciendo los valores controles (8.36 ± 0.61 y 8.53 ± 0.26 nmol/min/mg prot, $P < 0.01$) (figura 49).

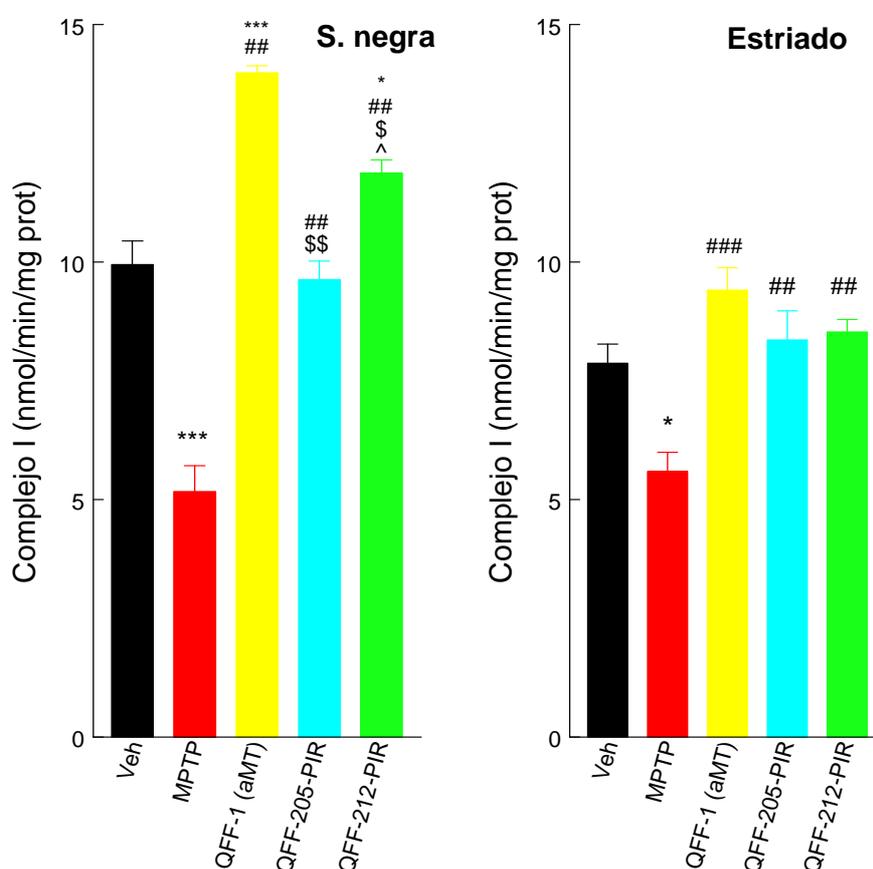


Figura 49. Cambios en la actividad del complejo I de la CTE según los distintos pirroles, tanto en la SN como en el ST de ratones C57/Bl6. Los datos se corresponden a la media \pm EE de 2 animales por grupo, por triplicado cada experimento. * $P < 0.05$ y *** $P < 0.001$ vs control; ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs MPTP; \$ $P < 0.01$ y \$\$\$ $P < 0.001$ vs QFF-1; ^ $P < 0.05$ vs QFF-205.

2.2.- Actividad de la NOS en citosol y mitocondria de SN y ST.

2.2.1. Kinureninas.

En el citosol (figura 50, izquierda) la iNOS es prácticamente indetectable en ratones control, pero tras el tratamiento con MPTP aumenta de forma significativa, fundamentalmente en la SN (29.37 ± 0.68 versus 2.82 ± 0.09 pmol/min/mg prot, $P < 0.001$). La administración de aMT y de las kinureninas reduce significativamente la actividad iNOS estimulada por el MPTP, especialmente los compuestos QFF-102-KI y QFF-103-KI (3.41 ± 0.68 y 4.16 ± 0.13 pmol/min/mg prot, respectivamente, $P < 0.001$). Por otro lado, la neurotoxina reduce significativamente la actividad nNOS en el citosol de la SN (95.44 ± 0.86 versus 83.65 ± 0.37 pmol/min/mg prot, $P < 0.05$); pero la administración de aMT y de los compuestos QFF-100-KI, QFF-101-KI y QFF-103-KI reducen la actividad nNOS (19.91 ± 1.93 , 21.44 ± 0.6 , 15.1 ± 2.48 y 52.87 ± 0.71 pmol/min/mg prot respectivamente, $P < 0.001$). Curiosamente, el dato más significativo es que el compuesto QFF-102-KI se comporta como un agonista de la actividad nNOS (246.62 ± 0.05 pmol/min/mg prot, $P < 0.001$).

Cuando medimos la actividad NOS en fracciones mitocondriales puras, detectamos dos actividades diferentes, correspondientes a una isoforma constitutiva, Ca^{2+} -dependiente (mtNOS) y a una isoforma inducible, Ca^{2+} -independiente (i-mtNOS) (figura 50, derecha). El MPTP conlleva a un incremento de la actividad i-mtNOS (22.08 ± 0.12 versus 43.75 ± 0.97 pmol/min/mg prot, $P < 0.001$), mientras que el tratamiento con aMT y con las kinureninas QFF-100-KI y QFF-101-KI normaliza la actividad i-mtNOS (23.6 ± 2.18 , 18.35 ± 1.38 y 24.39 ± 1.46 pmol/min/mg prot respectivamente, $P < 0.001$). Por su parte, los compuestos QFF-102-KI y QFF-103-KI reducen significativamente esta actividad (10.14 ± 0.53 y 14.51 ± 2.27 pmol/min/mg prot respectivamente, $P < 0.001$). Sin embargo, la mtNOS no se ve afectada por el tratamiento con MPTP (28.64 ± 0.62 versus 25.86 ± 0.54 pmol/min/mg prot). La administración de aMT y de las kinureninas, incluido el compuesto QFF-102-KI, reducen la actividad mtNOS (13.75 ± 0.32 , 14.52 ± 1.48 , 15.72 ± 1.08 , 16.98 ± 2.43 y 14.04 ± 1.7 pmol/min/mg prot respectivamente, $P < 0.01$).

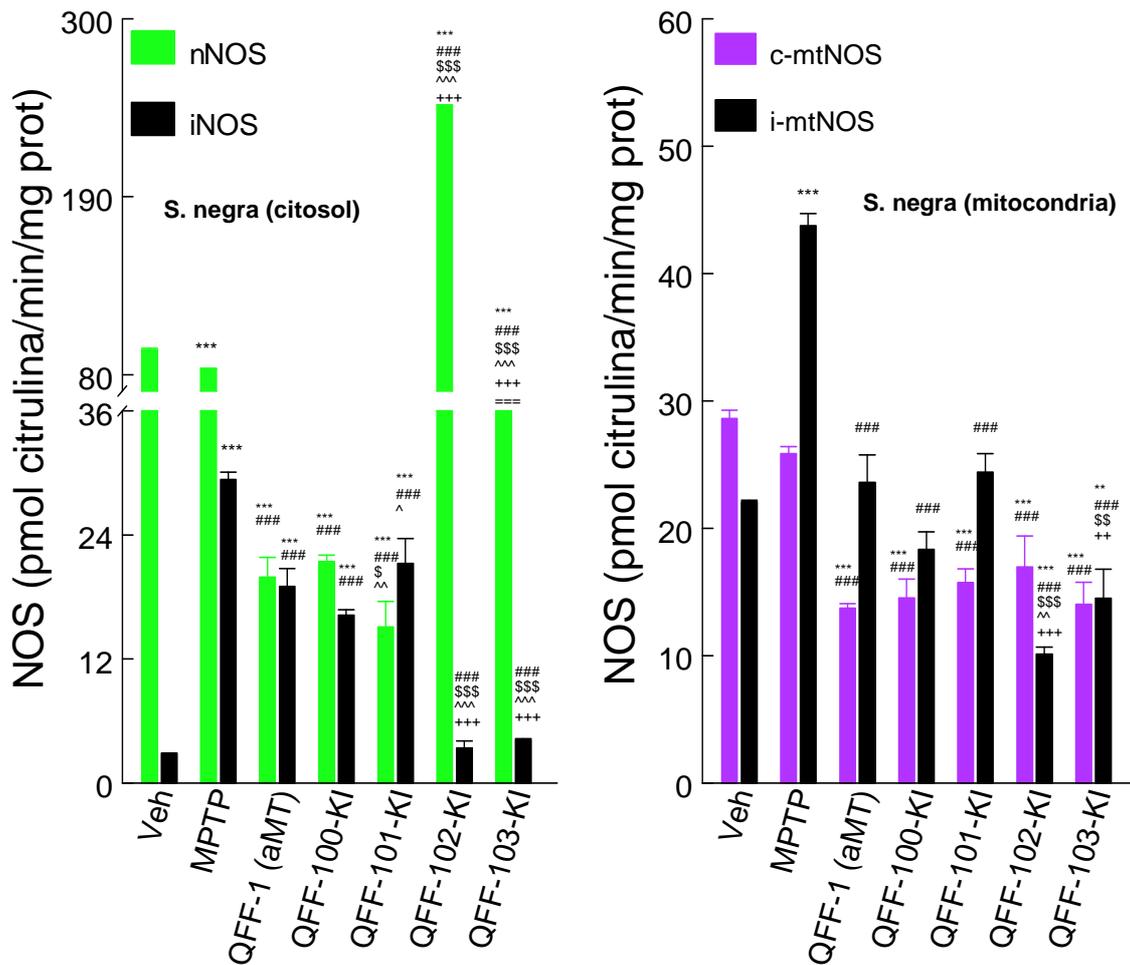


Figura 50. Cambios en la actividad de los componentes constitutivo e inducible de la NOS según las distintas kinureninas, tanto en el citosol como en la mitocondria de la SN de ratones C57/BI6. Los datos se corresponden a la media \pm EE de 7 animales por grupo, por triplicado cada experimento. ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ vs control; ### $P < 0.001$ vs MPTP; \$ $P < 0.05$, \$\$ $P < 0.01$ y \$\$\$ $P < 0.001$ vs QFF-1; ^ $P < 0.05$, ^^ $P < 0.01$ y ^^ $P < 0.001$ vs QFF-100; ++ $P < 0.01$ y +++ $P < 0.001$ vs QFF-101; === $P < 0.05$ vs QFF-102.

La figura 51 muestra la actividad NOS en el citosol y en la mitocondria del ST de ratones C57/BI6. Ni el MPTP ni el tratamiento con aMT y/o kinureninas modifican la actividad iNOS citosólica (Veh, 3.80 ± 0.28 ; MPTP, 6.35 ± 0.19 ; aMT, 5.66 ± 0.86 ; QFF-100-KI, 4.91 ± 0.31 ; QFF-101-KI, 3.13 ± 0.33 ; QFF-102-KI, 2.52 ± 0.2 y QFF-103-KI, 1.73 ± 0.4 pmol/min/mg prot). Pero el tratamiento con MPTP produce un incremento significativo en la actividad nNOS citosólica (85.68 ± 0.32 versus 92.31 ± 0.26 pmol/min/mg prot, $P < 0.05$), la cual se ve reducida significativamente después de la administración de aMT y de los compuestos QFF-100-KI, QFF-101-KI y QFF-103-KI (30.48 ± 1.88 , 48.31 ± 1.22 , 26.13 ± 1.22 y 73.62 ± 1.22 pmol/min/mg prot respectivamente, $P < 0.001$) por debajo de los valores control (figura 51, izquierda). De nuevo, el compuesto QFF-102-KI aumenta la actividad nNOS (207.15 ± 2.74 pmol/min/mg prot, $P < 0.001$).

En las mitocondrias estriatales, el MPTP induce un aumento en la actividad i-mtNOS (18.19 ± 0.48 versus 25.98 ± 0.17 pmol/min/mg prot, $P < 0.01$), el cual es contrarrestado tanto por la administración de aMT como por las diferentes kinureninas indicadas en la tabla 30 (19.83 ± 1.61 pmol/min/mg prot, $P < 0.05$, 14.36 ± 1.29 pmol/min/mg prot, $P < 0.001$, 20.6 ± 1.21 pmol/min/mg prot, $P < 0.05$, 7.67 ± 2.34 y 14.73 ± 1.28 pmol/min/mg prot, $P < 0.001$) (figura 51, derecha). El tratamiento con MPTP también reduce la actividad c-mtNOS (24.72 ± 0.63 versus 18.79 ± 0.18 pmol/min/mg prot, $P < 0.05$). La administración de los compuestos, incluso la aMT (13.21 ± 3.15 , 17.29 ± 2.21 , 14.54 ± 0.43 , 15.17 ± 2.66 y 14.09 ± 1.45 pmol/min/mg prot) apenas modifica el efecto del MPTP sobre la actividad c-mtNOS (figura 51, derecha).

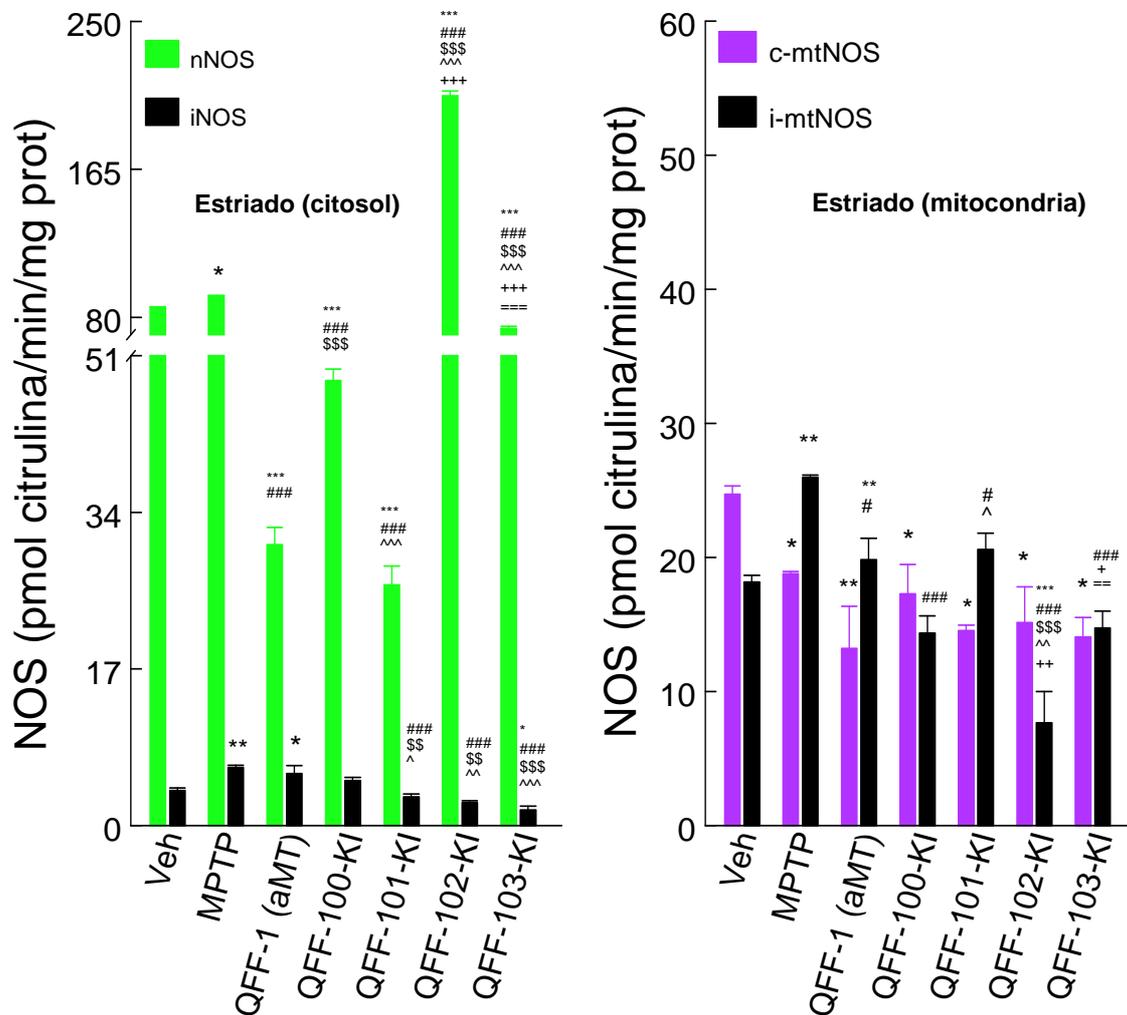


Figura 51. Cambios en la actividad de los componentes constitutivo e inducible de la NOS según las distintas kinureninas, tanto en el citosol como en la mitocondria del ST de ratones C57/Bl6. Los datos se corresponden a la media \pm EE de 7 animales por grupo, por triplicado cada experimento. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ vs control; # $P < 0.05$ y ### $P < 0.001$ vs MPTP; \$\$ $P < 0.01$ y \$\$\$ $P < 0.001$ vs QFF-1; ^ $P < 0.05$, ^ $P < 0.01$ y ^^ $P < 0.001$ vs QFF-100; + $P < 0.05$, ++ $P < 0.01$ y +++ $P < 0.001$ vs QFF-101; == $P < 0.01$ y === $P < 0.001$ vs QFF-102.

2.2.2. Kinurenaminas.

La administración de las kinurenaminas QFF-104-KIN (AMK) y QFF-111-KIN en el citosol de la SN (figura 52, izquierda) reduce significativamente la actividad iNOS estimulada por el MPTP (13.07 ± 1.45 pmol/min/mg prot, $P < 0.001$ y 20.36 ± 1.64 pmol/min/mg prot, $P < 0.01$, respectivamente), a excepción del compuesto QFF-108-KIN (27.09 ± 1.8 pmol/min/mg prot). Por otro lado, el tratamiento con cualquier kinurenamina empleada (ver tabla 30) reduce la actividad nNOS, aunque con menor significación que la aMT (27.97 ± 2.1 , 20.12 ± 2.13 y 22.79 ± 2.12 pmol/min/mg prot, $P < 0.001$). En el caso de la actividad NOS en mitocondrias puras (figura 52, derecha), las kinurenaminas reducen significativamente la actividad i-mtNOS inducida por la administración de MPTP (19.01 ± 1.3 , 18.74 ± 0.31 y 26.98 ± 3.18 pmol/min/mg prot respectivamente, $P < 0.001$). En cuanto a la actividad c-mtNOS, los compuestos QFF-108-KIN y QFF-111-KIN actúan reduciéndola significativamente (11.61 ± 1.87 y 3.34 ± 2.82 pmol/min/mg prot respectivamente, $P < 0.001$), siendo menos significativa la disminución del compuesto QFF-104-KIN (18.87 ± 2.3 pmol/min/mg, $P < 0.05$). Lo que si parece claro, es que el metabolito de la aMT, el AMK, desarrolla mayor capacidad para inhibir el componente inducible, ya sea citosólico o mitocondrial.

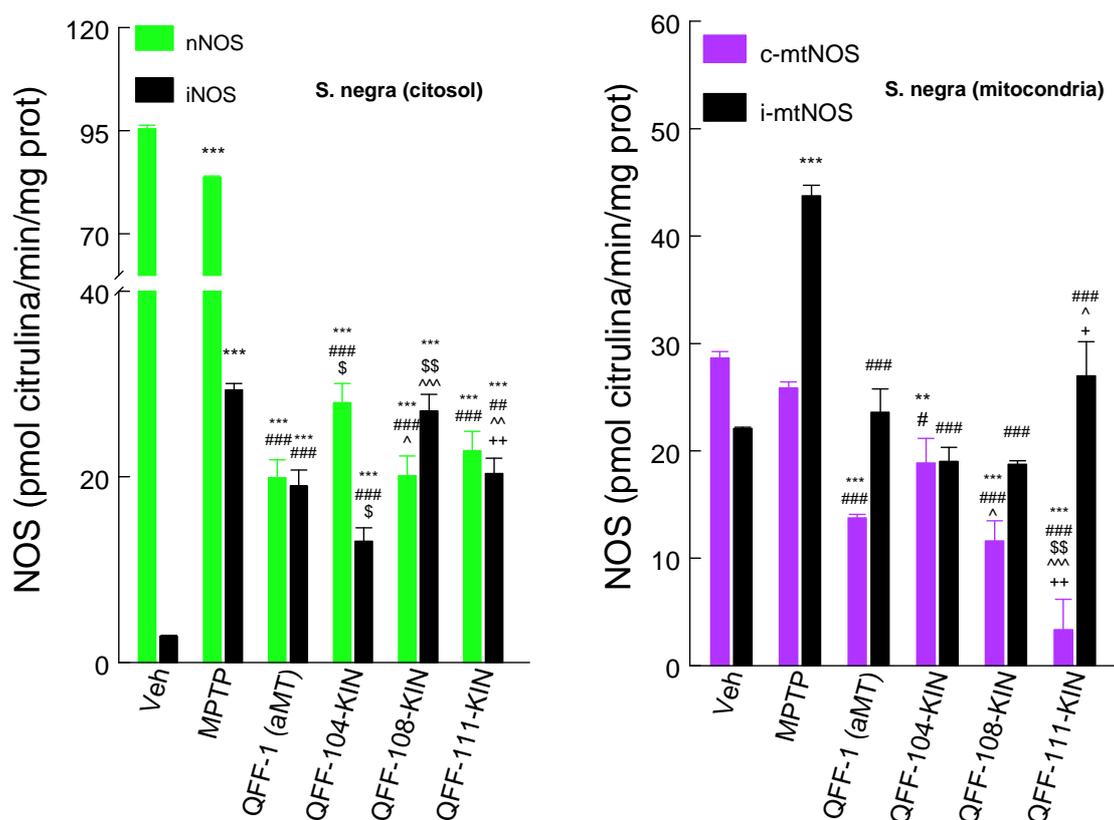


Figura 52. Cambios en la actividad de los componentes constitutivo e inducible de la NOS según las distintas kinurenaminas, tanto en el citosol como en la mitocondria de la SN de ratones C57/Bl6. Los datos se corresponden a la media \pm EE de 7 animales por grupo, por triplicado cada experimento. ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ vs control; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ y ### $P < 0.001$ vs MPTP; \$ $P < 0.05$ y \$\$ $P < 0.01$ vs QFF-1; ^ $P < 0.05$, ^^ $P < 0.01$ y ^^ $P < 0.001$ vs QFF-104; + $P < 0.05$ y ++ $P < 0.05$ vs QFF-108.

