

**Universidad de Granada  
Instituto de Biotecnología  
Facultad de Medicina  
Departamento de Fisiología**



**Melatonina y Parkinson:  
Implicación del poro mitocondrial de  
transición en la fisiopatología de Parkinson y  
papel de la melatonina como neuroprotector**

**Inés Rivas Martínez**

**Granada, 2005**



*A mi padre*

# **CERTIFICACIONES**

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

Certifica que D<sup>a</sup> Inés Rivas Martínez, Licenciada en Bioquímica, 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: **“Melatonina y Parkinson: Implicación del poro mitocondrial de transición en la fisiopatología de Parkinson y papel de la melatonina como neuroprotector”**, que ha sido objeto de su Tesis Doctoral, reuniendo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Granada,      de                      de 2005

El director,

El interesado,

Fdo. Darío Acuña Castroviejo

Fdo. Inés Rivas Martínez

Dra JOSEFA LEÓN LÓPEZ, investigadora contratada del FIS.

Certifica que D<sup>a</sup> Inés Rivas Martínez, Licenciada en Bioquímica, 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: “Melatonina y Parkinson: Implicación del poro mitocondrial de transición en la fisiopatología de Parkinson y papel de la melatonina como neuroprotector”, que ha sido objeto de su Tesis Doctoral, reuniendo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

Granada,        de        de 2005

El director,

El interesado,

Fdo. Josefa León López

Fdo. Inés Rivas Martínez

**PUBLICACIONES**

### **PROYECTOS:**

**Título del proyecto:** Caracterización de la óxido nítrico sintasa mitocondrial y su regulación por la melatonina en la sepsis.

**Entidad financiadora:** Instituto de Salud Carlos III (FIS)

**Referencia del proyecto:** PI030817

**Cantidad:** 156.975

**Duración, desde:** 20-10-2003

**hasta:** 20-10-2006

**Investigador principal:** Escames G

**Título del proyecto:** Mecanismos de acción de la melatonina

**Entidad financiadora:** PAI (Junta de Andalucía)

**Referencia del proyecto:** CTS-101

**Cantidad:** 10.332,22

**Duración, desde:** 01-01-2004

**hasta:** 31-12-2004

**Investigador principal:** Acuña-Castroviejo D

### **REVISTAS:**

**Autores:** Rivas I, León J, Escames G, Acuña-Castroviejo D.

**Título:** Melatonin prevents rotenone- induced mitochondrial failure and apoptosis in differentiated PC12 cells in culture.

**Ref. Revista:** *Neurobiol Aging* 2005; **enviado:**----

### **CAPITULOS DE LIBROS.**

**Autores:** Acuña-Castroviejo D, Escames G, León J, Rivas I

**Título:** Melatonin and Mitochondria

**Ref Libro:** *Melatonin: Present and Future*

**Editor:** Montilla P y Antúnez I.

**Lugar (País) de publicación:** New York, USA 2005

**Libro (nacionalidad/extranjero):** extranjero

### **CONGRESOS:**

**Autores:** El haouhay N, Bikjdaouene L, Tapias V, López LC, Rivas I, Escames G, Granados MJ, Acuña-Castroviejo D

**Título:** Oxidative stress in human aging

**Tipo de participación:** comunicación

**Congreso:** 1<sup>st</sup> Luso-Spanish Congress on Free Radicals

**Publicación:** Book of Abstracts, 1: 87-87, 2003

**Lugar de celebración:** Coimbra (Portugal)

**Fechas de celebración (dias/mes/año):** 4, 5 y 6/12/2003



**Autores:** Escames G, Sarno F, López LC, Rivas I, Tapias V, Bikjdaouene L, El haouhay N, Navarro A, Acuña-Castroviejo D