La figura 53 muestra la actividad NOS en el citosol y en la mitocondria del ST de ratones C57/BI6. Ni el MPTP ni el tratamiento con aMT y/o kinurenaminas modifican la actividad iNOS citosólica (Veh, 3.80 ± 0.28 ; MPTP, 6.35 ± 0.19 ; aMT, 5.66 ± 0.86 ; QFF-104-KIN, 4.73 ± 1.41 ; QFF-108-KIN, 3.94 ± 1.09 y QFF-111-KIN, 3.27 ± 1.41 pmol/min/mg prot). Lo que podemos observar claramente es la capacidad inhibitoria de las kinurenaminas de la actividad nNOS citosólica (28.63 ± 2.06 , 29.9 ± 1.54 y 35.1 ± 2.38 pmol/min/mg prot respectivamente, $P < 0.001$), por debajo de los valores control (figura 53, izquierda), con una proporción de inhibición muy similar a la aMT.

En mitocondrias estriales, las kinurenaminas se muestran efectivas para contrarrestar el aumento en la actividad i-mtNOS originado por el MPTP (16.77 ± 1.15 , 13.59 ± 1.12 , 18.96 ± 0.82 pmol/min/mg prot, $P < 0.001$) (figura 53, derecha). Respecto a la isoforma constitutiva de la mitocondria, destacan los compuestos QFF-108-KI y QFF-111-KI por encima del resto, ya que reducen la actividad de la c-mtNOS muy por debajo de los valores controles; son potentes inhibidores (4.08 ± 0.73 y 4.95 ± 0.64 pmol/min/mg prot, $P < 0.01$); por el contrario, el compuesto QFF-104-KI no modifica en absoluto la actividad c-mtNOS (16.57 ± 3.19 pmol/min/mg prot) (figura 53, derecha).

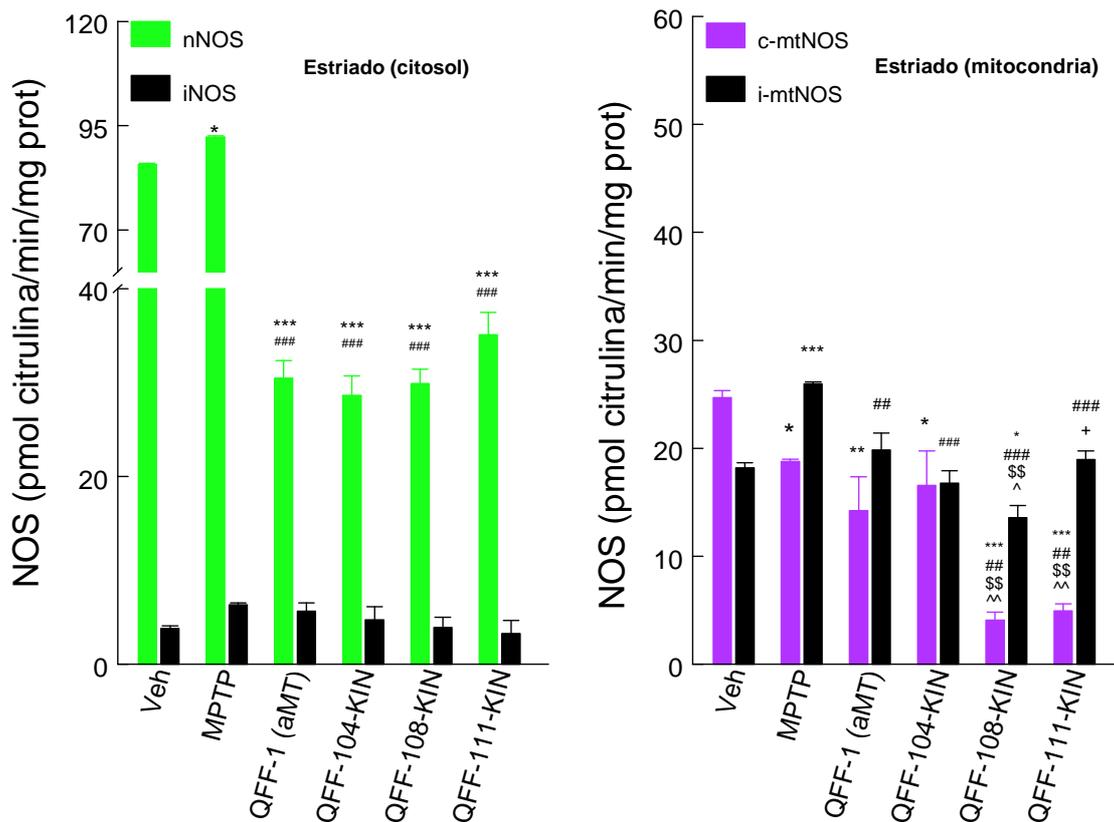


Figura 53. Cambios en la actividad de los componentes constitutivo e inducible de la NOS según las distintas kinureninas, tanto en el citosol como en la mitocondria del ST de ratones C57/BI6. Los datos se corresponden a la media \pm EE de 7 animales por grupo, por triplicado cada experimento. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ vs control; ## $P < 0.01$ y ### $P < 0.001$ vs MPTP; \$\$ $P < 0.01$ vs QFF-1; ^ $P < 0.05$ y ^^ $P < 0.01$ vs QFF-104; + $P < 0.05$ vs QFF-108.

2.2.3. Pirazolinas.

En la figura 54 (izquierda), se muestra el citosol de la SN, donde la pirazolina QFF-118-PI no causa variación alguna sobre la actividad iNOS, previamente estimulada por el MPTP (19.7 ± 3.19 , pmol/min/mg prot). El efecto sobre el componente constitutivo citosólico de la pirazolina es significativo, reduciendo su actividad muy por debajo de los valores control (12.84 ± 2.06 pmol/min/mg prot, $P < 0.001$).

En mitocondriales puras de SN (figura 54, derecha), el tratamiento con el compuesto QFF-118-PI, y contrariamente a como ocurría en el citosol, la pirazolina es capaz de inhibir la actividad i-mtNOS, incluso por debajo de los valores controles (17.165 ± 2.26 pmol/min/mg prot). Cuando estudiamos el efecto de este compuesto respecto a la actividad c-mtNOS, la pirazolina también muestra capacidad para inhibirla (13.27 ± 2.28 pmol/min/mg prot, $P < 0.05$).

Al observar la gráfica, podemos darnos cuenta que tanto en el citosol como en la mitocondria, el compuesto QFF-118-PI muestra un comportamiento o porcentaje de inhibición análogo al de la aMT.

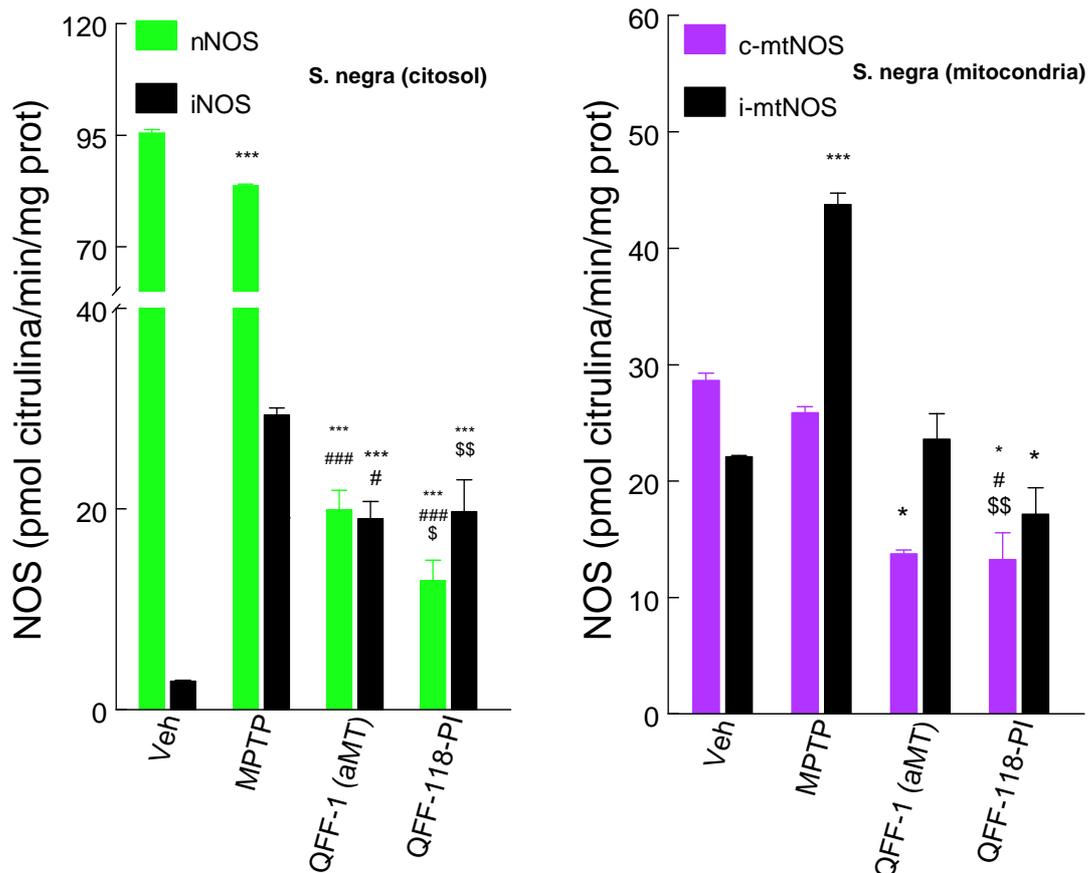


Figura 54. Cambios en la actividad de los componentes constitutivo e inducible de la NOS según la pirazolina, tanto en el citosol como en la mitocondria de la SN de ratones C57/Bl6. Los datos se corresponden a la media \pm EE de 7 animales por grupo, por triplicado cada experimento. * $P < 0.05$ y *** $P < 0.001$ vs control; # $P < 0.05$ y ### $P < 0.001$ vs MPTP; \$ $P < 0.05$ y \$\$ $P < 0.01$ vs QFF-1.

En el caso del ST de ratones C57/Bl6, tras la administración del compuesto QFF-118-PI se puede observar una leve disminución en la actividad iNOS citosólica frente al MPTP (3.44 ± 0.28 pmol/min/mg prot, $P < 0.05$) (figura 55, izquierda). El efecto sobre el componente constitutivo citosólico de la pirazolina es significativo, reduciendo su actividad significativamente por debajo de los valores control (38.05 ± 1.56 pmol/min/mg prot, $P < 0.001$), aunque de forma menos pronunciada que la aMT.

En el estudio de fracciones mitocondriales puras de ST, el compuesto QFF-118-PI se muestra efectivo para contrarrestar el aumento en la actividad i-mtNOS inducido por el MPTP (12.25 ± 1 pmol/min/mg prot, $P < 0.001$) (figura 55, derecha). Por otro lado, la pirazolina inhibe la actividad c-mtNOS (11.39 ± 0.86 pmol/min/mg prot, $P < 0.05$) (figura 55, derecha). En ambos casos, la pirazolina presenta mayor capacidad inhibitoria que la aMT frente a ambas isoformas mitocondriales.

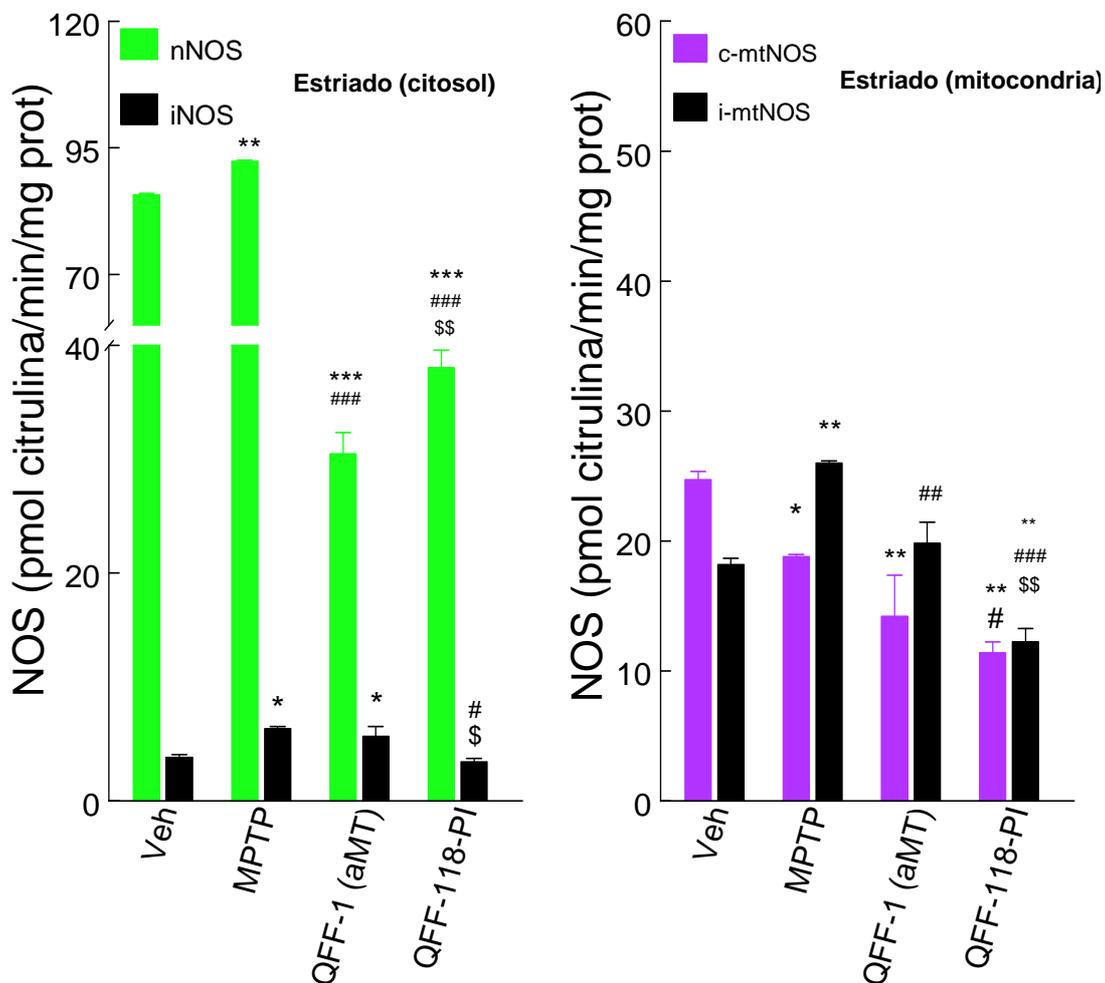


Figura 55. Cambios en la actividad de los componentes constitutivo e inducible de la NOS según la pirazolina, tanto en el citosol como en la mitocondria del ST de ratones C57/Bl6. Los datos se corresponden a la media \pm EE de 7 animales por grupo, por triplicado cada experimento. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ vs control; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ y ### $P < 0.001$ vs MPTP; \$ $P < 0.05$ y \$\$ $P < 0.01$ vs QFF-1.

2.2.4. Pirroles.

El tratamiento con este tipo de compuestos reduce significativamente, en el citosol de la SN, la actividad iNOS estimulada por el MPTP (5.78 ± 0.84 y 6.53 ± 0.29 pmol/min/mg prot, $P < 0.001$, respectivamente), en una proporción mayor que la aMT. Sin embargo, aunque estos pirroles reducen de forma significativa la nNOS, son los compuestos que lo hacen en menor proporción de todos los estudiados, excepto el antagonista QFF-102-KI (65.53 ± 1.84 pmol/min/mg prot, $P < 0.001$ y 74.35 ± 1.93 pmol/min/mg prot, $P < 0.05$) (figura 56, izquierda).

Al medir la actividad NOS en fracciones mitocondriales puras de SN (figura 56, derecha), el uso de los pirroles QFF-205-PIR y QFF-212-PIR reduce significativamente la actividad i-mtNOS inducida por el MPTP de forma más notable que la aMT (7.46 ± 0.98 y 9.45 ± 0.81 pmol/min/mg prot respectivamente, $P < 0.001$). En cuanto a la actividad c-mtNOS, también se ve reducida por estos compuestos (9.95 ± 0.98 pmol/min/mg prot, $P < 0.01$ y 14.1 ± 1.83 pmol/min/mg prot, $P < 0.05$), aunque de manera similar a la aMT.

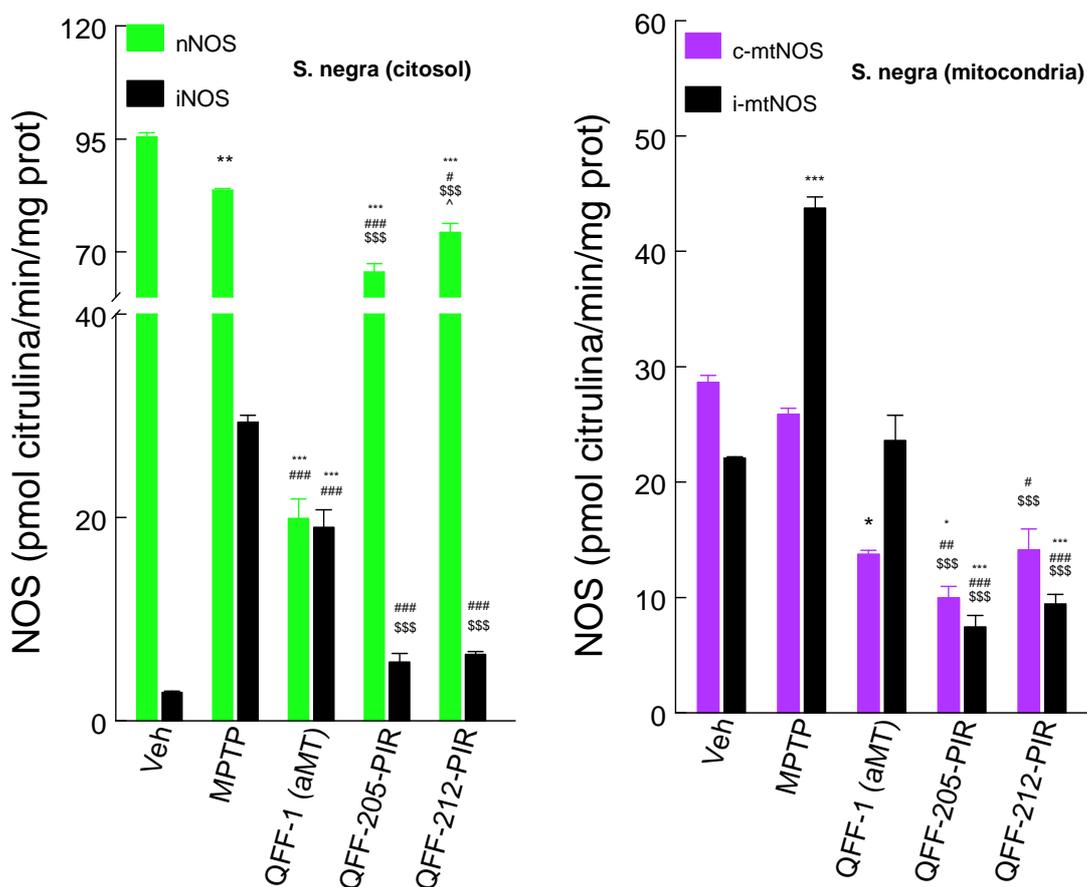


Figura 56. Cambios en la actividad de los componentes constitutivo e inducible de la NOS según los distintos pirroles, tanto en el citosol como en la mitocondria de la SN de ratones C57/Bl6. Los datos se corresponden a la media \pm EE de 7 animales por grupo, por triplicado cada experimento. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ vs control; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ y ### $P < 0.001$ vs MPTP; \$\$\$ $P < 0.001$ vs QFF-1; ^ $P < 0.05$ vs QFF-205.

La figura 57 muestra la actividad NOS en el citosol y en la mitocondria del ST de ratones C57/Bl6. Solamente el pirrol QFF-205-PIR presenta una leve disminución en la actividad iNOS citosólica (1.36 ± 0.42 pmol/min/mg prot, $P < 0.05$). Por otro lado, solamente la administración del compuesto QFF-212-PIR produce una reducción significativa en la actividad nNOS citosólica (75.11 ± 1.73 pmol/min/mg prot, $P < 0.001$) (figura 57, izquierda), pero bastante menor que la presentada por la aMT.