**Título:** Melatonin counteracts sepsis-induced mtNOS and NO production in mice

**Tipo de participación:** comunicación

**Congreso:** 1<sup>st</sup> Luso-Spanish Congress on Free Radicals

**Publicación:** Book of Abstracts, 1: 88-88, 2003

**Lugar de celebración:** Coimbra (Portugal)

**Fechas de celebración (días/mes/año):** 4, 5 y 6/12/2003

**Autores:** López LC, Escames G, Sarno F, Rivas I, Tapias V, Bikjdaouene L, El haouhay N, Acuña-Castroviejo D

**Título:** Melatonin counteracts mitochondrial damage during aging

**Tipo de participación:** comunicación

**Congreso:** 1<sup>st</sup> Luso-Spanish Congress on Free Radicals

**Publicación:** Book of Abstracts, 1: 106-106, 2003

**Lugar de celebración:** Coimbra (Portugal)

**Fechas de celebración (días/mes/año):** 4, 5 y 6/12/2003

**Autores:** Rivas I, Tapias V, López LC, Bikjdaouene L, El haouhay N, Escames G, de la Torre Y, Acuña-Castroviejo D

**Título:** Melatonin counteracts rotenone-induced mitochondrial oxidative damage in PC12 cells

**Tipo de participación:** comunicación

**Congreso:** 1<sup>st</sup> Luso-Spanish Congress on Free Radicals

**Publicación:** Book of Abstracts, 1: 135-135, 2003

**Lugar de celebración:** Coimbra (Portugal)

**Fechas de celebración (días/mes/año):** 4, 5 y 6/12/2003

**Autores:** Rivas I, León J, López LC, Ruiz M, Carretero M, Valera MD, Acuña-Castroviejo D

**Título:** Melatonin prevents rotenone-induced mitochondrial complex I inhibition, oxidative damage and cell death in PC12 cells

**Tipo de participación:** comunicación

**Congreso:** XXXIII Congress of the Spanish Society of Physiological Sciences

**Publicación:** J. Physiol. Biochem., 61: 141-141, 2005

**Lugar de celebración:** Sevilla (España)

**Fechas de celebración (días/mes/año):** 10, 11, 12 y 13/02/2005

**Autores:** Tapias V, Hitos AB, Rivas I, Ortiz O, Rodriguez MI, León J, Escames G, Acuña-Castroviejo D

**Título:** Effects of some synthetic melatonin analogs on nNOS/iNOS activity *in vitro*

**Tipo de participación:** comunicación

**Congreso:** XXXIII Congress of the Spanish Society of Physiological Sciences

**Publicación:** J. Physiol. Biochem., 61: 141-141, 2005

**Lugar de celebración:** Sevilla (España)

**Fechas de celebración (días/mes/año):** 10, 11, 12 y 13/02/2005

**Autores:** López LC, Escames G, Utrilla MP, Hitos AB, Rodriguez MI, Rivas I, Acuña-Castroviejo D

**Título:** Heart mitochondrial failure in CLP-induced sepsis: the role of inducible mtNOS and prevention by melatonin

**Tipo de participación:** comunicación

**Congreso:** XXXIII Congress of the Spanish Society of Physiological Sciences

**Publicación:** J. Physiol. Biochem., 61: 294-294, 2005

**Lugar de celebración:** Sevilla (España)

**Fechas de celebración (días/mes/año):** 10, 11, 12 y 13/02/2005

# **AGRADECIMIENTOS**

Mi más profundo y sincero agradecimiento a D. Darío Acuña-Castroviejo, por brindarme la oportunidad de trabajar en su grupo de investigación y dirigir lo que ahora es esta tesis doctoral. Su labor como tutor, director y, sobretodo, como profesor y gran transmisor de conocimientos, ha permitido la realización de este trabajo.

No menos significativo mi agradecimiento a Pepi, codirectora de esta tesis, y pilar fundamental donde se ha asentado este trabajo y en el que ella a participado muy activamente. De Pepi he aprendido a trabajar con constancia y diligencia en este apasionante mundo de la investigación; a razonar y valorar los resultados; pero sobretodo a estudiar, porque sin un estudio constante, exhaustivo y profundo, es imposible **conocer**, en el más amplio sentido de la palabra. Por los conocimientos que me ha transmitido, por su ayuda permanente (incluso con miles de kilómetros de distancia), por su enorme esfuerzo y empeño en que esta tesis salga adelante y, sobre todo, por la amistad que me ha regalado en estos años, gracias, de todo corazón.

Una mención muy especial para todos y cada uno de los compañeros del laboratorio: Víctor, Ángel, Ana, Maribel, Marcos, Carlos, Miguel, Luis Carlos, las técnicas Araceli, M<sup>a</sup> Dolores y Elisa, con quienes he compartido momentos inolvidables en estos años de trabajo. Gracias a las profesoras Germaine y Pilar que, desde su experiencia, siempre han estado dispuestas y oportunas para ayudar y aconsejar en momentos difíciles. Un recuerdo muy especial para Francesca y Huda, compañeras excepcionales y amigas inmejorables, y que junto con Leyla, Nasshira, Tania y Olga completan el grupo numeroso de compañeros de laboratorio durante estos años. A todos ellos, gracias por estar ahí en todo momento.

Mucho más que gracias tengo que dar a mi familia, que en todo momento me ha apoyado, alentado y aguantado durante este trayecto. A mi madre, por ser refugio y aliento en los momentos difíciles, sin su apoyo e infinita paciencia nunca hubiese hecho esta tesis, que es más suya que mía. A mis hermanas María, Tere y Pedro, Fátima y en especial a Rosa, que me cedió generosamente su ordenador, impresora y escáner siempre que los necesité. Gracias también a mi sobrino Angel, que nos llenó a todos de alegría desde su llegada.

Muchas gracias a mis amigos y compañeros, que de una forma u otra están reflejados en este trabajo, por su desinteresada entrega y amistad. Ellos hacen que los momentos malos no lo sean tanto, y que los buenos no se acaben nunca.

Finalmente, muchas gracias a Sergio, que se coló en mi vida coincidiendo con el inicio de esta tesis y que se ha convertido en un apoyo fundamental en todo momento. Gracias por regalarme tu amistad, tu apoyo, tu consejo, en una palabra, tu presencia; tu confianza en mí nunca ha tenido límite y gracias a ella he conseguido terminar este trabajo con ilusión y entrega.

Agradezco a la Fundación del Hospital Clínico el soporte institucional que ha prestado a la realización y difusión de este estudio.

A todos los que me dejo en el tintero,  
GRACIAS

# **ABREVIATURAS**

**AD:** alcohol deshidrogenasa  
**ADP:** adenosindifosfato  
**aFoMK:** N<sup>1</sup>-acetil-N<sup>2</sup>-formil-5-metoxikinurenamina  
**AIF:** factor inductor de apoptosis  
**aMK:** N-acetil-5-metoxikinurenamina  
**AMP:** adenosinmonofosfato  
**AMPA:** ácido propiónico alfa amino 3 hidroxil 5 metil 4 isoxazol  
**aMT:** melatonina  
**ANT:** traslocador de nucleótidos de adenina  
**ATP:** adenosintrifosfato  
**CaM:** calmodulina  
**CL:** cuerpos de Lewy  
**COMT:** catecol-*O*-metil transferasa  
**CoQ:** coenzima Q  
**CsA:** ciclosporina A  
**CTE:** cadena de transporte electrónico  
**DA:** dopamina  
**DE:** deoxiepinefrina  
**DHBA:** 3,4-dihidroxibenzilamina  
**DISC:** complejo inductor de la señal de muerte  
**DNA:** ácido desoxirribonucleico  
**DOPAC:** ácido dihidroxifenil acético  
**DR:** receptor de muerte  
**DTNB:** ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico)  
**EP:** enfermedad de Parkinson  
**FADD:** dominio de muerte asociado a Fadd  
**FADH<sub>2</sub>:** dinucleótido de flavina y adenina reducido  
**PS:** fosfatidil serina  
**GABA:** ácido gamma amino butírico  
**GPe:** globo pálido externo  
**GPi:** globo pálido interno  
**GPx:** glutatión peroxidasa  
**GRd:** glutatión reductasa  
**GSH:** glutatión reducido  
**GSSG:** glutatión oxidado  
**GSX:** glutatión total  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** peróxido de hidrógeno  
**HIOMT:** hidroxindol-*O*-metiltransferasa  
**HK II:** hexoquinasa II  
**HPLC:** cromatografía líquida de alta presión  
**HVA:** ácido homovalínico  
**IAP:** proteínas inhibidoras de apoptosis  
**IL 1 $\alpha$ :** interluquina 1 $\alpha$   
**IL 1 $\beta$ :** interluquina 1 $\beta$   
**MAO:** monoamina oxidasa  
**MAPK:** proteína quinasa activada por mitógeno  
**mDNA:** DNA mitocondrial  
**mtCK:** creatina quinasa mitocondrial