Sin embargo, en las mitocondrias estriales, los pirroles se muestran efectivos para contrarrestar el aumento en la actividad i-mtNOS inducido por el MPTP (9.3 ± 0.78 y 5.53 ± 1.06 pmol/min/mg prot, $P < 0.001$) (figura 57, derecha). En cuanto a la actividad c-mtNOS, los compuestos QFF-205-PIR y QFF-212-PIR reducen dicha actividad después de la administración de MPTP (11.18 ± 0.9 pmol/min/mg prot, $P < 0.05$ y 9.05 ± 0.71 pmol/min/mg prot, $P < 0.01$). Contrariamente a lo que ocurre en el citosol, ambos compuestos inhiben en mayor proporción que la aMT el componente constitutivo y junto con la kinurenamina QFF-102-KI, son los que desarrollan más capacidad de inhibición sobre la i-mtNOS.

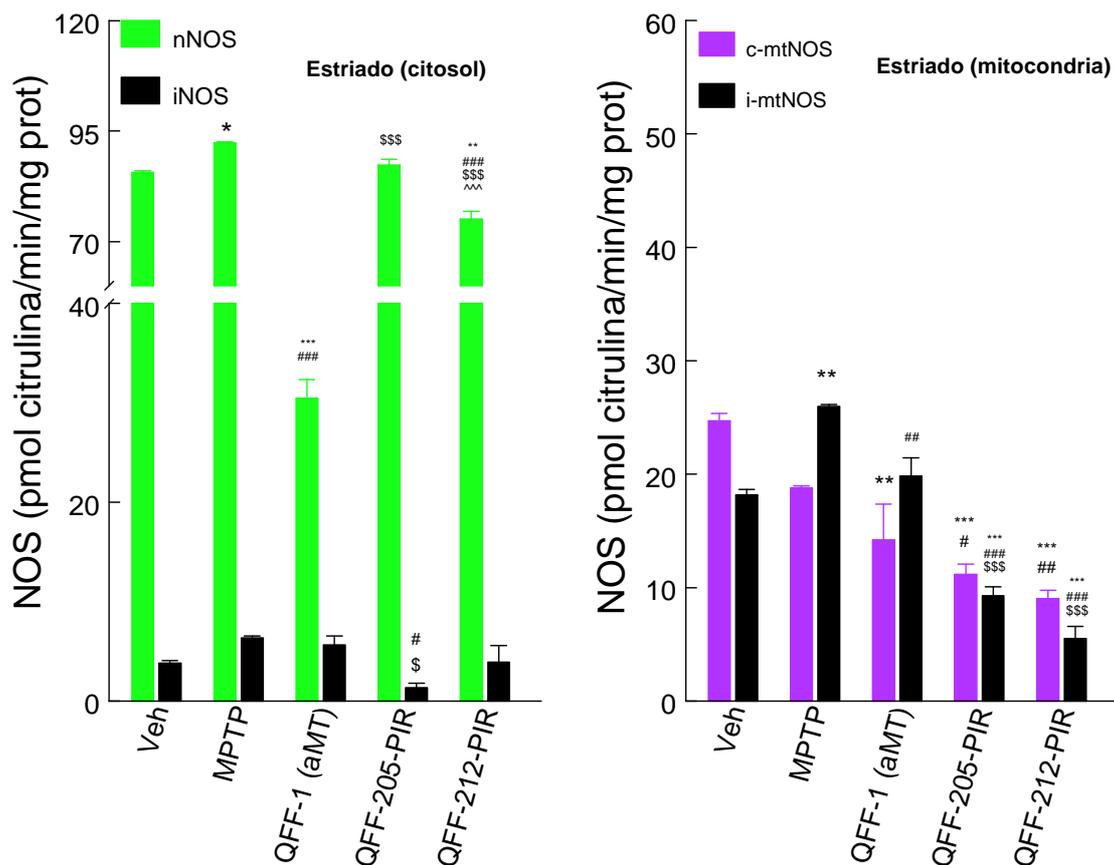


Figura 57. Cambios en la actividad de los componentes constitutivo e inducible de la NOS según los distintos pirroles, tanto en el citosol como en la mitocondria del ST de ratones C57/Bl6. Los datos se corresponden a la media \pm EE de 7 animales por grupo, por triplicado cada experimento. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ vs control; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ y ### $P < 0.001$ vs MPTP; \$ $P < 0.05$ y \$\$\$ $P < 0.001$ vs QFF-1; ^^ $P < 0.001$ vs QFF-205.

2.3.- Niveles de nitritos en citosol y mitocondria de SN y ST.

2.3.1. Kinureninas.

La figura 58 muestra los niveles de nitritos en el citosol y la mitocondria en la SN y el ST de ratones C57/Bl6. Respecto a la SN (figura 58, izquierda), la neurotoxina aumenta significativamente los niveles de nitritos en el citosol (1.58 ± 0.02 versus 2.86 ± 0.06 nmol/mg prot, $P < 0.001$). El tratamiento con aMT y/o las kinureninas ($P < 0.001$) reduce significativamente el efecto del MPTP sobre los niveles de nitritos, destacando los compuestos QFF-102-KI y QFF-103-KI, que los disminuyen con mayor significación, incluso que la aMT (2.5 ± 0.08 , 2.08 ± 0.06 , 2.19 ± 0.05 , 1.58 ± 0.03 y 1.78 ± 0.04 nmol/mg prot, respectivamente). En la mitocondria de la SN, el aumento en los niveles de nitritos inducido por el MPTP (10.49 ± 0.34 versus 24.48 ± 1.18 nmol/mg prot, $P < 0.001$) se ve reducido mediante el empleo de cualquier kinurenamina; el comportamiento entre las diversas kinurenaminas y la aMT es muy similar (11.06 ± 0.55 , 8.47 ± 1.13 , 10.86 ± 0.8 , 6.38 ± 0.24 y 7.4 ± 0.5 nmol/mg prot, respectivamente).

En el citosol del ST (figura 58, derecha), la administración de MPTP induce los niveles de nitritos (1.61 ± 0.01 versus 2.19 ± 0.1 nmol/mg prot, $P < 0.001$) los cuales se ven reducidos significativamente por las kinureninas QFF-102-KI (1.35 ± 0.05 , $P < 0.001$) y QFF-103-KI (1.43 ± 0.06 , $P < 0.01$). También se ha estudiado el efecto del MPTP en mitocondrias estriatales, donde la neurotoxina incrementa los niveles de nitritos (8.50 ± 0.28 versus 18.82 ± 0.16 nmol/mg prot, $P < 0.001$). Al igual que en el caso de las mitocondrias de la SN, la administración de aMT y/o kinureninas conlleva a un retorno a los valores control de los niveles de nitritos (9.12 ± 0.84 , 6.43 ± 0.47 , 8.54 ± 0.48 , 6.51 ± 0.3 y 6.25 ± 0.51 nmol/mg prot, $P < 0.001$).

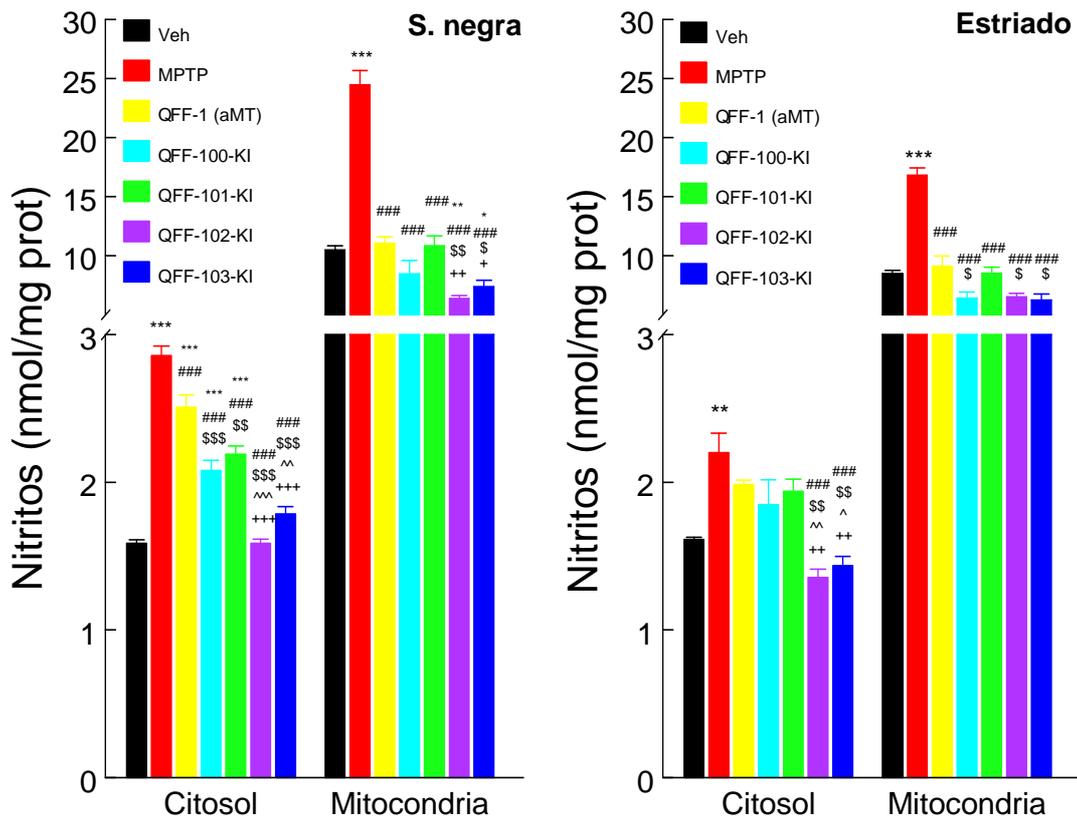


Figura 58. Medida de los niveles de nitritos según las distintas kinureninas, tanto en el citosol como en la mitocondria de la SN y ST de ratones C57/Bl6. Los datos se corresponden a la media \pm EE de 5 animales por grupo, por cuadruplicado cada experimento. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ vs control; #### $P < 0.001$ vs MPTP; \$ $P < 0.05$, \$\$ $P < 0.01$ y \$\$\$ $P < 0.001$ vs QFF-1; ^ $P < 0.05$, ^^ $P < 0.01$ y ^^ $P < 0.001$ vs QFF-100; + $P < 0.05$, ++ $P < 0.01$ y +++ $P < 0.001$ vs QFF-101.

2.3.2. Kinurenaminas.

Respecto al citosol de la SN (figura 59, izquierda), el tratamiento con las kinurenaminas QFF-104-KIN y QFF-111-KIN (especialmente, éste último) reducen significativamente el efecto del MPTP sobre los niveles de nitritos (2.37 ± 0.13 nmol/mg prot, $P < 0.01$ y 1.95 ± 0.05 nmol/mg prot, $P < 0.001$, respectivamente), en una proporción mayor que la aMT. En el estudio de los niveles de nitritos en la mitocondria de la SN (figura 59, izquierda), se observa que todas las kinurenaminas contrarrestan de manera significativa el efecto del MPTP (9.05 ± 0.33 , 10.04 ± 0.14 y 14.32 ± 1 nmol/mg prot, $P < 0.001$, respectivamente), con una significación muy parecida a la aMT.

En la figura 59 (derecha), en el citosol de ST, únicamente el compuesto QFF-111-KIN es capaz de reducir los niveles de nitritos inducidos por el tratamiento con MPTP (1.76 ± 0.06 , $P < 0.01$). En mitocondrias estriatales (figura 59, derecha) todas las kinurenaminas recuperan los valores control de los niveles de nitritos inducidos por el MPTP (7.29 ± 0.28 , 7.59 ± 0.16 y 9.07 ± 1.17 nmol/mg prot, $P < 0.001$), con un comportamiento muy similar al de la aMT.

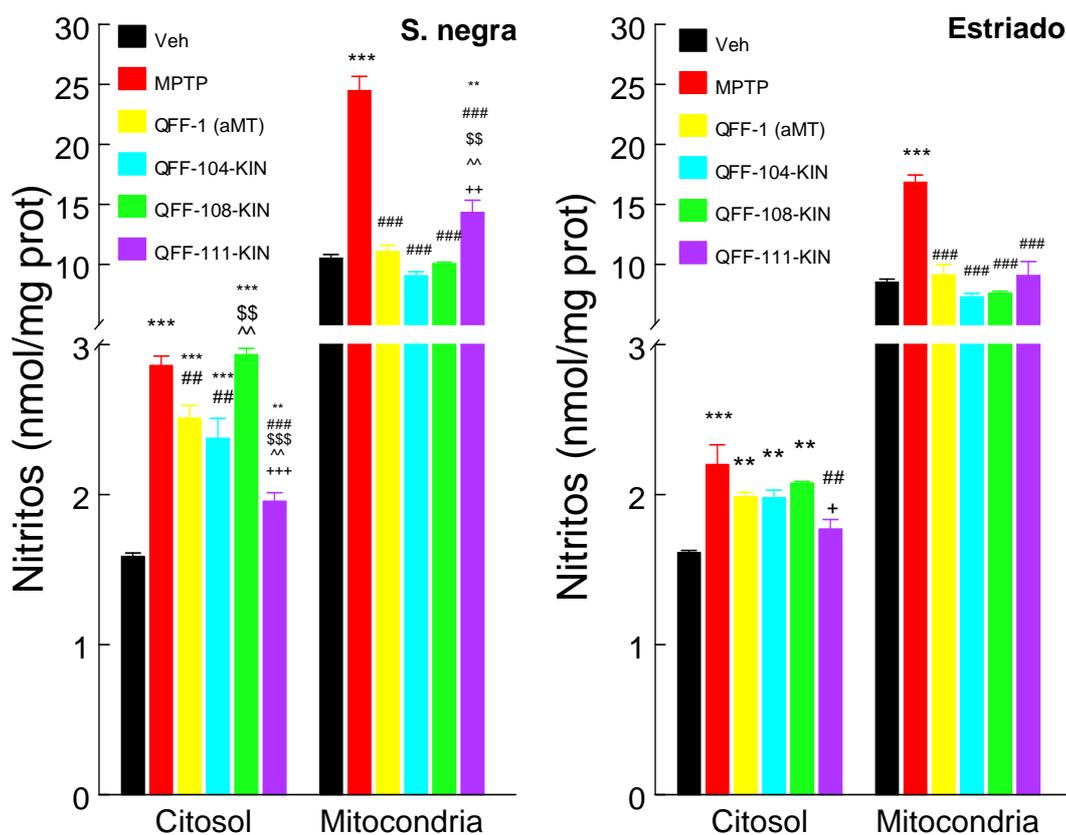


Figura 59. Medida de los niveles de nitritos según las distintas kinureninas, tanto en el citosol como en la mitocondria de la SN y ST de ratones C57/Bl6. Los datos se corresponden a la media \pm EE de 5 animales por grupo, por cuadruplicado cada experimento. ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ vs control; ## $P < 0.01$ y ### $P < 0.001$ vs MPTP; \$\$ $P < 0.01$ y \$\$\$ $P < 0.001$ vs QFF-1; ^ $P < 0.01$ vs QFF-104; + $P < 0.05$, ++ $P < 0.01$ y +++ $P < 0.001$ vs QFF-108.

2.3.3. Pirazolininas.

Podemos observar que en el citosol de la SN (figura 60, izquierda), el tratamiento con el compuesto QFF-118-PI reduce significativamente el efecto del MPTP sobre los niveles de nitritos (1.81 ± 0.04 nmol/mg prot, $P < 0.001$), de una forma más significativa que la aMT. En el caso de los niveles de nitritos en la mitocondria de la SN (figura 60, izquierda), se observa que la pirazolina recupera los niveles de nitritos inducidos por la administración de MPTP hasta los valores control (7.95 ± 0.78 nmol/mg prot, $P < 0.001$).

La figura 60 (derecha) muestra como en el citosol del ST tiene lugar una disminución significativa de los niveles de nitritos por parte del compuesto QFF-118-PI, recuperando (con mayor eficacia que la aMT) los valores control y contrarrestando así el efecto de la neurotoxina (1.54 ± 0.04 nmol/mg prot, $P < 0.001$). Nuevamente, la administración de la pirazolina recupera, incluso por debajo de los valores control, los niveles de nitritos inducidos por el MPTP (5.94 ± 0.09 nmol/mg prot, $P < 0.001$) en mitocondrias de ST (figura 60, derecha).

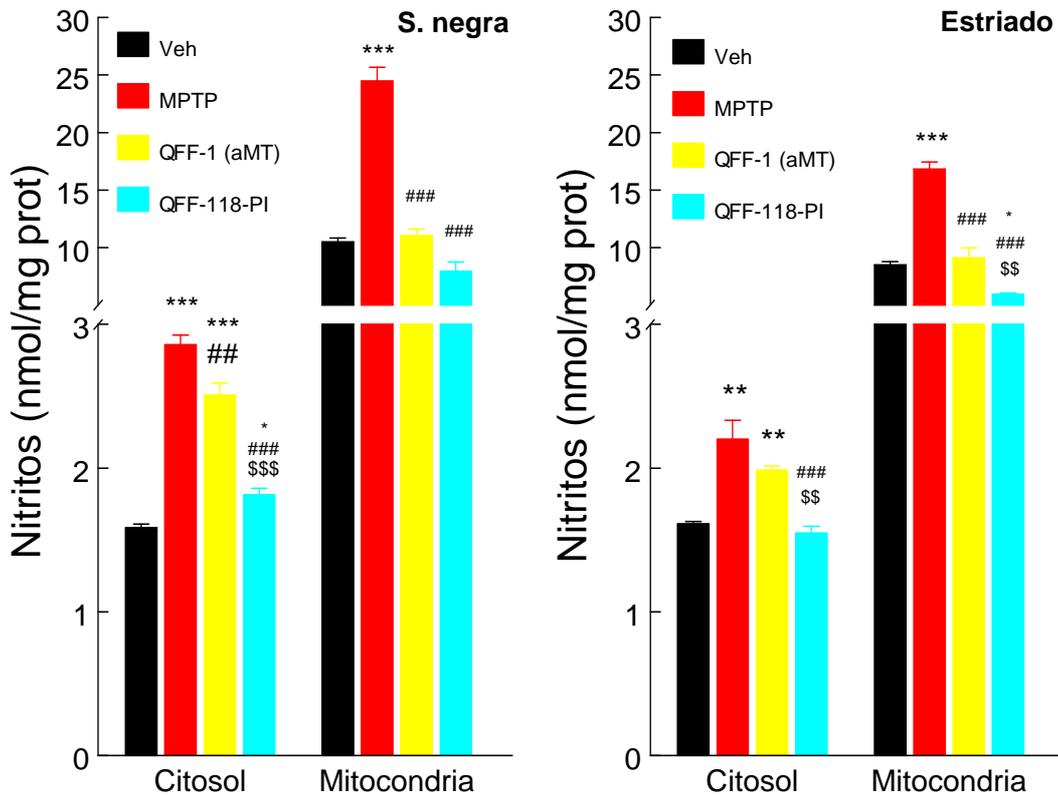


Figura 60. Medida de los niveles de nitritos según la pirazolina, tanto en el citosol como en la mitocondria de la SN y ST de ratones C57/Bl6. Los datos se corresponden a la media \pm EE de 5 animales por grupo, por cuadruplicado cada experimento. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ vs control; ## $P < 0.01$ y ### $P < 0.001$ vs MPTP; \$\$ $P < 0.01$ vs QFF-1.

2.3.4. Pirroles.

En la figura 61 (izquierda) podemos observar que en el citosol de la SN, el tratamiento con los compuestos QFF-205-PIR y QFF-212-PIR reduce significativamente el efecto del MPTP sobre los niveles de nitritos (1.84 ± 0.03 y 2 ± 0.09 nmol/mg prot, $P < 0.001$, respectivamente) y en mayor proporción que la aMT. De forma análoga, en la mitocondria de la SN (figura 61, izquierda), se puede apreciar como los pirroles son capaces de contrarrestar los niveles de nitritos inducidos por el MPTP (8.01 ± 0.8 y 7.29 ± 0.24 nmol/mg prot, $P < 0.001$, respectivamente), de forma similar a la AMT.

Respecto al citosol del ST (figura 61, derecha), el tratamiento con los pirroles QFF-205-PIR y QFF-212-PIR reduce significativamente los niveles de nitritos, aumentados por la administración de MPTP (1.41 ± 0.03 nmol/mg prot $P < 0.001$ y 1.65 ± 0.05 nmol/mg prot $P < 0.01$). En el caso de las mitocondrias estriales, estos pirroles también recuperan los niveles de nitritos inducidos por el MPTP en una proporción similar a la aMT (8.01 ± 0.8 y 7.29 ± 0.24 nmol/mg prot, $P < 0.001$) (figura 61, derecha).