**MPTP:** 1-metil,4-fenil,1-2-3-6-tetrahidropiridina  
**NAD:** dinucleótido de nicotinamida y adenina  
**NADH:** NAD reducido  
**NAT:** n-acetiltransferasa  
**NF-κB:** factor nuclear kappa B  
**NGF:** factor de crecimiento nervioso  
**NMDA:** n-metil d-aspartato  
**NO:** óxido nítrico  
**NOS:** óxido nítrico sintasa  
**iNOS:** NOS inducible  
**nNOS:** NOS neuronal  
**NTB:** ácido 2-nitro-5-tiobenzoico  
**O<sub>2</sub>:** oxígeno molecular  
**O<sub>2</sub><sup>·-</sup>:** anión superóxido  
**OH·:** radical hidroxilo  
**ONOO<sup>-</sup>:** peroxinitrito  
**PARS:** poli ADP-ribosa sintetasa  
**PBR:** receptor periférico de benzodiazepinas  
**PTM:** poro de transición mitocondrial  
**PUFA:** ácidos grasos poliinsaturados  
**RNS:** especies reactivas de nitrógeno  
**ROO·:** radical peroxilo  
**ROS:** especies reactivas de oxígeno  
**SN:** sustancia negra  
**SNC:** sistema nervioso central  
**SNC:** sustancia negra *pars compacta*  
**SNr:** sustancia negra *pars reticulata*

**SQ·:** radical semiquinona  
**SSA:** ácido sulfosalicílico  
**STN:** núcleo subtalámico  
**TH:** tirosina hidroxilasa  
**TNF-α:** factor de necrosis tumoral α  
**TRADD:** receptores de TNF *asociados a dominios de muerte*  
**VDAC:** canal aniónico dependiente de voltaje  
**VEGF:** factor de crecimientos endotelial vascular  
**Δψ<sub>m</sub>:** diferencia de potencial intermembrana  
**3MT:** 3-metoxitriptamina  
**5HIAA:** ácido 5-hidroxi-indolacético  
**5HT:** 5-hidroxitriptamina  
**6-OHDA:** 6 hidroxidopamina





## INTRODUCCIÓN

1. ENFERMEDAD DE PARKINSON.....	1
1.1    Ganglios basales.....	3
1.1.1    Anatomía de los ganglios basales.....	3
1.1.2    Neurotrasmisión del circuito motor.....	5
1.2    Fisiopatología de la Enfermedad de Parkinson.....	6
1.2.1    Alteraciones del circuito motor.....	6
1.2.2    Cuerpos de Lewy.....	9
1.3    Etiología de la Enfermedad de Parkinson. Papel del estrés oxidativo.....	11
1.3.1    Estrés oxidativo en la Enfermedad de Parkinson.....	11
Catabolismo de la dopamina. Implicación del hierro.....	11
Defectos mitocondriales.....	15
Excitotoxicidad del glutamato.....	19
1.3.2    Procesos inflamatorios.....	22
1.3.3    Factores genéticos.....	25
1.3.4    Factores ambientales.....	29
1.4    Modelos experimentales de Enfermedad de Parkinson. La rotenona como tóxico en modelos <i>in vitro</i> con células PC12.....	31
La rotenona como tóxico en modelos experimentales de Enfermedad de Parkinson.....	33
Los modelos <i>in vitro</i> . Las células PC12 como modelo de estudio para la EP.....	35
2. MECANISMOS DE MUERTE NEURONAL EN LA EP. APOPTOSIS.....	39
2.1    La muerte celular programada.....	40
2.2    Características morfológicas de la apoptosis.....	41
2.3    Mecanismo moleculares de la apoptosis.....	42
2.3.1    Reguladores intracelulares.....	46
2.3.2    Reguladores extracelulares.....	47
2.4    Mitocondria y apoptosis. Papel del poro de transición mitocondrial.....	48
2.4.1    Permeabilización de la membrana mitocondrial.....	49
2.4.2    Importancia de los componentens del PTM en la apoptosis...	50