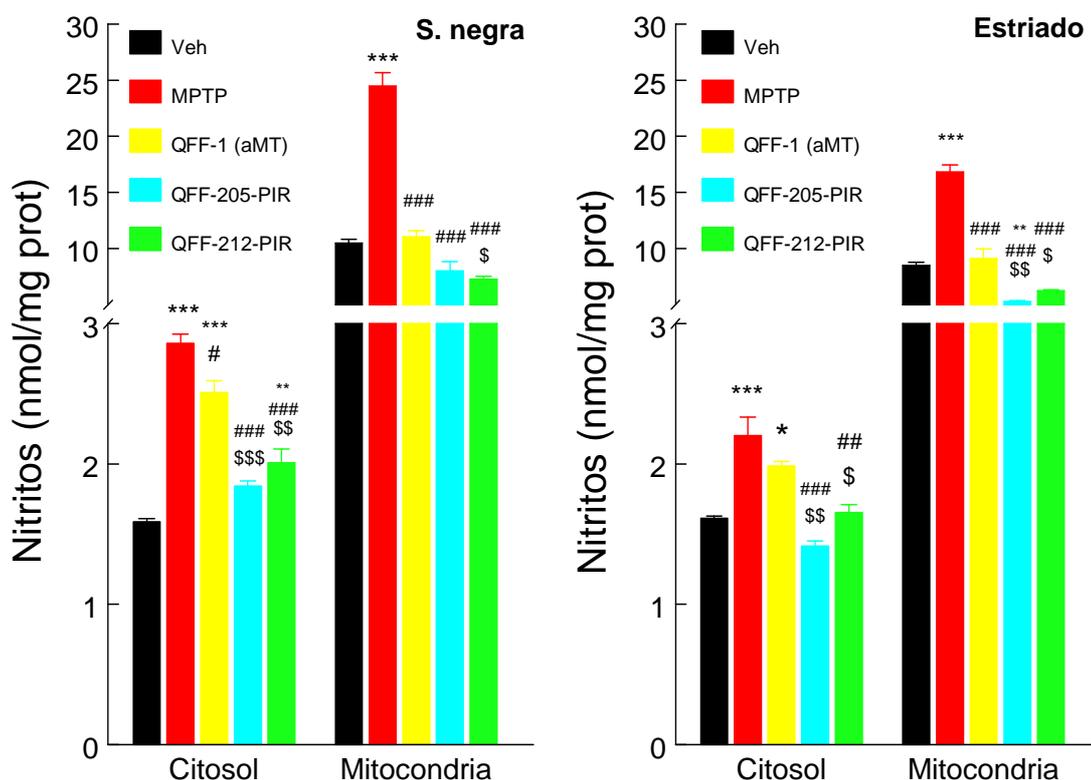


Figura 61. Medida de los niveles de nitritos según los distintos pirroles, tanto en el citosol como en la mitocondria de la SN y ST de ratones C57/Bl6. Los datos se corresponden a la media \pm EE de 5 animales por grupo, por cuadruplicado cada experimento. ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ vs control; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ y ### $P < 0.001$ vs MPTP; \$ $P < 0.05$, \$\$ $P < 0.01$ y \$\$\$ $P < 0.001$ vs QFF-1.

2.4.- Oxidación de los lípidos de membrana (LPO) en citosol y mitocondria de SN y ST.

2.4.1. Kinureninas.

La figura 62 representa los niveles de MDA y 4HNE (LPO) en la SN y ST de ratones C57/Bl6. En la SN (figura 62, izquierda) el MPTP incrementa significativamente los niveles de LPO (2.05 ± 0.09 versus 2.80 ± 0.23 nmol/mg prot, $P < 0.001$). Ni la aMT ni ninguna de las kinureninas ha sido capaz de contrarrestar el efecto generado por el MPTP, a excepción del compuesto QFF-103-KI (1.97 ± 0.07 nmol/mg, $P < 0.05$). La neurotoxina también incrementa los niveles de LPO en la mitocondria de la SN (2.92 ± 0.21 versus 4.05 ± 0.14 nmol/mg prot, $P < 0.001$). En este caso, tanto la aMT como los compuestos sí son capaces de disminuir los niveles de LPO, aunque el efecto de la aMT y de los compuestos QFF-102-KI y QFF-103-KI (3.02 ± 0.05 , 3.04 ± 0.02 y 2.73 ± 0.07 nmol/mg prot respectivamente, $P < 0.001$) son significativamente mayores que los producidos por los compuestos QFF-100-KI y QFF-101-KI (3.44 ± 0.02 nmol/mg prot, $P < 0.01$ y 3.7 ± 0.02 nmol/mg prot, $P < 0.05$).

Por otro lado, la administración de MPTP también induce los niveles de LPO en el ST (figura 62, derecha). De este modo, en el citosol del ST, el MPTP incrementa ligeramente los niveles de LPO (2.16 ± 0.14 versus 2.62 ± 0.12 nmol/mg prot, $P < 0.05$) y ni la aMT ni las kinureninas modifican dichos valores, a excepción del compuesto QFF-103-KI, que reduce significativamente los efectos de la neurotoxina (1.81 ± 0.07 nmol/mg). El MPTP también aumenta la LPO en las mitocondrias estriatales (3.01 ± 0.03 versus 3.51 ± 0.11 nmol/mg prot, $P < 0.001$). En este caso, los compuestos QFF-102-KI y QFF-103-KI (2.84 ± 0.04 y 2.55 ± 0.15 nmol/mg, $P < 0.001$) contrarrestan en mayor proporción los efectos del MPTP que la aMT; de manera menos significativa el compuesto QFF-100-KI también reduce esos niveles de LPO (2.9 ± 0.07 nmol/mg, $P < 0.01$ y 3.19 ± 0.06 nmol/mg, $P < 0.05$) mientras que la kinurenina QFF-101-KI sería la única en no presentar eficacia frente a los efectos generados por el MPTP.

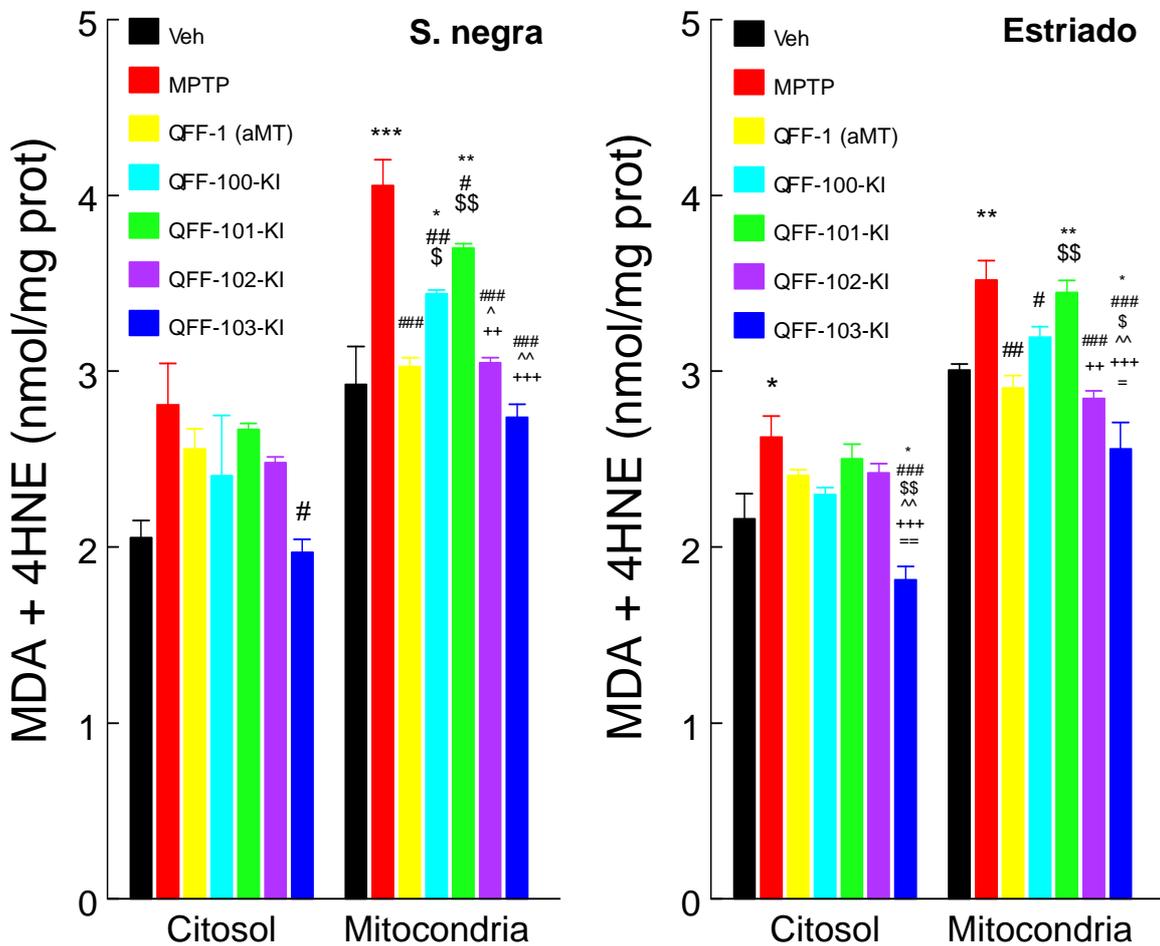


Figura 62. Cambios en los niveles de LPO según las distintas kinureninas, tanto en el citosol como en la mitocondria de la SN y ST de ratones C57/BI6. Los datos se corresponden a la media \pm EE de 2 animales para el citosol y 4 animales para la mitocondria, por quintuplicado cada experimento. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ vs control; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ y ### $P < 0.001$ vs MPTP; \$ $P < 0.05$ y \$\$ $P < 0.01$ vs QFF-1; ^ $P < 0.05$ y ^^ $P < 0.01$ vs QFF-100; ++ $P < 0.01$ y +++ $P < 0.001$ vs QFF-101; = $P < 0.01$ y == $P < 0.001$ vs QFF-102.

2.4.2. Kinurenaminas.

En el citosol de la SN (figura 63, izquierda), ninguna de las kinurenaminas contrarresta la inducción producida por el MPTP en los niveles de LPO. Sin embargo, en la mitocondria de la SN, a excepción del compuesto QFF-111-KIN, el resto de kinurenaminas son capaces de disminuir los niveles de LPO tras la administración de MPTP, siendo el más significativo el metabolito de la aMT, el AMK o compuesto QFF-104-KIN (2.45 ± 0.14 y 3.16 ± 0.04 nmol/mg prot, $P < 0.001$).

Por otro lado, el tratamiento con MPTP presenta un menor efecto sobre los niveles de LPO en el ST (figura 63, derecha), especialmente en la mitocondria. En el citosol, ningún compuesto modifica el ligero efecto causado por el MPTP. En la mitocondria, las kinurenaminas QFF-104-KIN y QFF-108-KIN contrarrestan los efectos del MPTP (2.89 ± 0.03 nmol/mg, $P < 0.01$ y 3.09 ± 0.14 nmol/mg, $P < 0.05$) de forma análoga a la aMT. Únicamente (y como ocurriera en las mitocondrias de la SN) el compuesto QFF-111-KIN no presentaría eficacia frente a los efectos generados por el MPTP.

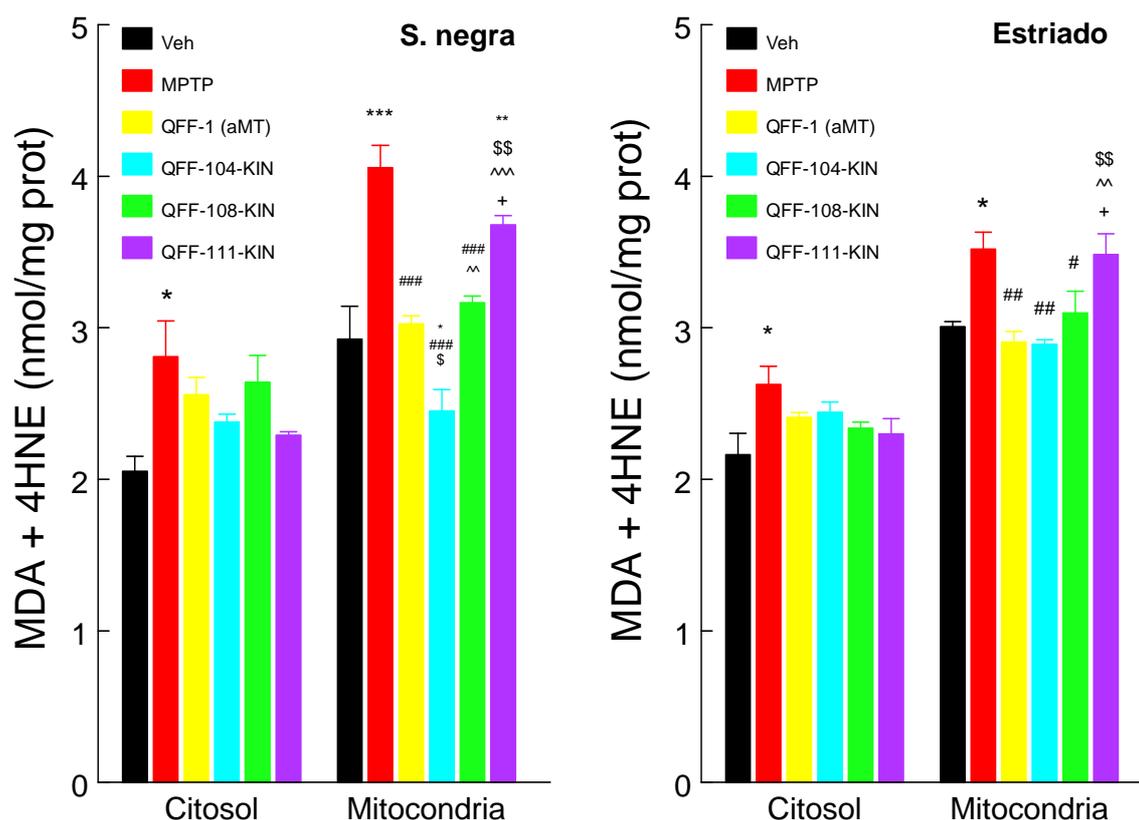


Figura 63. Cambios en los niveles de LPO según las distintas kinureninas, tanto en el citosol como en la mitocondria de la SN y ST de ratones C57/Bl6. Los datos se corresponden a la media \pm EE de 2 animales para el citosol y 4 animales para la mitocondria, por quintuplicado cada experimento. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ vs control; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ y ### $P < 0.001$ vs MPTP; \$ $P < 0.05$ y \$\$ $P < 0.01$ vs QFF-1; ^ $P < 0.01$ y ^^ $P < 0.001$ vs QFF-104; + $P < 0.05$ vs QFF-108.

2.4.3. Pirazolinas.

En la figura 64 (izquierda), podemos observar como en el citosol de la SN, el compuesto QFF-118-PI no contrarresta el ligero efecto generado por el MPTP. Sin embargo, en la mitocondria de la SN la pirazolina si muestra efectividad frente a la inducción de la LPO debida al MPTP (2.33 ± 0.07 nmol/mg prot, $P < 0.01$); ésta, tiene un comportamiento análogo al de la aMT.

En el caso del ST (figura 64, derecha), ni en el caso del citosol ni tampoco en el de la mitocondria la pirazolina presentaría efecto alguno frente al aumento de los niveles de LPO; en este caso el uso de aMT sería más eficaz.

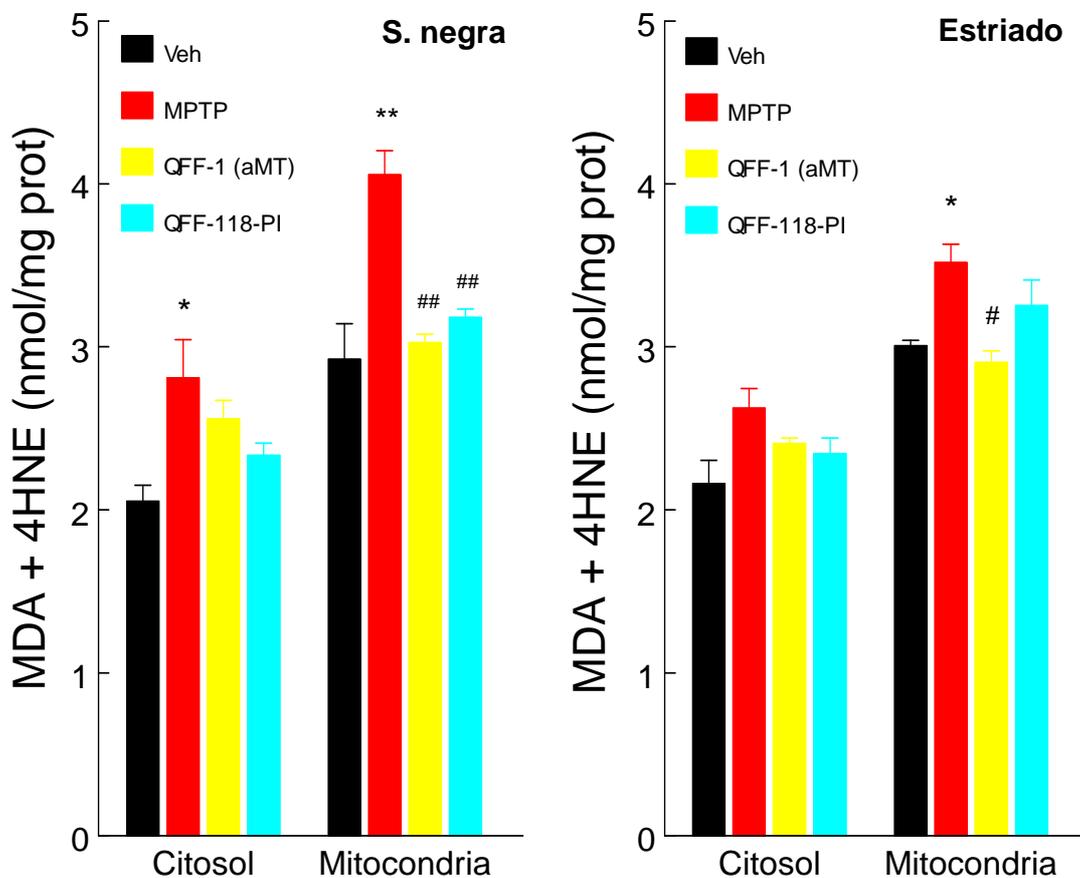


Figura 64. Cambios en los niveles de LPO según la pirazolina, tanto en el citosol como en la mitocondria de la SN y ST de ratones C57/Bl6. Los datos se corresponden a la media \pm EE de 2 animales para el citosol y 4 animales para la mitocondria, por quintuplicado cada experimento. * $P < 0.05$ y ** $P < 0.01$ vs control; # $P < 0.05$, # $P < 0.05$ y ## $P < 0.01$ vs MPTP.

2.4.4. Pirroles.

La figura 65 (izquierda) muestra como los compuestos QFF-205-PIR y QFF-212-PIR (1.88 ± 0.07 y 1.95 ± 0.02 nmol/mg prot, $P < 0.01$) contrarrestan el efecto producido por el MPTP en el citosol de la SN, reduciendo significativamente los niveles de LPO. Más significativa sería la disminución de los niveles de LPO que presentan ambos compuestos en la mitocondria de la SN, frente a la neurotoxina (2.58 ± 0.06 y 2.64 ± 0.005 nmol/mg prot respectivamente, $P < 0.001$). En ambos casos, estos compuestos son más significativos que la aMT.

Al estudiar los niveles de LPO en el citosol del ST (figura 65, derecha), observamos que la inducción de éstos generada por la administración de MPTP se reduce significativamente con el tratamiento con los pirroles (1.77 ± 0.03 nmol/mg prot, $P < 0.001$ y 1.9 ± 0.02 nmol/mg prot, $P < 0.01$). Finalmente, en la mitocondria del ST, los compuestos QFF-205-PIR y QFF-212-PIR contrarrestan significativamente los efectos del MPTP, recuperando los niveles de LPO incluso por debajo de los valores controles (2.54 ± 0.1 y 2.64 ± 0.07 nmol/mg, $P < 0.001$). De nuevo, el uso de estos compuestos presenta mayor eficacia que la aMT.