3. MELATONINA.....	54
3.1    Metabolismo de la melatonina. Biosíntesis y degradación.....	56
3.2    Melatonina como antioxidante.....	59
3.3    Melatonina y mitocondria.....	62
3.4    Melatonina y EP.....	65

### OBJETIVOS

OBJETIVOS.....	71
----------------	----

### MATERIALES Y MÉTODOS

1. CULTIVO Y MANTENIMIENTO DE LA LÍNEA CELULAR PC12.....	75
2. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	77
3. ENSAYO DE LA VIABILIDAD CELULAR.....	78
4. VALORACIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL.....	79
4.1    Determinación de catecolaminas.....	79
4.2    Medida de la viabilidad específica del complejo I de la CTE.....	82
5. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL.....	84
5.1    Determinación de la bioenergética mitocondrial. Medida de las concentraciones de AMP, ADP, ATP.....	84
5.2    Estimación de la permeabilidad de la membrana mitocondrial.....	89
5.2.1    Medida del potencial de la membrana mitocondrial.....	89
5.2.2    Cinética del poro de transición mitocondrial.....	91
6. DETERMINACIÓN DE LA MUERTE CELULAR POR APOPTOSIS.....	94
7. MEDIDA DEL ESTRÉS OXIDATIVO CELULAR.....	97
7.1    Determinación de los niveles de GSSG/GSH.....	97
7.2    Medida de la actividad de las enzimas glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GRd).....	100
8. DETERMINACION DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS.....	103
9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	104

## RESULTADOS

1. VALORACIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL.....	107
1.1 Viabilidad celular. Efectos de la melatonina y la CsA sobre la inhibición de la viabilidad celular inducida por la rotenona.....	107
1.2 Catecolaminas. Efectos de la melatonina y la CsA sobre la inhibición de los niveles de catecolaminas inducida por la rotenona.....	109
1.3 Complejo I de la CTE. Efectos de la melatonina y la CsA sobre la inhibición del complejo I inducida por la rotenona.....	112
2. EFECTOS DE LA MELATONINA Y LA CsA SOBRE LA BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL.....	113
2.1 Producción de ATP. Carga energética.....	113
2.2 Potencial de membrana.....	118
2.3 Poro de transición.....	120
3. EFECTOS DE LA MELATONINA Y LA CsA SOBRE LA MUERTE CELULAR.....	122
3.1 Apoptosis en células PC12 diferenciadas.....	122
4. EFECTOS DE LA MELATONINA Y LA CsA SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN LAS CÉLULAS PC12.....	125

## DISCUSIÓN

1. MODELO EXPERIMENTAL.....	133
2. PAPEL PROTECTOR DE LA MELATONINA EN EL MODELO DE PARKINSON INDUCIDO POR LA ROTENONA EN LAS CÉLULAS PC12.....	140
3. PAPEL PROTECTOR DE LA MELATONINA EN LA MUERTE NEURONAL.....	149

## CONCLUSIONES

CONCLUSIONES.....	155
-------------------	-----

## BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFIA.....	159
-------------------	-----



# **INTRODUCCIÓN**



## 1. ENFERMEDAD DE PARKINSON

El aumento en la esperanza de vida media experimentado en el mundo occidental desde la segunda mitad del siglo pasado, ha puesto de evidencia la existencia de una serie de enfermedades “asociadas al envejecimiento” poco conocidas hasta entonces y cuya incidencia es cada vez más frecuente. Son las llamadas enfermedades degenerativas, en las que un proceso patológico, de etiología diversa y a veces poco conocida, provoca la pérdida progresiva de ciertas funciones vitales para el paciente, haciendo disminuir drásticamente su calidad de vida. El tratamiento actual de estas patologías se centra en paliar sus síntomas. Es, por tanto, de vital importancia dedicar el esfuerzo y los medios necesarios para investigar cuáles son las causas primarias que originan estas alteraciones.

La enfermedad de Parkinson (EP) es, después de la enfermedad de Alzheimer, la segunda de las patologías neurodegenerativas más frecuentes; afecta por igual a distintas razas y sexo, y se calcula que su prevalencia en España es del 1%. La edad media de comienzo está en torno a los 55 años y, aunque existen formas tempranas de la enfermedad (un 5-10% de los pacientes son menores de 40 años), la mayoría tienen entre 50 y 80 años de edad (Costa y cols, 2001).

La descripción de Parkinson aún cautiva por su exposición de la postura y los movimientos característicos de los pacientes que sufren esta enfermedad:

*... movimientos trémulos involuntarios, con reducción de la energía muscular, en partes del cuerpo inactivas, incluso si están apoyadas, con una propensión a inclinar el tronco hacia delante al pasar de un ritmo de marcha a otro de carrera, mientras que los sentidos y el intelecto se mantienen intactos.*



La enfermedad fue descrita por primera vez por el británico que le dio su nombre, James Parkinson a principios del siglo XIX, denominándola “shaking palsy”, lo que podría traducirse como “parálisis agitante”. La EP es un trastorno degenerativo que afecta de manera muy selectiva a un grupo de neuronas de una región del cerebro conocida como *sustancia negra*, llamada así porque sus neuronas contienen un pigmento coloreado, la neuromelanina, que las hace visibles al microscopio electrónico. Las neuronas de la sustancia negra son capaces de sintetizar, almacenar y liberar dopamina (DA), su principal neurotransmisor, a otras estructuras cerebrales que procesan la información y la transforman en movimiento. El correcto funcionamiento de estas estructuras nos permite, pues, coordinar nuestros movimientos de manera adecuada.

Ya desde finales del siglo XIX, se sabe que las estructuras implicadas en el control neurológico del movimiento y que en la EP están dañadas, se hallan en el **tallo cerebral** y en los **ganglios basales** (revisado por Escobar, 2003).

En 1937 se propuso que las neuronas pigmentadas de la sustancia negra desempeñaban un importante papel en el daño cerebral en la EP (Hassler, 1937), afirmación que fue materializada años más tarde con la publicación de varios trabajos (Greenfield y Bosanquet, 1953; Denny-Brown, 1962). Por estas fechas, se postuló la EP como el primer ejemplo de trastorno cerebral debido a la falta de un único neurotransmisor. A mediados de los cincuenta, Arvid Carlson demostró que el 80% de la dopamina del cerebro se encuentra en los ganglios basales (Carlson, 1955). Poco después Oleh Hornykiewicz descubrió que el cerebro de los pacientes de Parkinson tenía un déficit de dopamina en el cuerpo estriado, y sobre todo en el putamen (Hornykiewicz, 1963). La implicación de todas estas estructuras cerebrales en la patogénesis de la EP condujo 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 conocimiento de la enfermedad (Albin y cols, 1989; Alexander y cols, 1990; Bergman y cols, 1990; Gerfen, 1995; Baron y cols, 1996).

## 1.1 Ganglios basales

Para entender cómo la pérdida de DA en el estriado puede causar deficiencias motoras, es necesario revisar la anatomía, fisiología y neuroquímica de los ganglios basales y sus conexiones aferentes y eferentes.