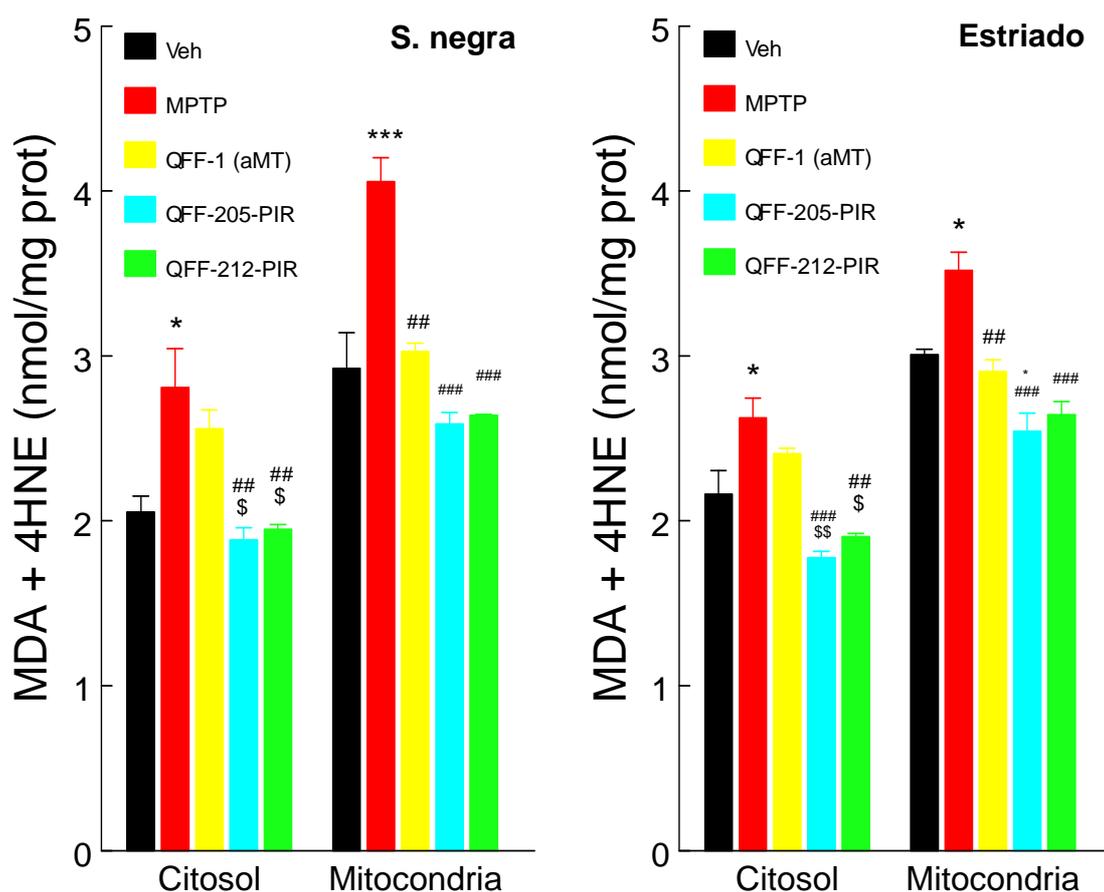


Figura 65. Cambios en los niveles de LPO según los distintos pirroles, tanto en el citosol como en la mitocondria de la SN y ST de ratones C57/Bl6. Los datos se corresponden a la media \pm EE de 2 animales para el citosol y 4 animales para la mitocondria, por quintuplicado cada experimento. * $P < 0.05$ y *** $P < 0.001$ vs control; ## $P < 0.01$ y ### $P < 0.001$ vs MPTP; \$ $P < 0.05$ y \$\$ $P < 0.01$ vs QFF-1.

2.5. CLASIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS POR MAYOR GRADO DE INHIBICIÓN DE LA iNOS EN EL CITOSOL DE SN.

En la tabla 41, se muestran los porcentajes de inhibición de la NOS (tanto constitutiva como inducible) en el ST y en la SN del citosol de los compuestos estudiados para el desarrollo del modelo *in vivo*, ordenados de mayor a menor respecto al grado de inhibición del componente inducible en la SN.

Tabla 41.

COMPUESTO	CITOSOL SN		CITOSOL ST	
	% INHIBICIÓN nNOS	% INHIBICIÓN iNOS	% INHIBICIÓN nNOS	% INHIBICIÓN iNOS
QFF-102-KI	-194.82 ± 0.05	88.38 ± 0.68	-124.43 ± 2.74	60.31 ± 0.2
QFF-103-KI	36.79 ± 0.71	85.83 ± 0.13	20.23 ± 1.1	72.75 ± 0.4
QFF-205-PIR	21.66 ± 1.84	80.32 ± 0.84	5.41 ± 1.32	78.58 ± 0.42
QFF-212-PIR	11.11 ± 1.93	77.76 ± 0.29	18.62 ± 1.73	38.11 ± 1.68
QFF-104-KIN	66.56 ± 2.1	55.49 ± 1.45	68.98 ± 2.06	25.51 ± 1.41
QFF-100-KI	74.36 ± 0.6	44.7 ± 0.53	47.65 ± 1.22	22.67 ± 0.31
QFF-1 (aMT)	76.21 ± 1.93	35.27 ± 1.72	66.97 ± 1.88	10.86 ± 0.86
QFF-118-PI	84.65 ± 2.06	32.92 ± 3.19	58.77 ± 1.56	45.82 ± 0.28
QFF-111-KIN	72.75 ± 2.12	30.67 ± 1.64	61.97 ± 1.41	48.5 ± 1.41
QFF-101-KI	81.94 ± 2.48	27.57 ± 2.38	71.69 ± 2.05	50.7 ± 0.33
QFF-108-KIN	75.94 ± 2.13	7.76 ± 1.8	67.6 ± 1.09	37.95 ± 1.09

2.6. CLASIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS POR MAYOR GRADO DE INHIBICIÓN DE LA i-mtNOS EN LA MITOCONDRIA DE SN.

En la tabla 42, se muestran los porcentajes de inhibición de la NOS (tanto constitutiva como inducible) en el ST y SN de la mitocondria de los compuestos estudiados para el desarrollo del modelo *'in vivo'*, ordenados de mayor a menor respecto al grado de inhibición del componente inducible en la SN.

Tabla 42.

COMPUESTO	MITOCONDRIA SN		MITOCONDRIA ST	
	% INHIBICIÓN c-mtNOS	% INHIBICIÓN i-mtNOS	% INHIBICIÓN mtNOS	% INHIBICIÓN i-mtNOS
QFF-205-PIR	61.52 ± 0.98	82.94 ± 0.98	40.5 ± 0.9	64.2 ± 0.78
QFF-212-PIR	45.47 ± 1.83	78.39 ± 1.83	51.83 ± 0.71	78.71 ± 1.06
QFF-102-KI	34.33 ± 2.43	76.81 ± 0.53	19.26 ± 2.66	70.47 ± 2.34
QFF-103-KI	45.7 ± 1.7	66.82 ± 2.27	25.01 ± 1.45	43.3 ± 1.28
QFF-118-PI	48.68 ± 2.28	60.76 ± 2.26	39.38 ± 0.86	52.84 ± 1
QFF-100-KI	43.85 ± 1.48	58.04 ± 1.38	7.98 ± 2.21	44.72 ± 1.29
QFF-108-KIN	55.1 ± 1.87	57.15 ± 0.31	78.28 ± 0.73	47.69 ± 1.12
QFF-104-KIN	27.03 ± 2.3	56.52 ± 1.3	11.81 ± 3.19	35.45 ± 1.15
QFF-1 (aMT)	46.82 ± 0.32	46.04 ± 2.18	29.69 ± 3.15	23.67 ± 1.61
QFF-101-KI	39.21 ± 1.08	44.23 ± 1.46	22.61 ± 0.43	20.7 ± 1.21
QFF-111-KIN	87.08 ± 2.82	38.31 ± 3.18	73.65 ± 0.64	27.02 ± 0.82

Discusión

1. Mitocondria y EP.

En el presente estudio se ha empleado la neurotoxina MPTP para inducir un modelo de Parkinson en ratones C57/Bl6 y así, estudiar algunos aspectos de la fisiopatología mitocondrial en esta neuropatología. Podemos deducir que la NOS citosólica y la mitocondrial (tanto sus componentes constitutivos como inducibles) están implicadas en el desarrollo de la EP y que el NO[•] producido por estas enzimas puede ser responsable, al menos en parte, del daño oxidativo que se genera en dicho modelo. El MPTP también es responsable de un incremento de la mtNOS y por tanto, de la producción mitocondrial de NO[•], que a su vez es causa del daño mitocondrial inducido. Además, hemos visto que se produce una disfunción en la CTE debido a una disminución de la actividad del complejo I, así como un daño oxidativo a macromoléculas, en este caso a lípidos. Por tanto, una disfunción mitocondrial (más específicamente la inhibición del complejo I) y el estrés oxidativo están implicados en la patogénesis de la EP (Hald y cols., 2005; Gandhi y cols., 2005; Dawson y cols., 2003).

De esta manera, se ha observado que durante la EP inducida por MPTP tiene lugar una inhibición de la actividad de la CTE, concretamente del complejo I, tanto en ST (30%) como en SN (50%). Además, como hemos podido observar, en la EP tiene lugar un incremento de actividad de la mtNOS, cuya consecuencia es la producción de radicales libres, que son capaces de dañar por sí mismos a los componentes de la CTE.

Actualmente las evidencias que indican que el estrés oxidativo inducido por los radicales libres está implicado en las enfermedades neurodegenerativas están tomando mayor fuerza. Bajo condiciones fisiológicas, la producción y depuración de radicales libres se mantiene en equilibrio. Sin embargo, en algunos procesos patológicos, como el daño neuronal dopaminérgico inducido por MPTP, la formación de radicales libres va más allá de la capacidad antioxidante endógena y consecuentemente, se origina un daño neuronal (Jenner, 2003).

Existen datos que apoyan que el NO[•] desempeña un papel importante como especie oxidativa y conduce a la muerte de las neuronas dopaminérgicas (Zhang y cols., 2006). El NO[•] puede mediar neurotoxicidad mediante la activación del receptor NMDA (Plaitakis y cols., 2000). Cuando el NO[•] se produce en cantidades excesivas, éste pasa de ser un neuromodulador fisiológico a ser un factor neurotóxico. Cuando tiene lugar una sobreactivación del receptor NMDA, entra Ca²⁺ al citosol y se forma el complejo Ca²⁺-CaM, responsable de la activación de la nNOS, responsable de la generación de NO[•] que a su vez difunde a la terminal presináptica liberando más glutamato, estimulando aún más al receptor NMDA. A este proceso se conoce con el nombre de excitotoxicidad glutamatérgica. Este mecanismo puede elevar también la actividad de la mtNOS, debido a la captación por parte de las mitocondrias (que se encuentran localizadas cerca de los receptores NMDA) de Ca²⁺ que está entrando en exceso (Escames y cols., 2004).

La relación o importancia fisiopatológica del NO[•] en la neurotoxicidad del MPTP es que, en esta patología se produce también reacción inflamatoria que activa la iNOS/i-mtNOS en la microglía, contribuyendo a la muerte neuronal; este NO[•] microglial derivado de la iNOS/i-mtNOS es fundamental en la cascada de eventos deletéreos que inducen la muerte dopaminérgica en la SNpc en el modelo de Parkinson inducido por MPTP (Liberatore y cols., 1999).

Los somas de las neuronas dopaminérgicas se hayan principalmente localizadas en la SNpc y proyectan sus axones hacia el ST (Dauer y cols., 2003). Según su mecanismo farmacológico, el MPP⁺, metabolito tóxico del MPTP, es recaptado selectivamente por las neuronas dopaminérgicas. El NO[•] podría contribuir a la degeneración por muerte neuronal, ya que las neuronas dopaminérgicas en la SN están intrínsecamente expuestas a elevados niveles de estrés oxidativo. El metabolismo de la DA por la MAO_B y la autooxidación no enzimática de la misma supone un extra oxidativo en las neuronas dopaminérgicas ya que también conducen a la formación de radicales tóxicos y antioxidantes (Liu y cols., 2002).

El daño oxidativo mitocondrial es la principal característica fisiopatológica en la EP, incluyendo el modelo de Parkinson inducido por MPTP aquí estudiado, y así, los depuradores de radicales libres podrían ser de gran interés, al proteger a las neuronas dopaminérgicas frente al daño oxidativo mitocondrial inducido por la apoptosis y/o por los inhibidores del complejo I. Se han encontrado evidencias que indican que el MPTP es el responsable de la síntesis de OH[•] en el cerebro de ratón, el radical libre más activo y tóxico (Acuña-Castroviejo y cols., 1995; Tretter y cols., 2004). Un incremento en la producción de ROS produce una depleción de las defensas antioxidantes celulares, lo que conduce a su vez a un aumento general del estrés oxidativo y del daño mediado por radicales en la célula, siendo éste el factor final en la cascada de sucesos que conducen al daño neuronal tras activación excitotóxica del receptor NMDA (Atlante y cols., 2001).

La mitocondria es el lugar donde mayor cantidad de ROS se generan, a nivel de la CTE, concretamente en el complejo I y el ciclo redox de la ubiquinona en el complejo III (Acuña-Castroviejo y cols., 2001; Liu y cols., 2002) y pueden originar una fuga de electrones y formación de ROS incluyendo O₂^{•-}, OH[•] y H₂O₂, debido a la reducción parcial del oxígeno por uno, dos y tres electrones, respectivamente (Acuña-Castroviejo, 2001). Altos niveles de O₂^{•-} favorecen el incremento en la producción de ONOO⁻, generando consecuentemente un mayor daño a la CTE (Bockzkowski y cols., 1999; Brown, 2001; Escames y cols., 2003).

Por otro lado, la fuga de electrones directamente al oxígeno molecular tiene como resultado la formación de O₂^{•-} que puede dismutar a H₂O₂ por acción de la Mn-SOD en la mitocondria o por la CuZn-SOD en el citosol. En presencia de metales de transición, la reacción del O₂^{•-} con el H₂O₂ da lugar a OH[•], probablemente el más reactivo y perjudicial de todas las ROS (Acuña-Castroviejo y cols., 1995; Tretter y cols., 2004). El H₂O₂ también puede generarse en el citosol por la MAO. El enzima se encuentra en la membrana externa de la

mitocondria y es especialmente importante para la formación de ROS en las neuronas, donde hay disponibilidad de monoaminas.

El daño generado por los radicales libres está implicado en la inhibición irreversible inducida por el MPP⁺ de la NADH-deshidrogenasa selectivamente, interrumpiendo la CTE. La inhibición del complejo I mitocondrial no es el primer mecanismo por el cual el MPP⁺ preferentemente afecta al comportamiento y muerte de las neuronas dopaminérgicas en el modelo agudo de Parkinson inducido por MPTP, pero existen amplias evidencias que indican que cuando la deficiencia en el complejo I persisten durante un extenso período de tiempo, la acumulación de ROS puede ser significativa, y la disfunción del complejo I podría ser fundamental en la patogénesis de esta patología ya que incrementa el estrés oxidativo y hace vulnerables a las células a agresiones por excitotoxicidad (Atlante y cols., 2001; Sherer y cols., 2002). A su vez, estos radicales libres podrían acumularse en estas células, dañando la mitocondria y creando un círculo vicioso.

El círculo vicioso existente entre la deficiencia del complejo I y la producción de ROS en la cadena respiratoria puede intensificar el estrés oxidativo hasta que se produzca un daño irreversible mitocondrial y de otros componentes celulares y así causar la pérdida selectiva de neuronas dopaminérgicas (Jenner, 2003; Treeter y cols., 2004). Incluso un aumento relativamente pequeño en la concentración de ROS, si persiste, podría ser crítico para iniciar una cascada de eventos que conducen a la muerte celular. Además, la inhibición sistémica del complejo I podría llevar a dañar la respiración y la síntesis de ATP (León y cols., 2004). La SNpc también contiene altos niveles de hierro el cual es un cofactor necesario en la formación de OH[•] a través de la reacción de Fenton, lo que induce la producción de OH[•] en neuronas dopaminérgicas y el consiguiente daño (Speciale, 2002).

Se ha propuesto que la inhibición del complejo I por el MPP⁺ tiene como resultado un incremento en la formación de O₂^{•-} que a su vez puede dismutar a H₂O₂. En ausencia de NO[•], la inhibición del complejo I inducida por el MPP⁺ podría ser suficiente para disminuir el ATP a los niveles críticos que pueden inducir muerte celular. Es posible que en el cerebro el MPP⁺ por sí mismo pueda potenciar la interacción del MPP⁺ y el NO[•] fomentando la producción de NO[•]. La disminución de ATP causada por inhibición del complejo I podría aumentar la toxicidad por glutamato mediante la liberación del bloqueo por Mg²⁺ en el receptor NMDA. Tiene lugar entonces un flujo de Ca²⁺ el cual podría activar la NOS neuronal y por tanto, la producción de NO[•], incrementando la inhibición del complejo I (Brown y cols., 2002; Escames y cols., 2004).

Por tanto, los radicales libres van dañando inexorablemente a la célula y la función mitocondrial va disminuyendo lentamente, pero no solamente debido a las ROS que se generan dentro de la propia organela, sino también a los que recibe del citosol. Como consecuencia, se inhibe la fosforilación oxidativa y disminuye la actividad de la CTE, volviéndose ineficiente.

Para eliminar las ROS y mantener la homeostasis redox celular, los mecanismos antioxidantes están presentes en numerosas células. En el modelo de MPTP se ha observado un incremento de la formación de radicales libres y una disminución de los enzimas antioxidantes. Así, podemos pensar que la muerte neuronal causada por el MPTP es el resultado de una cascada circular de eventos deletéreos que tienen su inicio en la mitocondria por una alteración de la fosforilación oxidativa y que también finalizan en la mitocondria por la activación de la maquinaria de la muerte celular programada.

Por otro lado, hemos encontrado que el MPTP induce la actividad de la iNOS y de la i-mtNOS, básicamente en la SNpc, al mismo tiempo que inhibe la actividad del complejo I en esas mitocondrias. Por consiguiente, el MPTP induce un incremento en la actividad i-mtNOS y la producción de NO[•], lo que conduce a estrés oxidativo y disfunción mitocondrial. Finalmente, tanto en el citosol como en la mitocondria de ST y SN se produce un aumento en los niveles de NO[•] (aumento de los nitritos) así como un incremento del daño a lípidos (observado por la inducción de la LPO). Una elevación de los niveles de lípidos peroxidados nos daría una señal indirecta de estrés oxidativo. Nuestros datos demuestran un incremento de LPO tanto en ST como en SN, aunque el daño es mayor en esta última, donde la inducción de la i-mtNOS es máxima y probablemente responsable de ese aumento de LPO.

Cuando medimos los niveles de MDA y 4HNE, estamos cuantificando la LPO de las membranas mitocondriales de las cuales la interna contiene sólo un 25% de lípidos en su composición, siendo la mayor parte proteínas (Ardail y cols., 1990). La LPO puede dar lugar a una reducción de la densidad de los receptores integrados en las membranas y además alterar la viscosidad de las mismas, afectando al mecanismo de acoplamiento en el caso de la membrana mitocondrial interna. Los pacientes con EP, en los cuales está aumentada la LPO en la SN, existe un aumento de la producción de radicales libres resultado del estrés oxidativo local crónico, lo que puede causar una degeneración progresiva de las neuronas dopaminérgicas (Dexter y cols., 1989). Efectivamente, la SN de estos pacientes contiene altos niveles de malondialdehído (índice de daño peroxidativo), de DA y sus metabolitos deplecionados.

Pero el estrés oxidativo resultante del aumento en la producción de radicales libres no sólo daña a los lípidos, si no también a otras macromoléculas como son las proteínas y el ADN. El estrés oxidativo también puede activar la poli ADP-ribosa sintetasa (PARS), enzima nuclear que interviene en los procesos de reparación del ADN, añadiendo unidades de ADP-ribosa a proteínas nucleares como las histonas (Strosznajder y cols., 2005). Además, en las células dopaminérgicas, el estrés oxidativo generado por la oxidación de la DA puede elevar selectivamente su vulnerabilidad a las toxinas mitocondriales y las vías de degradación de proteínas disfuncionales (Lotharius y cols., 2002). Todas las alteraciones anteriores van a conducir finalmente a la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la SN. En la gran mayoría de las patologías degenerativas, el incremento en la producción de especies oxidantes va

asociado a la perpetuación de un proceso inflamatorio crónico (Emerit y cols., 2004; Floyd, 1999).

Actualmente, los mecanismos de muerte celular específicos de las diversas enfermedades neurodegenerativas sólo se conocen de un modo parcial, estando implicados el estrés oxidativo y las alteraciones en la función mitocondrial, la excitotoxicidad mediada por Ca^{2+} , el NO^* , los mecanismos inmunológicos y la deficiencia en factores tróficos como iniciadores o mediadores de la muerte celular en la EP. Cualquiera que sea el mecanismo que dispare la muerte celular, ésta sólo puede producirse de dos modos: necrosis celular y apoptosis. Se ha señalado que solo el 0,5% de las neuronas de la SN sufren apoptosis en los cerebros normales frente al 2% en cerebros con EP (lo que supone un incremento del 4 por ciento). Estudios con la técnica de TUNEL en cerebros de estos pacientes no han encontrado fragmentación del ADN en neuronas de la SN, locus coeruleus o corteza, pero sí en astrocitos y microglía. Además, la proteína Par-4 (respuesta apoptótica de próstata 4), que es una proteína relacionada con la apoptosis en cáncer de próstata y tejido nervioso, está aumentada en neuronas dopaminérgicas en modelos experimentales de EP y ciertos factores tróficos como el factor neurotrófico derivado de cerebro o BDNF (Murer y cols., 2001) y el GDNF (Teismann y cols., 2003) influyen en el mantenimiento y supervivencia de las neuronas dopaminérgicas, por lo que su deficiencia puede estar implicada en la degeneración y muerte celular presente en esta enfermedad.

A la vista de estos datos, nosotros podemos actuar sobre tres objetivos importantes para reducir o disminuir la progresión de la EP:

- 1.- Recuperando la actividad del complejo I.
- 2.- Inhibiendo la formación de ROS en la mitocondria sin afectar a la respiración.
- 3.- Modulando la producción de NO^* , básicamente el procedente de la iNOS/i-mtNOS, ya que el componente inducible de la NOS es esencial para la neurodegeneración dopaminérgica en la SN inducida por MPTP (la inhibición de la isoforma inducible de la NOS puede ser un objetivo valioso para el desarrollo de nuevas terapias para la EP con el propósito de atenuar la actual pérdida de neuronas dopaminérgicas).

Todos ellos son importantes y atractivos objetivos terapéuticos y pueden constituir un nuevo acercamiento para actuar en las enfermedades o procesos relacionadas con la formación de ROS mitocondriales. Para prevenir el acontecimiento de la enfermedad es importante preservar el ambiente redox y la función mitocondrial de la célula, eludiendo las causas del estrés oxidativo y reforzando o intensificando las defensas antioxidantes.

2. Melatonina, AMK y análogos estructurales sintéticos en la EP.

La aMT es una indolamina, cuya concentración endógena disminuye considerablemente con la edad. La aMT es el principal metabolito de la vía de los metoxiindoles del L-triptófano y se sintetiza tanto en plantas como en animales; concretamente, en el caso de mamíferos se sintetiza en distintos órganos; además, la aMT producida por la glándula pineal se secreta a la circulación cerebral y sistémica (Reiter, 1991).

La aMT presenta determinadas propiedades: (i) es soluble tanto en agua como en lípidos, (ii) a diferencia de los antioxidantes convencionales, cruza fácilmente la barrera hematoencefálica (Borlongan y colbs., 2000; Baydas y colbs., 2003; Acuña-Castroviejo y colbs., 2003); (iii) es un depurador directo de radicales libres (OH^\bullet , peroxilo (ROO^\bullet), $\text{O}_2^{\bullet-}$, NO^\bullet , ONOO^- , ácido peroxinitroso (ONOOH) y O_2) (Zang y colbs., 1998; Reiter y colbs., 2000a), y iv) también posee un efecto antioxidante indirecto (Reiter y colbs., 1995b; Tan y colbs., 2000; Poeggeler y colbs., 2002).

La aMT actúa como un antioxidante fisiológico y farmacológico, y parece ser que sus mecanismos antioxidantes son de mayor complejidad que los que presentan los antioxidantes clásicos, es decir no solo depura radicales libres de forma directa, sino que también puede llevar a cabo este proceso por diferentes vías, como pueden ser la donación de electrones, la captación electrones, 'atrapando' esos radicales libres, reacciones de adición y sustitución. El AFMK y el AMK, dos metabolitos de la aMT, también presentan una importante capacidad para depurar radicales libres (Tan y colbs., 2001; Acuña-Castroviejo y colbs., 2003). El AFMK puede formarse a partir de la aMT por vía enzimática (IDO, mieloperoxidasa, formamidasa, hemoperoxidasa) y no-enzimática a través de la escisión oxidativa del anillo pirrólico. La formación de AFMK es fisiológicamente significativa (Greenamyre y colbs., 2001). El AMK deriva de la deformilación de AFMK (Hirata y colbs., 1974; Hardeland y colbs., 2005). Estas dos kinurenaminas metoxiladas presentan propiedades neuroprotectoras y depuradoras de radicales libres (Tan y colbs., 2001, Guenther y colbs., 2005) y, recientemente, hemos demostrado el efecto inhibitor del AMK sobre la actividad nNOS en condiciones fisiológicas (León y colbs., 2006).

Algunas de las áreas más prometedoras, la modulación del metabolismo mitocondrial por la aMT y acciones de sus metabolitos kinurenámicos, merecen una atención particular. Desde que la mitocondria ha sido considerada el principal objetivo en los estudios terapéuticos de antioxidantes que penetran la barrera hematoencefálica, el uso de aMT (o AMK) podría considerarse de gran interés en el tratamiento de la EP (Khaldy y colbs., 2003). Una parte importante de las acciones descritas de la aMT en el cerebro están relacionadas con la inhibición de la excitación de los receptores NMDA y ello podría estar en conexión con la actividad antioxidante y/o inhibición de la nNOS e iNOS (Escames y colbs., 2004).

Experimentalmente, la aMT es un neuroprotector frente a los procesos neurodegenerativos ya que previene el daño inicial; la neuroprotección por aMT frente al daño neuronal inducido por MPTP está, relacionado con:

- Este antioxidante depura las ROS generadas *in situ*, y confiere protección frente a la neurotoxicidad (Mayo y colbs., 2005). Su habilidad para depurar OH[•] y limitar así, la autooxidación de la DA (Khaldy y colbs., 2000), consecuentemente reduciendo el estrés oxidativo nigrostriatal.
- Por otro lado, la aMT aumenta la eficiencia de la CTE mitocondrial, ya que contrarresta la inhibición del complejo I inducida por MPTP (Khaldy y colbs., 2003; Srinivasan y colbs., 2005), un efecto que preserva la producción de ATP y la supervivencia celular (Acuña-Castroviejo y colbs., 2001).
- La aMT inhibe las isoformas constitutivas de la NOS, tanto la nNOS citosólica como la c-mtNOS de forma dosis dependiente mediante un mecanismo que implica su unión con el complejo Ca²⁺-CAM. La aMT inhibe también la expresión de la iNOS/i-mtNOS. En consecuencia, la aMT contrarresta el estrés oxidativo inducido por el daño mitocondrial (Acuña-Castroviejo y colbs., 2001; Escames y colbs., 2006; López y colbs., 2006). Los datos muestran un efecto de la aMT sobre la fluidez de la membrana mitocondrial interna y además sostienen que la mitocondria es un objetivo importante para la acción de la aMT.
- La aMT contrarresta la LPO (Khaldy y colbs., 2003; León y colbs., 2004; Escames y colbs., 2006).
- El tratamiento con aMT reduce la gliosis ya que neutraliza esos radicales libres (Baydas y colbs., 2006).
- La aMT protege de la apoptosis (León y colbs., 2004).
- La aMT es capaz de modular la actividad y expresión de varios enzimas antioxidantes, incluyendo la SOD y la GPx, a la vez que inhibe el daño al ADN (Antolín y colbs., 1996; Reiter y colbs., 2000a).

El papel antioxidante de la indolamina parece estar implicado en su acción neuroprotectora; de este modo, nos preguntamos si su metabolito y/o sus derivados sintéticos podrían también prevenir *'in vivo'* frente al daño neuronal inducido por MPTP.

Como indican nuestros resultados, el AMK tiene efectos similares a la aMT: contrarresta el aumento de iNOS, i-mtNOS y estrés oxidativo en la SN debida al MPTP, restaurando la función mitocondrial. Además, al igual que la aMT, el AMK se comporta como un agente neuroprotector endógeno susceptible de ser utilizado como herramienta farmacológica.

Aunque el mecanismo de acción de la aMT puede ser mediado o no por receptor, el AMK puede ser el responsable de algunos de los efectos encontrados para la indolamina (León y

colbs., 2005). Según los resultados podemos observar que el AMK es más activo que la aMT, por ejemplo, incrementando la actividad del complejo I y IV de la CTE e inhibiendo la actividad de la NOS (Acuña-Castroviejo y colbs., 2003).

Estos resultados avalan el uso terapéutico neuroprotector de la indolamina en pacientes con la EP como cotratamiento con terapias convencionales, ya que la aMT es una sustancia endógena, no tóxica y antioxidante y lo más importante, sin efectos secundarios conocidos. Adicionalmente, se han llevado a cabo estudios epidemiológicos de individuos que han usado aMT diariamente; al presentar una toxicidad muy baja y al ser mucho más barata que otros fármacos que se prescriben, podría ser probada frente al desarrollo o progresión de la EP. El siguiente desafío es encontrar fármacos clínicamente prácticos que puedan minimizar la producción mitocondrial de ROS sin afectar al funcionamiento normal mitocondrial, como ocurre con la aMT y el AMK.

Siguiendo esta línea, hemos estudiado numerosos derivados sintéticos de la aMT '*in vitro*', de los cuales hemos evaluado, '*in vivo*', los más significativos respecto al nivel de inhibición que presentaban frente a la nNOS e iNOS y también, según su selectividad. Entre los compuestos evaluados, encontramos kinureninas (QFF-100-KI, QFF-101-KI, QFF-102-KI y QFF-103-KI), kinurenaminas (QFF-104-KIN o AMK, QFF-108-KIN y QFF-111-KIN), pirazolininas (QFF-118-PI) y pirroles (QFF-205-PIR y QFF-212-PIR). La vía kinurenínica es la principal ruta del metabolismo del triptófano y está implicada en la disfunción cerebral de varias enfermedades (Stone y colbs., 2002). La vía se activa a través de radicales libres, interferones y citoquinas producidos durante una respuesta inflamatoria. Entonces, las enzimas responsables de convertir el triptófano en kinureninas, laIDO y laTDO, se activan. El L-triptófano se metaboliza en el cerebro por medio de dos vías principales, dando lugar a metoxindoles y kinureninas. De sobra es conocido que en la vía metabólica kinurenínica del triptófano se sintetizan diferentes metabolitos, como el ácido quinolínico, la L-kinurenina y el ácido kinurenínico los cuales pueden interactuar con el receptor NMDA (Schwarcz y colbs., 2002). El ácido quinolínico y la L-kinurenina son agonistas del complejo receptor NMDA y están implicados en la patogénesis de diversos desórdenes neurológicos, mientras que el ácido kinurenínico es un antagonista no selectivo del sitio de reconocimiento de la glicina_B del receptor NMDA y muestra propiedades neuroprotectoras. Por tanto, estos metabolitos del triptófano interactúan de forma opuesta frente al complejo receptor NMDA (León y colbs., 1998a; Schwarcz, 2004). La vía kinurenínica también incluye la formación de 3-hidroxicinurenina y ácido 3-hidroxiantranílico, compuestos que pueden generar radicales libres y consecuentemente estrés oxidativo, incrementando los niveles de LPO (Forrest y colbs., 2004). Los principales metabolitos naturales de la aMT son las kinureninas (Hirata y colbs., 1974). Además, desde que la vía kinurenínica conduce a la formación de NADH, es posible que cambios en el metabolismo de las kinureninas se traduzcan en reducidas concentraciones

de ácido kinurenínico, el cual puede colaborar en la degeneración que tiene lugar en la EP (Ogawa y colbs., 2002).

Parece ser que la aMT y las kinureninas actúan de diferente manera y ello puede deberse a que la aMT presenta acciones receptor-dependientes y receptor-independientes (Acuña-Castroviejo y colbs., 1995). El hecho que algunos metabolitos de la vía kinurenínica sean ligandos de los receptores de glutamato, plantea la posibilidad de diseñar derivados sintéticos de los mismos como antagonistas NMDA y NOS para su uso en desórdenes neurológicos, los cuales podrían ser el resultado, en parte, de un desequilibrio en las vías metabólicas del L-triptófano (rutas metoxindólica y kinurenínica) (Muñoz-Hoyos y colbs., 1997; Muñoz-Hoyos y colbs., 1998). En el SNC, los metabolitos kinurenínicos están influidos considerablemente por los niveles periféricos y pueden generar ROS directamente, induciendo estrés oxidativo en el cerebro. Se establece entonces un ciclo en el que la actividad de la vía kinurenínica puede aumentar el estrés oxidativo y el $O_2^{\cdot-}$ puede activar la IDO (Mackay y colbs., 2006).

Aunque en el cerebro los niveles de las kinureninas pueden manipularse modificando la actividad de los enzimas de la vía kinurenínica, podrían sintetizarse nuevos agentes con mayor accesibilidad al cerebro y propiedades farmacodinámicas. Las causas que podrían justificar el uso de estos fármacos kinurenérgicos son las siguientes:

- I) Los inhibidores enzimáticos podrían utilizarse para interferir con determinados efectos fisiológicos de las kinureninas neuroactivas.
- II) Unas manipulaciones adecuadas en las vías kinurenérgicas podrían prevenir o corregir daños generados por un defecto en el metabolismo de la vía kinurenínica, como por ejemplo, los causados por un enzima deficiente.
- III) Los fármacos kinurenérgicos deben ser usados en situaciones donde se alteren los niveles de ácido quinolínico, la L-kinurenina y el ácido kinurenínico como consecuencia de una respuesta a un daño y que consecuentemente pueda participar en eventos patológicos.
- IV) Los fármacos kinurenérgicos podrían ser usados con el único propósito de limitar la hiperexcitabilidad neuronal patológica, proporcionando neuroprotección (Schwarcz y colbs., 2002).

Por tanto, el interés de estas kinureninas sintéticas reside en buscar compuestos neuroprotectores y que puedan aplicarse clínicamente.

En el estudio realizado con los diferentes compuestos sintéticos analizados y cuya síntesis ya ha sido publicada (Camacho y colbs., 2002; Camacho y colbs., 2004; Carrión y

colbs., 2004; Entrena y colbs., 2005), hemos encontrado diferencias significativas; de esta manera, podríamos resumir que:

- Todos los compuestos van a recuperar a nivel de los controles la actividad del complejo I dañado por el tratamiento con MPTP en ratones, tanto en el ST como en la SN y especialmente por encima de estos valores controles, la kinurenina QFF-100-KI, la kinurenamina QFF-104-KIN, la pirazolina QFF-118-PI y el pirrol QFF-212-PIR.
- En cuanto al estudio de la NOS, en el citosol de ST apenas hay cambios en el componente inducible, ya que como se ha demostrado en varios trabajos, prácticamente no se produce daño a nivel de iNOS, pero sí existe una inhibición de la nNOS por parte de todos los compuestos, especialmente de las kinureninas QFF-100-KI y QFF-101-KI, las kinurenaminas QFF-108-KIN y QFF-111-KIN y la pirazolina QFF-118-PI se muestran bastante eficaces en inhibir esta nNOS, los pirroles (QFF-205-PIR y QFF-212-PIR) lo son bastante menos. Curiosamente podemos observar que la kinurenina QFF-102-KI, actúa de forma excepcional, es decir, es un agonista de dicha isoforma. En la SN citosólica, que es donde realmente se produce el daño, los mismos compuestos que inhibían la nNOS, van a presentar el mismo comportamiento, aunque cabe matizar que la proporción de inhibición es menor que en el caso del ST; incluso QFF-102-KI va a seguir, induciendo la nNOS. Por otro lado, del estudio del comportamiento de los compuestos frente a la i-mtNOS de la SN, concluimos que los más eficaces son las kinureninas QFF-102-KI y QFF-103-KI y los pirroles QFF-205-PIR y QFF-212-PIR mientras que no existe inhibición por parte de la kinurenamina QFF-108-KIN y apenas de la kinurenina QFF-101-KI. Pero el estudio de mayor interés se encuentra en la mitocondria, donde el comportamiento de estos compuestos presenta modificaciones respecto del citosol; en el caso de la c-mtNOS de la SN, destacamos un compuesto por encima del resto: el QFF-111-KIN y respecto a la c-mtNOS estriatal, existen dos compuestos que destacan por la proporción en la que la inhiben: QFF-108-KIN y QFF-111-KIN, siendo las kinureninas las de menor grado de inhibición. Finalmente, los compuestos QFF-102-KI, QFF-205-PIR y QFF-212-PIR son los que presentan mayor capacidad para inhibir la i-mtNOS, tanto en el caso de la SN como en el del citosol.
- Al estudiar los niveles de nitritos, y por tanto la producción de NO^{*}, podemos ver por un lado, que en el citosol (tanto en ST como en SN), las kinureninas QFF-102-KI y QFF-103-KI, la pirazolina QFF-118-PI y los pirroles son los compuestos que más disminuyen los nitritos, mientras que la QFF-101-KI apenas modifica esos valores de nitritos y la kinurenamina QFF-108-KIN, a diferencia del resto, no inhibe esos nitritos. Recordemos también, que este mismo compuesto no inhibía la iNOS, por lo que tampoco inhibe la

producción de NO[•]. En la mitocondria (de forma similar en ST y SN), todos los compuestos inhiben los nitritos, incluso por debajo de los valores controles (a excepción de la QFF-101-KI y la kinurenamina QFF-108-KIN, siendo nuevamente los compuestos más efectivos los mismos que en el caso del citosol, es decir, las kinureninas QFF-102-KI y QFF-103-KI, la pirazolina QFF-118-PI y los pirroles; pero a diferencia del citosol, la kinurenamina QFF-108-KIN sí es capaz de reducir esos nitritos (podría pensarse que actúa únicamente a nivel mitocondrial). Podemos, por tanto, deducir que los nitritos provienen fundamentalmente del componente inducible, tanto en la mitocondria como en el citosol (Morizane y cols., 2005).

→ Finalmente analizamos la LPO como marcador de estrés oxidativo. En el caso del citosol (ST y SN), se puede observar que QFF-102-KI, QFF-103-KI, QFF-205-PIR y QFF-212-PIR son los compuestos que más disminuyen la LPO, mientras que QFF-101-KI y QFF-108-KIN apenas modifican esos valores de LPO. Ya, en la mitocondria (tanto de ST como de SN), todos los compuestos inhiben la LPO, presentando menor eficacia la kinurenina QFF-101-KI y la kinurenamina QFF-108-KIN y siendo más eficaces QFF-102-KI, QFF-103-KI, QFF-205-PIR y QFF-212-PIR, que sitúan dichos niveles de LPO por debajo de los valores controles; podemos ver de nuevo que en la mitocondria la kinurenamina QFF-108-KIN sí es capaz de actuar, disminuyendo esos niveles de LPO (confirmaría la hipótesis de que solamente actúa a nivel mitocondrial).

3. Resumen de los diferentes niveles de actuación de la melatonina y sus metabolitos en la EP.

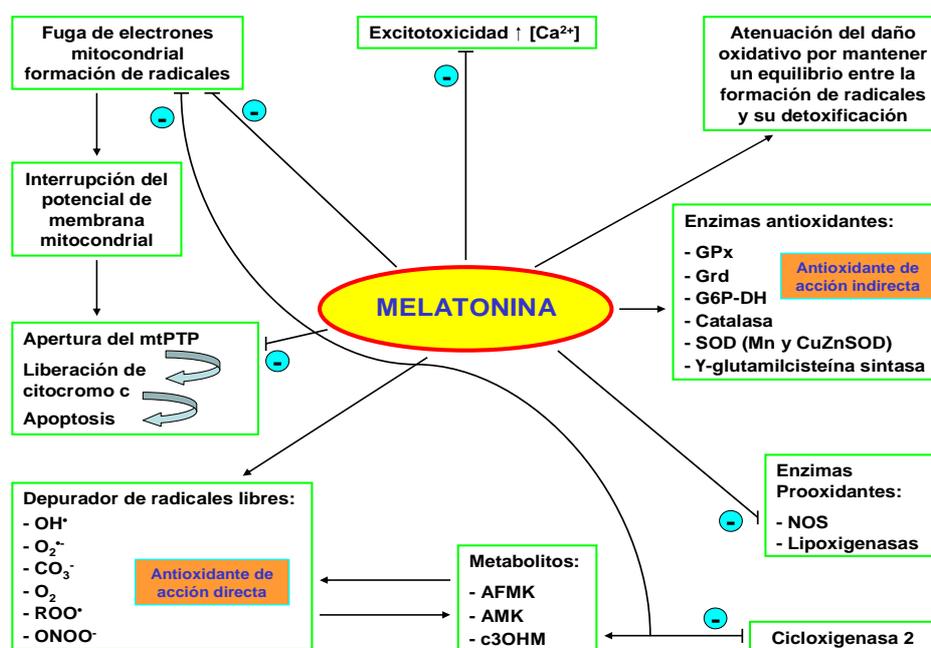


Figura 71. Diferentes niveles de actuación de la aMT y sus metabolitos.

Conclusiones

De los resultados obtenidos se deducen las siguientes conclusiones:

1. Tras la administración de MPTP, se produce un daño en la CTE a nivel del complejo I. Además, y según las últimas hipótesis inflamatorias, se observa un aumento de la isoforma inducible de la NOS tanto citosólica como mitocondrial, que va paralelo al aumento de los niveles de NO^{\bullet} y de LPO como marcador de estrés oxidativo. Todos estos fenómenos reproducen la fisiopatología de la EP y confirman la existencia de un proceso inflamatorio en esta enfermedad neurodegenerativa.
2. Las mitocondrias de cerebro poseen una mtNOS con un componente constitutivo (mtNOS) y otro inducible (i-mtNOS). Fundamentalmente la i-mtNOS se induce como consecuencia de la administración de MPTP.
3. El proceso neurodegenerativo de la EP parece depender de una inducción de las formas inducibles de la NOS, la iNOS y la i-mtNOS, en la SN, mientras que este proceso es mucho menos notorio en el ST, donde el daño que se produce depende principalmente de un aumento de la nNOS.
4. La inhibición de la i-mtNOS, fundamentalmente en la SNpc, reduce el daño originado en la EP inducida por MPTP. Parece ser, por tanto, que el NO^{\bullet} derivado de la i-mtNOS es responsable en gran parte del aumento del estrés oxidativo y disfunción mitocondrial, precursoras de la muerte neuronal.
5. La aMT y también su metabolito AMK, contrarrestan el daño citosólico y mitocondrial en la EP recuperando la actividad del complejo I dañado, inhibiendo la actividad de la i-mtNOS y por tanto disminuyendo la producción de NO^{\bullet} , y normalizando el status redox mitocondrial.

6. Otros análogos sintéticos de la aMT y AMK han proporcionado actividad neuroprotectora frente a los procesos fisiopatológicos de la EP aquí analizados. Esos resultados abren una nueva línea en la búsqueda de nuevos agentes farmacológicos que, como el AMK, puedan ser usados en la clínica de la EP. Los resultados también avalan el uso de la aMT en el cotratamiento de la EP, debido a su eficacia para mantener la función mitocondrial y reducir la inflamación, y su falta de efectos secundarios.