### 1.1.1 Anatomía de los ganglios basales

El término “ganglios basales” se refiere a una colección de estructuras subcorticales y circuitos que enlazan el tálamo con la corteza cerebral. Las estructuras anatómicas que forman los ganglios basales incluyen:

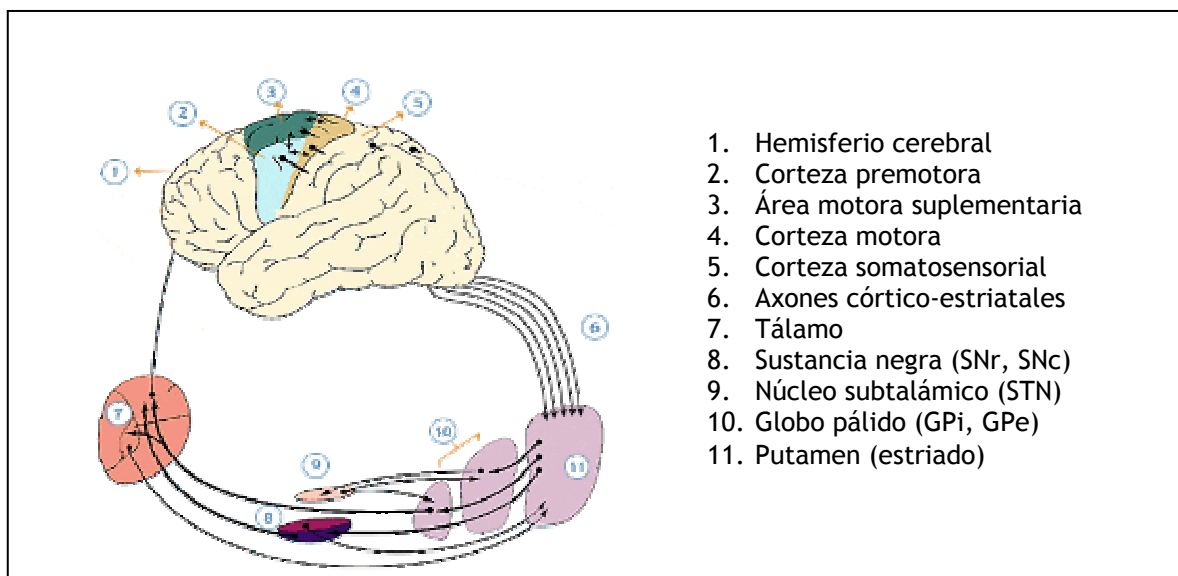
- estriado (caudado, putamen y accumbens)
- globo pálido interno (GPi) y globo pálido externo (GPe)
- núcleo subtalámico (STN)
- sustancia negra *pars compacta* (SNc) y *pars reticulata* (SNr)

Estas estructuras, junto con cerebelo, tálamo y corteza frontal, constituyen un complejo sistema que funciona de manera integrada para garantizar la organización y ejecución de patrones normales de movimiento; varios circuitos segregados, corteza - ganglios basales - tálamo - corteza, interactúan con regiones separadas del estriado, globo pálido y tálamo. Estos circuitos desempeñan un papel importante en las funciones esquetomotoras, oculomotoras y cognitivas. El circuito motor es esencial en la programación, iniciación y ejecución del movimiento, y alteraciones en su función se relacionan directamente con los signos y síntomas de los estados hipo e hiperkinéticos de la EP.

En la **figura 1** se muestran los circuitos neuronales de los ganglios basales. El circuito motor o vía córtico-estriatal, se inicia en las regiones de la corteza cerebral que se relaciona con el control de los movimientos (área motora suplementaria, corteza promotora, corteza motora, corteza somato-sensorial) y se dirige a la porción motora del estriado (al putamen) en forma de una vía topográficamente organizada.

Desde el putamen salen vías destinadas al globo pálido, a la sustancia negra, al núcleo subtalámico y al tálamo. Desde este núcleo (núcleos ventrales anteriores y laterales del tálamo) vuelve el circuito al área motora suplementaria y al área promotora. Queda así definida una organización de realimentación en este circuito.