Bibliografía

- Acuña-Castroviejo D, Lowenstein PR, Rosenstein R, Cardinali DP. Diurnal variations of benzodiazepine binding in rat cerebral cortex: disruption by pinealectomy. *J Pineal Res.* 1986;3:101-9.
- Acuña-Castroviejo D, Pablos MI, Menéndez-Peláez A, Reiter RJ. Melatonin receptors in purified cell nuclei of liver. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 1993;82:253-6.
- Acuña-Castroviejo D, Escames G, Macías M, Muñoz Hoyos A, Molina Carballo A, Arauzo M, Montes R. Cell protective role of melatonin in the brain. *J Pineal Res.* 1995;19:57-63.
- Acuña-Castroviejo D, Coto-Montes A, Gaia Monti M, Ortiz GG, Reiter RJ. Melatonin is protective against MPTP-induced striatal and hippocampal lesions. *Life Sci.* 1997;60:PL23-9.
- Acuña-Castroviejo D, Martín M, Macías M, Escames G, León J, Khaldy H, Reiter RJ. Melatonin, mitochondria, and cellular bioenergetics. *J Pineal Res.* 2001;30:65-74.
- Acuña-Castroviejo D, Escames G, Carazo A, León J, Khaldy H, Reiter RJ. Melatonin, mitochondrial homeostasis and mitochondrial-related diseases. *Curr Top Med Chem.* 2002;2:133-51.
- Acuña-Castroviejo D, Escames G, León J, Carazo A, Khaldy H. Mitochondrial regulation by melatonin and its metabolites. *Adv Exp Med Biol.* 2003;527:549-57.
- Albin RL, Young AB, Penney JB. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci.* 1989;12:366-75.
- Alexander GE, DeLong MR, Strick PL. Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Annu Rev Neurosci.* 1986;9:357-81.
- Alexander GE, Crutcher MD, DeLong MR. Basal ganglia-thalamocortical circuits: parallel substrates for motor, oculomotor, "prefrontal" and "limbic" functions. *Prog Brain Res.* 1990;85:119-46.
- Antolín I, Rodríguez C, Sáinz RM, Mayo JC, Uria H, Kotler ML, Rodríguez-Colunga MJ, Tolivia D, Menéndez-Pelaez A. Neurohormone melatonin prevents cell damage: effect on gene expression for antioxidant enzymes. *FASEB J.* 1996 Jun;10(8):882-90
- Antolín I, Mayo JC, Sáinz RM, del Brio Mde L, Herrera F, Martín V, Rodríguez C. Protective effect of melatonin in a chronic experimental model of Parkinson's disease. *Brain Res.* 2002;943:163-73.
- Anton-Tay F. Melatonin: effects on brain function. *Adv Biochem Psychopharmacol.* 1974;11:315-24.

- Ardail D, Privat JP, Egret-Charlier M, Levrat C, Lerme F, Louisot P. Mitochondrial contact sites. Lipid composition and dynamics. *J Biol Chem.* 1990;265:18797-802.
- Armstrong KJ, Niles LP. Induction of GDNF mRNA expression by melatonin in rat C6 glioma cells. *Neuroreport.* 2002;13:473-5.
- Artacoz-Sanz MT, Viñes-Rueda JJ. Estimación de la prevalencia de la Enfermedad de Parkinson en Navarra. Estudio farmacoepidemiológico del consumo de antiparkinsonianos. *Rev. Esp. Salud Pública* 1995;69:479-85.
- Atlante A, Calissano P, Bobba A, Giannattasio S, Marra E, Passarella S. Glutamate neurotoxicity, oxidative stress and mitochondria. *FEBS Lett.* 2001;497:1-5.
- Axelrod J, Weissbach H. Enzymatic O-methylation of N-acetylserotonin to melatonin. *Science.* 1960;131:1312.
- Baba M, Nakajo S, Tu PH, Tomita T, Nakaya K, Lee VM, Trojanowski JQ, Iwatsubo T. Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Am J Pathol.* 1998;152:879-84.
- Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell.* 2005;120:483-95.
- Banati RB, Daniel SE, Blunt SB. Glial pathology but absence of apoptotic nigral neurons in long-standing Parkinson's disease. *Mov Disord.* 1998;13:221-7.
- Bandyopadhyay U, Das D, Banerjee RK. Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis. *Curr Sci* 1999;77:658-66.
- Bates TE, Loesch A, Burnstock G, Clark JB. Immunocytochemical evidence for a mitochondrially located nitric oxide synthase in brain and liver. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;213:896-900.
- Baydas G, Reiter RJ, Nedzvetskii VS, Yasar A, Tuzcu M, Ozveren F, Canatan H. Melatonin protects the central nervous system of rats against toluene-containing thinner intoxication by reducing reactive gliosis. *Toxicol Lett.* 2003;137:169-74.
- Baydas G, Ozer M, Yasar A, Koz ST, Tuzcu M. Melatonin prevents oxidative stress and inhibits reactive gliosis induced by hyperhomocysteinemia in rats. *Biochemistry (Mosc).* 2006;71:S91-5.
- Benítez-King G, Rios A, Martinez A, Anton-Tay F. In vitro inhibition of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II activity by melatonin. *Biochim Biophys Acta.* 1996;1290:191-6.
- Bergman H, Wichmann T, DeLong MR. Reversal of experimental parkinsonism by lesions of the subthalamic nucleus. *Science.* 1990;249:1436-8.

- Bergman H, Deuschl G. Pathophysiology of Parkinson's disease: from clinical neurology to basic neuroscience and back. *Mov Disord.* 2002;17:S28-40.
- Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci.* 2000;3:1301-6.
- Betarbet R, S  ller TB, Greenamyre JT. Ubiquitin proteasome system and Parkinson's diseases. *Experimental Neurology.* 2005;191:S17-27.
- Blandini F, Nappi G, Tassorelli C, Martignoni E. Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 2000;62:63-88.
- Boczkowski J, Lisdero CL, Lanone S, Samb A, Carreras MC, Boveris A, Aubier M, Poderoso JJ. Endogenous peroxynitrite mediates mitochondrial dysfunction in rat diaphragm during endotoxemia. *FASEB J.* 1999;13:1637-46.
- Bolam JP, Hanley JJ, Booth PA, Bevan MD. Synaptic organisation of the basal ganglia. *J Anat.* 2000;196:527-42.
- Bonnet AM, Houeto JL. Pathophysiology of Parkinson's disease. *Biomed Pharmacother.* 1999;53:117-21.
- Borlongan CV, Yamamoto M, Takei N, Kumazaki M, Ungsuparkorn C, Hida H, Sanberg PR, Nishino H. Glial cell survival is enhanced during melatonin-induced neuroprotection against cerebral ischemia. *FASEB J.* 2000;14:1307-17.
- Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86:9030-3.
- Brookes PS, Levonen AL, Shiva S, Sarti P, Darley-Usmar VM. Mitochondria: regulators of signal transduction by reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radic Biol Med.* 2002;33:755-64.
- Brown EE, Damsma G, Cumming P, Fibiger HC. Interstitial 3-methoxytyramine reflects striatal dopamine release: an in vivo microdialysis study. *J Neurochem.* 1991;57:701-7.
- Brown GC. Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase. *Biochim Biophys Acta.* 2001;1504:46-57.
- Brown GC, Borutaite V. Nitric oxide inhibition of mitochondrial respiration and its role in cell death. *Free Radic Biol Med.* 2002;33:1440-50.
- Brown TP, Rumsby PC, Capleton AC, Rushton L, Levy LS. Pesticides and Parkinson's disease--is there a link? *Environ Health Perspect.* 2006;114:156-64.

- Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med.* 2000;29:222-30.
- Cahill GM, Besharse JC. Retinal melatonin is metabolized within the eye of *xenopus laevis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86:1098-102.
- Camacho ME, León J, Carrión A, Entrena A, Escames G, Khaldy H, Acuña-Castroviejo D, Gallo MA, Espinosa A. Inhibition of nNOS activity in rat brain by synthetic kynurenes: structure-activity dependence. *J Med Chem.* 2002;45:263-74.
- Camacho ME, León J, Entrena A, Velasco G, Carrión MD, Escames G, Vivó A, Acuña-Castroviejo D, Gallo MA, Espinosa A. 4,5-dihydro-1H-pyrazole derivatives with inhibitory nNOS activity in rat brain: synthesis and structure-activity relationships. *J Med Chem.* 2004;47:5641-50.
- Carlberg C, Wiesenberg I. The orphan receptor family RZR/ROR, melatonin and 5-lipoxygenase: an unexpected relationship. *J Pineal Res.* 1995;18:171-8.
- Carlson AJ. Science versus life. *J Am Med Assoc.* 1955;157:1437-41.
- Carreras MC, Franco MC, Peralta JG, Poderoso JJ. Nitric oxide, complex I, and the modulation of mitochondrial reactive species in biology and disease. *Mol Aspects Med.* 2004;25:125-39.
- Carrión MD, Camacho ME, León J, Escames G, Tapias V, Acuña-Castroviejo D, Gallo MA, Espinosa A. Synthesis and iNOS/nNOS inhibitory activities of new benzoylpyrazoline derivatives. *Tetrahedron.* 2004;60:4051-69.
- Cazevieuille C, Safa R, Osborne NN. Melatonin protects primary cultures of rat cortical neurones from NMDA excitotoxicity and hypoxia/reoxygenation. *Brain Res.* 1997;768:120-4.
- Chen ST, Chuang JI, Hong MH, Li EI. Melatonin attenuates MPP⁺-induced neurodegeneration and glutathione impairment in the nigrostriatal dopaminergic pathway. *J Pineal Res.* 2002;32:262-9.
- Chinopoulos C, Adam-Vizi V. Calcium, mitochondria and oxidative stress in neuronal pathology. Novel aspects of an enduring theme. *FEBS J.* 2006;273:433-50.
- Chung HY, Sung B, Jung KJ, Zou Y, Yu BP. The molecular inflammatory process in aging. *Antioxid Redox Signal.* 2006;8:572-81.
- Chung SY, Han SH. Melatonin attenuates kainic acid-induced hippocampal neurodegeneration and oxidative stress through microglial inhibition. *J Pineal Res.* 2003;34:95-102.

- Conway S, Drew JE, Mowat ES, Barrett P, Delagrangé P, Morgan PJ. Chimeric melatonin mt1 and melatonin-related receptors. Identification of domains and residues participating in ligand binding and receptor activation of the melatonin mt1 receptor. *J Biol Chem.* 2000;275:20602-9.
- Costa C, Castiñeira MC. Enfermedad de Parkinson. Guías clínicas en Atención Primaria 1. 2001;42.
- Coulom H, Birman S. Chronic exposure to rotenone models sporadic Parkinson's disease in *Drosophila melanogaster*. *J Neurosci.* 2004;24:10993-8.
- Crespo E, Macias M, Pozo D, Escames G, Martín M, Vives F, Guerrero JM, Acuna-Castroviejo D. Melatonin inhibits expression of the inducible NO synthase II in liver and lung and prevents endotoxemia in lipopolysaccharide-induced multiple organ dysfunction syndrome in rats. *FASEB J.* 1999;13:1537-46.
- Cuzzocrea S, Reiter RJ. Pharmacological actions of melatonin in acute and chronic inflammation. *Curr Top Med Chem.* 2002;2:153-65.
- Dabbeni-Sala F, Di Santo, Franceschini D, Skaper SD, Giusti P. Kainic acid induces selective mitochondrial oxidative phosphorylation enzyme dysfunction in cerebellar granule neurons: protective effects of melatonin and GSH ethyl ester. *FASEB J.* 2001;15:1786-8.
- Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron.* 2003;39:889-909.
- Davies KJ. The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: a new paradigm for oxidative stress. *IUBMB Life.* 1999;48:41-7.
- Dawson TM, Dawson VL. Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. *Science.* 2003;302:819-22.
- Dawson VL, Dawson TM. Nitric oxide actions in neurochemistry. *Neurochem Int.* 1996;29:97-110.
- Deng WG, Tang ST, Tseng HP, Wu KK. Melatonin suppresses macrophage cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression by inhibiting p52 acetylation and binding. *Blood.* 2006;108:518-24.
- Dexter DT, Carter CJ, Wells FR, Javoy-Agid F, Agid Y, Lees A, Jenner P, Marsden CD. Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. *J Neurochem.* 1989;52:381-9.
- Di Monte DA. The environment and Parkinson's disease: is the nigrostriatal system preferentially targeted by neurotoxins? *Lancet Neurol.* 2003;2:531-8.
- Duchen MR. Contributions of mitochondria to animal physiology: from homeostatic

sensor to calcium signalling and cell death. *J Physiol.* 1999;516:1-17.

Dunigan CD, Shamo AE. Identification of the major transport pathway for the parkinsonism-inducing neurotoxin 1-methyl-4-phenylpyridinium. *Neuroscience.* 1996;75:37-41.

Dykens JA. Isolated cerebral and cerebellar mitochondria produce free radicals when exposed to elevated Ca^{2+} and Na^+ : implications for neurodegeneration. *J Neurochem.* 1994;63:584-91.

Ebadi M, Srinivasan SK, Baxi MD. Oxidative stress and antioxidant therapy in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 1996;48:1-19.

Eberhardt O, Schulz JB. Apoptotic mechanisms and antiapoptotic therapy in the MPTP model of Parkinson's disease. *Toxicol Lett.* 2003;139:135-51.

Elsworth JD, Roth RH. Dopamine síntesis, uptake, metabolism, and receptors: relevance to gene therapy of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 1997;144:4-9.

Emerit J, Edeas M, Bricaire F. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomed Pharmacother.* 2004;58:39-46.

Escames G, León J, Macías M, Khaldy H, Acuña-Castroviejo D. Melatonin counteracts lipopolysaccharide-induced

expression and activity of mitochondrial nitric oxide synthase in rats. *FASEB J.* 2003;17:932-4.

Escames G, León J, López LC, Acuña-Castroviejo D. Mechanisms of N-methyl-D-aspartate receptor inhibition by melatonin in the rat striatum. *J Neuroendocrinol.* 2004;16:929-35.

Escames G, López LC, Tapias V, Utrilla P, Reiter RJ, Hitos AB, León J, Rodríguez MI, Acuña-Castroviejo D. Melatonin counteracts inducible mitochondrial nitric oxide synthase-dependent mitochondrial dysfunction in skeletal muscle of septic mice. *J Pineal Res.* 2006;40:71-8.

Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol.* 1990;186:407-21.

Estornell E, Fato R, Palloti F, Lenaz G. Assay conditions for the mitochondrial NADH: coenzyme Q oxidoreductase. *FEBS Lett* 1993;332:127-31.

Fahn S, Sulzer D. Neurodegeneration and neuroprotection in Parkinson disease. *NeuroRx.* 2004;1:139-54.

Fedorow H, Tribl F, Halliday G, Gerlach M, Riederer P, Double KL. Neuromelanin in human dopamine neurons: comparison with peripheral melanins and relevance to

- Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 2005;75:109-24.
- Floyd RA. Neuroinflammatory processes are important in neurodegenerative diseases: an hypothesis to explain the increased formation of reactive oxygen and nitrogen species as major factors involved in neurodegenerative disease development. *Free Radic Biol Med.* 1999;26:1346-55.
- Forno LS, DeLanney LE, Irwin I, Di Monte D, Langston JW. Astrocytes and Parkinson's disease. *Prog Brain Res.* 1992;94:429-36.
- Forrest CM, Mackay GM, Stoy N, Egerton M, Christofides J, Stone TW, Darlington LG. Tryptophan loading induces oxidative stress. *Free Radic Res.* 2004;38:1167-71.
- Frandsen U, López-Figueroa M, Hellsten Y. Localization of nitric oxide synthase in human skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;227:88-93.
- Fujiwara M, Shibata M, Watanabe Y, Nukiwa T, Hirata F, Mizuno N, Hayaishi O. Indoleamine 2,3-dioxygenase. Formation of L-kynurenine from L-tryptophan in cultured rabbit pineal gland. *J Biol Chem.* 1978;253:6081-5.
- Gandhi S, Wood NW. Molecular pathogenesis of Parkinson's disease. *Hum Mol Genet.* 2005;14:2749-55.
- Gasser T. Genetics of Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol.* 2005;18:363-9.
- Gerlach M, Riederer P, Przuntek H, Youdim MB. MPTP mechanisms of neurotoxicity and their implications for Parkinson's disease. *Eur J Pharmacol.* 1991;208:273-86.
- Gibbs FP, Vriend J. The half-life of melatonin elimination from rat plasma. *Endocrinology.* 1981;109:1796-8.
- Goetz CG, Chmura TA, Lanska DJ. Seminal figures in the history of movement disorders: Sydenham, Parkinson, and Charcot: Part 6 of the MDS-sponsored history of Movement Disorders exhibit, Barcelona, June 2000. *Mov Disord.* 2001;16:537-40.
- Gotz ME, Freyberger A, Riederer P. Oxidative stress: a role in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl.* 1990;29:241-9.
- Green LC, Ruiz de Luzuriaga K, Wagner DA, Rand W, Istfan N, Young VR, Tannenbaum SR. Nitrate biosynthesis in man. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1981;78:7764-8.
- Greenamyre JT, MacKenzie G, Peng TI, Stephans SE. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Biochem Soc Symp.* 1999;66:85-97.

- Greenamyre JT, Sherer TB, Betabert R, Panov AV. Complex I and Parkinson's disease. *IUBMB Life*. 2001;52:135-41.
- Greene JG, Greenamyre JT. Bioenergetics and glutamate excitotoxicity. *Prog Neurobiol*. 1996;48:613-34.
- Guenther AL, Schmidt SI, Laatsch H, Fotso S, Ness H, Ressemeyer AR, Poeggeler B, Hardeland R. Reactions of the melatonin metabolite AMK (N1-acetyl-5-methoxykynuramine) with reactive nitrogen species: formation of novel compounds, 3-acetamidomethyl-6-methoxycinnolinone and 3-nitro-AMK. *J Pineal Res*. 2005;39:251-60.
- Guerrero D, García-Delgado M, Larumbe R, Vizmanos JL, Novo FJ, Vines JJ. Prevalence of CYPD6 mutations in sporadic Parkinson's disease: case-control study. *An Sist Sanit Navar*. 2002;25:147-54.
- Hald A, Lotharius J. Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: is there a causal link? *Exp Neurol*. 2005;193:279-90.
- Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J*. 1984;219:1-14.
- Hamani C, Saint-Cyr JA, Fraser J, Kaplitt M, Lozano AM. The subthalamic nucleus in the context of movement disorders. *Brain*. 2004;127:4-20.
- Hardeland R, Pandi-Perumal SR. Melatonin, a potent agent in antioxidative defense: actions as a natural food constituent, gastrointestinal factor, drug and prodrug. *Nutr Metab (Lond)*. 2005;2:22.
- Harrower TP, Michell AW, Barrer RA. Lewy bodies in Parkinson's disease: protectors or perpetrators? *Exp Neurol*. 2005;195:1-6.
- Hartmann A. Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2005;11:S9-15.
- Haynes V, Elfering S, Traaseth N, Giulivi C. Mitochondrial nitric-oxide synthase: enzyme expression, characterization, and regulation. *J Bioenerg Biomembr*. 2004;36:341-6.
- Herrera F, Sainz RM, Mayo JC, Martín V, Antolín I, Rodríguez C. Glutamate induces oxidative stress not mediated by glutamate receptors or cystine transporters: protective effect of melatonin and other antioxidants. *J Pineal Res*. 2001;31:356-62.
- Herrero MT, Barcía C, Navarro JM. Functional anatomy of thalamus and basal ganglia. *Childs Nerv Syst*. 2002;18:386-404.
- Hirata F, Hayaishi O, Tokuyama T, Seno S. In vitro and in vivo formation of two new metabolites of melatonin. *J Biol Chem*. 1974;249:1311-3.

- Hirsch E, Graybiel AM, Agid YA. Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. *Nature*. 1988;334:345-8.
- Hornykiewicz O. The tropical localization and content of noradrenalin and dopamine (3-hydroxytyramine) in the substantia nigra of normal persons and patients with Parkinson's disease. *Wien Klin Wochenschr*. 1963;75:309-12.
- Huang Y, Cheung L, Rowe D, Halliday G. Genetic contributions to Parkinson's disease. *Brain Res Brain Res Rev*. 2004;46:44-70.
- Hunot S, Dugas N, Faucheux B, Hartmann A, Tardieu M, Debre P, Agid Y, Dugas B, Hirsch EC. FcepsilonR2/CD23 is expressed in Parkinson's disease and induces, in vitro, production of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in glial cells. *J Neurosci*. 1999;19:3440-7.
- Hunot S, Hirsch EC. Neuroinflammatory processes in Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 2003;53:S49-58.
- Hurley SD, O'Banion MK, Song DD, Arana FS, Olschowka JA, Haber SN. Microglial response is poorly correlated with neurodegeneration following chronic, low-dose MPTP administration in monkeys. *Exp Neurol*. 2003;184:659-68.
- Iacovitti L, Stull ND, Johnston K. Melatonin rescues dopamine neurons from cell death in tissue culture models of oxidative stress. *Brain Res*. 1997;768:317-26.
- Iacovitti L, Stull ND, Mishizen A. Neurotransmitters, KCl and antioxidants rescue striatal neurons from apoptotic cell death in culture. *Brain Res*. 1999;816:276-85.
- Imam SZ, el-Yazal J, Newport GD, Itzhak Y, Cadet JL, Slikker W Jr, Ali SF. Methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity: role of peroxynitrite and neuroprotective role of antioxidants and peroxynitrite decomposition catalysts. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;939:366-80.
- Jain A, Martensson J, Stole E, Auld PA, Meister A. Glutathione deficiency leads to mitochondrial damage in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88:1913-7.
- Jankovic J, Chen S, Le WD. The role of Nurr1 in the development of dopaminergic neurons and Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*. 2005;77:128-38.
- Jenner P. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2003;53:S26-36.
- Jin BK, Shin DY, Jeong MY, Gwag MR, Baik HW, Yoon KS, Cho YH, Joo WS, Kim YS, Baik HH. Melatonin protects nigral dopaminergic neurons from 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) neurotoxicity in rats. *Neurosci Lett*. 1998;245:61-4.

- Joo WS, Jin BK, Park CW, Maeng SH, Kim YS. Melatonin increases striatal dopaminergic function in 6-OHDA-lesioned rats. *Neuroreport*. 1998;9:4123-6.
- Jou MJ, Peng TI, Reiter RJ, Jou SB, Wu HY, Wen ST. Visualization of the antioxidative effects of melatonin at the mitochondrial level during oxidative stress-induced apoptosis of rat brain astrocytes. *J Pineal Res*. 2004;37:55-70.
- Kapp W. The history of drugs for the treatment of Parkinson's disease. *J Neural Transm*. 1992;38:1-6.
- Kaur D, Andersen J. Does cellular iron dysregulation play a causative role in Parkinson's disease? *Ageing Res Rev*. 2004;3:327-43.
- Kehrer JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol*. 1993; 23:21-48.
- Khaldy H, Escames G, León J, Vives F, Luna JD, Acuña-Castroviejo D. Comparative effects of melatonin, L-deprenyl, Trolox and ascorbate in the suppression of hydroxyl radical formation during dopamine autoxidation in vitro. *J Pineal Res*. 2000;29:100-7.
- Khaldy H, Escames G, León J, Bikjdaouene L, Acuña-Castroviejo D. Synergistic effects of melatonin and deprenyl against MPTP-induced mitochondrial damage and DA depletion. *Neurobiol Aging*. 2003;24:491-500.
- Kim WG, Mohney RP, Wilson B, Jeohn GH, Liu B, Hong JS. Regional difference in susceptibility to lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the rat brain: role of microglia. *J Neurosci*. 2000;20:6309-16.
- Kim YS, Joo WS, Jin BK, Cho YH, Baik HH, Park CW. Melatonin protects 6-OHDA-induced neuronal death of nigrostriatal dopaminergic system. *Neuroreport*. 1998;9:2387-90.
- Kopin IJ, Markey SP. MPTP toxicity: implications for research in Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci*. 1988;11:81-96.
- Koppenol WH, Traynham JG. Say NO to nitric oxide: nomenclature for nitrogen- and oxygen-containing compounds. *Methods Enzymol*. 1996;268:3-7.
- Kotler M, Rodríguez C, Sainz RM, Antolín I, Menéndez-Peláez A. Melatonin increases gene expression for antioxidant enzymes in rat brain cortex. *J Pineal Res*. 1998;24(2):83-9.
- Langston JW. MPTP: insights into the etiology of Parkinson's disease. *Eur Neurol*. 1987;26:2-10.
- Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult

mouse brain. *Neuroscience*. 1990;39:151-70.

Layne E. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. *Methods in enzymol.* 1957;III:447.

a) León J, Vives F, Gómez I, Camacho E, Gallo M.A, Espinosa A, Escames G, Acuña-Castroviejo D. Modulation of rat striatal glutamatergic response in search for new neuroprotective agents: evaluation of melatonin and some kynurenine derivatives. *Brain Res Bull.* 1998;45:525-30.

b) León J, Vives F, Crespo E, Camacho E, Espinosa A, Gallo MA, Escames G, Acuña-Castroviejo D. Modification of nitric oxide synthase activity and neuronal response in rat striatum by melatonin and kynurenine derivatives. *J Neuroendocrinol.* 1998;10:297-302.

León J, Macías M, Escames G, Camacho E, Khaldy H, Martin M, Espinosa A, Gallo MA, Acuña-Castroviejo D. Structure-related inhibition of calmodulin-dependent neuronal nitric-oxide synthase activity by melatonin and synthetic kynurenines. *Mol Pharmacol.* 2000;58:967-75.

León J, Acuña-Castroviejo D, Sainz RM, Mayo JC, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin and mitochondrial function. *Life Sci.* 2004;75:765-90.

León J, Acuña-Castroviejo D, Escames G, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin mitigates mitochondrial malfunction. *J Pineal Res.* 2005;38:1-9.

León J, Escames G, Rodríguez MI, López LC, Tapias V, Entrena A, Camacho E, Carrión MD, Gallo MA, Espinosa A, Tan DX, Reiter RJ, Acuña-Castroviejo D. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase activity by N1-acetyl-5-methoxykynuramine, a brain metabolite of melatonin. *J Neurochem.* 2006;98:2023-33.

Liberatore GT, Jackson-Lewis V, Vukosavic S, Mandir AS, Vila M, McAuliffe WG, Dawson VL, Dawson TM, Przedborski S. Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. *Nat Med* 1999;5:1403-9.

Liu Y, Fiskum G, Schubert D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem* 2002;80:780-87.

Logroscino G. The role of early life environmental risk factors in Parkinson disease: what is the evidence? *Environ Health Perspect.* 2005;113:1234-8.

López LC, Escames G, Tapias V, Utrilla P, León J, Acuña-Castroviejo D. Identification of an inducible nitric oxide synthase in diaphragm mitochondria from septic mice: its relation with mitochondrial dysfunction

and prevention by melatonin. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006;38:267-78.

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

Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951;193:265.

Luquín MR, Jiménez-Jiménez FJ. Anatomía funcional de los ganglios basales. En: *Tratado de los trastornos del movimiento.* Editores: FJ Jiménez-Jiménez, MR Luquín, JA Molina. Madrid: IM&C. 1998;19-41.

Macías M, Escames G, León J, Coto A, Sbihi Y, Osuna A, Acuna-Castroviejo D. Calreticulin-melatonin. An unexpected relationship. *Eur J Biochem.* 2003;270:832-40.

Mackay GM, Forrest CM, Stoy N, Christofides J, Egerton M, Stone TW, Darlington LG. Tryptophan metabolism and oxidative stress in patients with chronic brain injury. *Eur J Neurol.* 2006;13:30-42.

Marshall KA, Reiter RJ, Poeggeler B, Aruoma OI, Halliwell B. Evaluation of the antioxidant activity of melatonin in vitro. *Free Radic Biol Med.* 1996;21:307-15.

a) Martín M, Macías M, Escames G, León J, Acuña-Castroviejo D. Melatonin but not

vitamins C and E maintains glutathione homeostasis in t-butyl hydroperoxide-induced mitochondrial oxidative stress. *FASEB J.* 2000;14:1677-9.

b) Martín M, Macías M, Escames G, Reiter RJ, Agapito MT, Ortiz GG, Acuña-Castroviejo D. Melatonin-induced increased activity of the respiratory chain complexes I and IV can prevent mitochondrial damage induced by ruthenium red in vivo. *J Pineal Res.* 2000;28:242-8.

Martín M, Macías M, León J, Escames G, Khaldy H, Acuña-Castroviejo D. Melatonin increases the activity of the oxidative phosphorylation enzymes and the production of ATP in rat brain and liver mitochondria. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002;34:348-57.

Martín V, Sainz RM, Antolín I, Mayo JC, Herrera F, Rodríguez C. Several antioxidant pathways are involved in astrocyte protection by melatonin. *J Pineal Res.* 2002;33:204-12.

Mattson MP. Modification of ion homeostasis by lipid peroxidation: roles in neuronal degeneration and adaptive plasticity. *Trends Neurosci.* 1998;21:53-7.

Mayeux R. Epidemiology of neurodegeneration. *Annu Rev Neurosci.* 2003; 26:81-104.

Mayo JC, Sainz RM, Uría H, Antolín I, Esteban MM, Rodríguez C. Melatonin

- prevents apoptosis induced by 6-hydroxydopamine in neuronal cells: implications for Parkinson's disease. *J Pineal Res.* 1998;24:179-92.
- Mayo JC, Sainz RM, Antolín I, Rodríguez C. Ultrastructural confirmation of neuronal protection by melatonin against the neurotoxin 6-hydroxydopamine cell damage. *Brain Res.* 1999;818:221-7.
- Mayo JC, Sainz RM, Antolín I, Herrera F, Martín V, Rodríguez C. Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene expression. *Cell Mol Life Sci.* 2002;59:1706-13.
- Mayo JC, Tan DX, Sainz RM, Lopez-Burillo S, Reiter RJ. Oxidative damage to catalase induced by peroxy radicals: functional protection by melatonin and other antioxidants. *Free Radic Res.* 2003;37:543-53.
- Mayo JC, Sainz RM, Tan DX, Antolín I, Rodríguez C, Reiter RJ. Melatonin and Parkinson's disease. *Endocrine,* 2005;27:169-78.
- McGeer PL, Itagaki S, Boyes BE, McGeer EG. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology.* 1988;38:1285-91.
- McHaffie JG, Stanford TR, Stein BE, Coizet V, Redgrave P. Subcortical loops through the basal ganglia. *Trends Neurosci.* 2005;28:401-7.
- Mckeith IG. Spectrum of Parkinson's disease, Parkinson's dementia, and Lewy body dementia. *Neurol Clin.* 2000;18:865-902.
- Menéndez-Peláez A, Reiter RJ. Distribution of melatonin in mammalian tissues: the relative importance of nuclear versus cytosolic localization. *J Pineal Res.* 1993;15:59-69.
- Middleton FA, Strick PL. Basal ganglia and cerebellar loops: motor and cognitive circuits. *Brain Res Brain Res Rev.* 2000;31:236-50.
- Miller JW, Selhub J, Joseph JA. Oxidative damage caused by free radicals produced during catecholamine autoxidation: protective effects of O-methylation and melatonin. *Free Radic Biol Med.* 1996;21:241-9.
- Mink JW. The basal ganglia: focused selection and inhibition of competing motor programs. *Prog Neurobiol.* 1996;50:381-425.
- Mirza B, Hadberg H, Thomsen P, Moos T. The absence of reactive astrogliosis is indicative of a unique inflammatory process in Parkinson's disease. *Neuroscience.* 2000;95:425-32.

- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991;43:109-42.
- Morizane I, Hakuba N, Hyodo J, Shimizu Y, Fujita K, Yoshida T, Gyo K. Ischemic damage increases nitric oxide production via inducible nitric oxide synthase in the cochlea. *Neurosci Lett.* 2005;391:62-7.
- Morrissey PA, O'brien NM. Dietary antioxidants in health and disease. *Int Dairy J.* 1998;8:463-72.
- Muñoz-Hoyos A, Molina-Carballo A, Rodríguez-Cabezas T, Uberos-Fernández J, Ruiz-Cosano C, Acuña-Castroviejo D. Relationships between methoxyindole and kynurenine pathway metabolites in plasma and urine in children suffering from febrile and epileptic seizures. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1997;47:667-77.
- Muñoz-Hoyos A, Molina-Carballo A, Macías M, Rodríguez-Cabezas T, Martín-Medina E, Narbona-López E, Valenzuela-Ruiz A, Acuña-Castroviejo D. Comparison between tryptophan methoxyindole and kynurenine metabolic pathways in normal and preterm neonates and in neonates with acute fetal distress. *Eur J Endocrinol.* 1998;139:89-95.
- Murer MG, Yan Q, Raisman-Vozari R. Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 2001;63:71-124.
- Newmeyer DD, Farschon DM, Reed JC. Cell-free apoptosis in *Xenopus* egg extracts: inhibition by Bcl-2 and requirement for an organelle fraction enriched in mitochondria. *Cell.* 1994;79:353-64.
- Nicholls DG, Budd SL. Mitochondria and Neuronal Survival. *Physiol Rev.* 2000;80:315-60.
- Ogawa T, Matson WR, Beal MF, Myers RH, Bird ED, Milbury P, Saso S. Kynurenine pathway abnormalities in Parkinson's disease. *Neurology.* 1992;42:1702-6.
- Orth M, Schapira AH. Mitochondrial involvement in Parkinson's disease. *Neurochem Int.* 2002;40:533-41.
- Ortiz GG, Crespo-López ME, Morán-Moguel C, García JJ, Reiter RJ, Acuña-Castroviejo D. Protective role of melatonin against MPTP-induced mouse brain cell DNA fragmentation and apoptosis in vivo. *Neuro Endocrinol Lett.* 2001;22:101-8.
- Pablos MI, Reiter RJ, Ortiz GG, Guerrero JM, Agapito MT, Chuang JI, Sewerynek E. Rhythms of glutathione peroxidase and glutathione reductase in brain of chick and their inhibition by light. *Neurochem Int.* 1998;32:69-75.
- Parkinson J. An essay on the shaking palsy. 1817. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 2002;14:223-36.
- Pellegrini-Giampietro DE, Cherici G, Alesiani M, Carla V, Moroni F. Excitatory

- amino acid release and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage. *J Neurosci.* 1990;10:1035-41.
- Percheron G, Francois C, Talbi B, Yelnik J, Fenelon G. The primate motor thalamus. *Brain Res Brain Res Rev.* 1996;22:93-181.
- Pierrefiche G, Laborit H. Oxygen free radicals, melatonin, and aging. *Exp Gerontol.* 1995;30:213-27.
- Plaitakis A, Shashidharan P. Glutamate transport and metabolism in dopaminergic neurons of substantia nigra: implications for the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neurol.* 2000;247:1125-35.
- Poeggeler B. Introduction. Melatonin and the light-dark zeitgeber in vertebrates, invertebrates and unicellular organisms. *Experientia.* 1993;49:611-3.
- Poeggeler B, Thuermann S, Dose A, Schoenke M, Burkhardt S, Hardeland R. Melatonin's unique radical scavenging properties - roles of its functional substituents as revealed by a comparison with its structural analogs. *J Pineal Res.* 2002;33:20-30.
- Pozo D, Reiter RJ, Calvo JR, Guerrero JM. Physiological concentrations of melatonin inhibit nitric oxide synthase in rat cerebellum. *Life Sci.* 1994;55:PL455-60.
- Przedborski S, Tieu K, Perier C, Vila M. MPTP as a mitochondrial neurotoxic model of Parkinson's disease. *J Bioenerg Biomembr.* 2004;36:375-9.
- Przedborski S, Ischiropoulos H. Reactive oxygen and nitrogen species: weapons of neuronal destruction in models of Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal.* 2005;7:685-93.
- Quay WB. Circadian and estrous rhythms in pineal melatonin and 5-hydroxy indole-3-acetic acid. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1964;115:710-3.
- Reiter RJ. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev.* 1991;12:151-80.
- Reiter RJ, Tan DX, Poeggeler B, Menéndez-Peláez A, Chen LD, Saarela S. Melatonin as a free radical scavenger: implications for aging and age-related diseases. *Ann N Y Acad Sci.* 1994;719:1-12.
- a) Reiter RJ. The role of the neurohormone melatonin as a buffer against macromolecular oxidative damage. *Neurochem Int.* 1995;27:453-60.
- b) Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E, Poeggeler B, Barlow-Walden L, Chuang J, Ortiz GG, Acuña-Castroviejo D. A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J Pineal Res.* 1995;18:1-11.

- Reiter R.J. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Prog Neurobiol.* 1998;56:359-84.
- a) Reiter R.J, Tan DX, Osuna C, Gitto E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. *J Biomed Sci.* 2000;7:444-58.
- b) Reiter RJ, Calvo JR, Karbownik M, Qi W, Tan DX. Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;917:376-86.
- Reiter RJ, Tan DX. What constitutes a physiological concentration of melatonin? *J Pineal Res.* 2003;34:79-80.
- Rice JE, Lindsay JG. *Subcellular Fractionation.* Edited by Graham JM, Rickwood D.1997.
- Rosenstein RE, Cardinali DP. Central gabaergic mechanisms as targets for melatonin activity in brain. *Neurochem Int.* 1990;17:373-9.
- Sandyk R. Pineal melatonin functions: possible relevance to Parkinson's disease. *Int J Neurosci.* 1990;50:37-53.
- Schapira AH. Evidence for mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease--a critical appraisal. *Mov Disord.* 1994;9:125-38.
- Schwarcz R, Pellicciari R. Manipulation of brain kynurenines: glial targets, neuronal effects, and clinical opportunities. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002;303:1-10.
- Schwarcz R. The kynurenine pathway of tryptophan degradation as a drug target. *Curr Opin Pharmacol.* 2004;4:12-7.
- Sherer TB, Betarbet R, Greenamyre JT. Environment, mitochondria, and Parkinson's disease. *Neuroscientist.* 2002;8:192-7.
- Skulachev VP. Mitochondrial physiology and pathology; concepts of programmed death of organelles, cells and organisms. *Mol Aspects Med.* 1999;20:139-84.
- Speciale SG. MPTP: insights into parkinsonian neurodegeneration. *Neurotoxicol Teratol* 2002;24:607-20.
- Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M.1997. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature.* 1997;388:839-40.
- Srinivasan V, Pandi-Perumal SR, Maestroni GJ, Esquifino AI, Hardeland R, Cardinali DP. Role of melatonin in neurodegenerative diseases. *Neurotox Res.* 2005;7:293-318.
- Stasica P, Ulanski P, Rosiak JM. Melatonin as a hydroxyl radical scavenger. *J Pineal Res.* 1998;25:65-6.
- Stewart VC, Heales SJ. Nitric oxide-induced mitochondrial dysfunction: implications for neurodegeneration. *Free Radic Biol Med.* 2003;34:287-303.

- Stone TW, Darlington LG. Endogenous kynurenes as targets for drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov.* 2002;1:609-20.
- Storch A, Ludolph AC, Schwarz J. Dopamine transporter: involvement in selective dopaminergic neurotoxicity and degeneration. *J Neural Transm.* 2004;111:1267-86.
- Strosznajder RP, Jesko H, Zambrzycka A. Poly(ADP-ribose) polymerase: the nuclear target in signal transduction and its role in brain ischemia-reperfusion injury. *Mol Neurobiol.* 2005;31:149-67.
- Sugden D. Circadian change in rat pineal tryptophan content: lack of correlation with serum tryptophan. *J Neurochem.* 1979;33:811-3.
- Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Plummer BF, Hardies LJ, Weintraub ST, Vijayalaxmi, Shepherd AM. A novel melatonin metabolite, cyclic 3-hydroxymelatonin: a biomarker of in vivo hydroxyl radical generation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;253:614-20.
- Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi WB, Karbownik M, Calvo JR. Significance of melatonin in antioxidative defense system: reactions and products. *Biol Signals Recept.* 2000;9:137-59.
- Tan DX, Manchester LC, Burkhardt S, Sainz RM, Mayo JC, Kohen R, Shohami E, Huo YS, Hardeland R, Reiter RJ. N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine, a biogenic amine and melatonin metabolite, functions as a potent antioxidant. *FASEB J.* 2001;15:2294-6.
- Tan DX, Reiter RJ, Manchester LC, Yan MT, El-Sawi M, Sainz RM, Mayo JC, Kohen R, Allegra M, Hardeland R. Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr Top Med Chem.* 2002;2:181-97.
- Tatton WG, Chalmers-Redman R, Brown D, Tatton N. Apoptosis in Parkinson's disease: signals for neuronal degradation. *Ann Neurol.* 2003;53:S61-70.
- Teismann P, Tieu K, Cohen O, Choi DK, Wu DC, Marks D, Vila M, Jackson-Lewis V, Przedborski S. Pathogenic role of glial cells in Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2003;18:121-9.
- Teive HA. Charcot's contribution to Parkinson's disease. *Arq Neuropsiquiatr.* 1998;56:141-5.
- Thomas B, Mohanakumar KP. Melatonin protects against oxidative stress caused by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in the mouse nigrostriatum. *J Pineal Res.* 2004;36:25-32.
- Tieu K, Ischiropoulos H, Przedborski S. Nitric oxide and reactive oxygen species in

Parkinson's disease. IUBMB Life. 2003;55:329-35.

Tretter L, Sipos I, Adam-Vizi I. Initiation of neuronal damage by complex I deficiency and oxidative stress in Parkinson's disease. Neurochem Res. 2004;29:569-77.

Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. J Physiol. 2003;552:335-44.

Urata Y, Honma S, Goto S, Todoroki S, Ueda T, Cho S, Honma K, Kondo T. Melatonin induces gamma-glutamylcysteine synthase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells. Free Radic. Biol Med. 1999;27:838-47.

Vila M, Przedborski S. Genetic clues to the pathogenesis of Parkinson's disease. Nat Med. 2004;10:S58-62.

Watts C, Moss CX, Mazzeo D, West MA, Matthews SP, Li DN, Manoury B. Creation versus destruction of T cell epitopes in the class II MHC pathway. Ann N Y Acad Sci. 2003;987:9-14.

Wolozin B, Golts N. Iron and Parkinson's disease. Neuroscientist 2002;8:22-32.

Zang LY, Misra HP. Generation of reactive oxygen species during the monoamine oxidase-catalyzed oxidation of the neurotoxicant, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. J Biol Chem. 1993;268:16504-12.

Zang LY, Cosma G, Gardner H, Vallyathan V. Scavenging of reactive oxygen species by melatonin. Biochim Biophys Acta. 1998;1425:469-77.

Zhang L, Dawson VL, Dawson TM. Role of nitric oxide in Parkinson's disease. Pharmacol Ther 2006;109:33-41.