Este y el resto de circuitos organizados en paralelo a lo largo de los ganglios basales hacen de ellos un verdadero centro de procesamiento de la información necesario para la planificación y activación de los movimientos y de la regulación de los ajustes posturales requeridos en relación a estos movimientos.



**Figura 1.** Circuito motor de retroalimentación desde la corteza cerebral (1, 2, 3, 4, 5) hacia los ganglios basales (8, 9, 10, 11), y a través del tálamo (7), de nuevo hacia la corteza.

### 1.1.2 Neurotransmisión del circuito motor

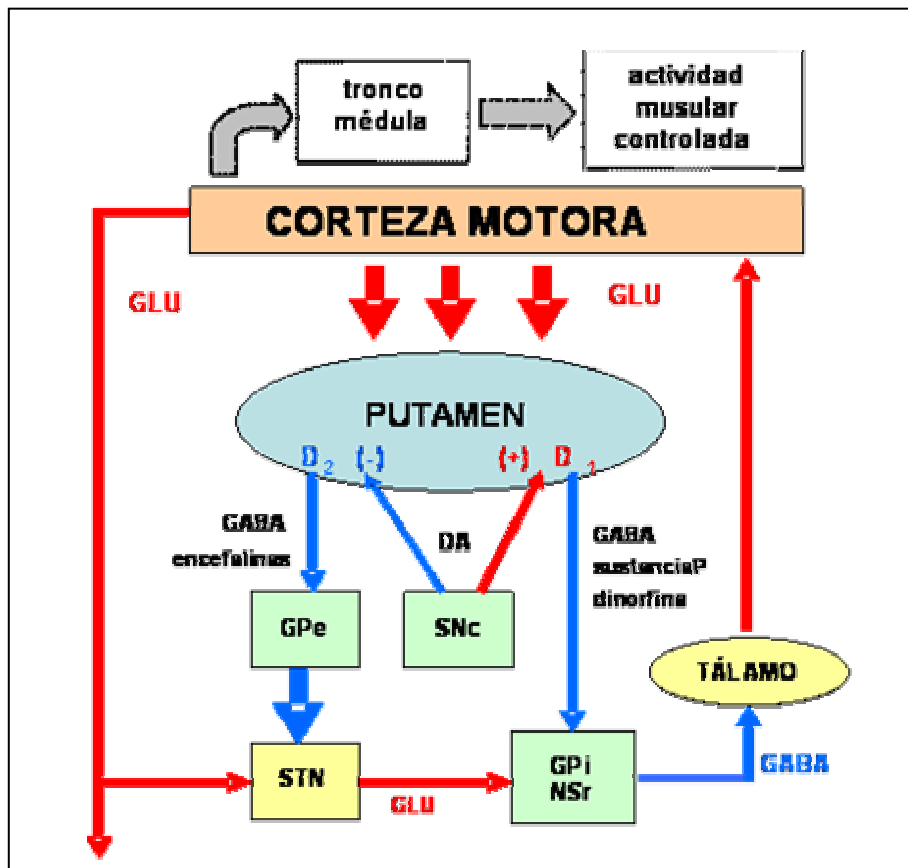
Desde el punto de vista neuroquímico, en el complejo estructural formado por corteza - ganglios basales - tálamo - corteza, participan al menos cuatro sistemas de neurotransmisores:

- dopaminérgico
- colinérgico
- GABAérgico
- Glutamatérgico

Es en la SNc donde se originan los axones dopaminérgicos que ascienden a conectarse con el cuerpo estriado y el GP (**Figura 2**). Estos dos núcleos son cruciales para la organización del movimiento, ya que constituyen vías de relevo en un extenso circuito neuronal. Desde las áreas motoras de la corteza, fibras glutamatérgicas proyectan hacia el estriado, en concreto hacia el putamen, para establecer sinapsis glutamatérgicas excitadoras con los receptores inotrópicos de glutamato AMPA y NMDA en las neuronas GABAérgicas. A su vez, esas neuronas del estriado dan origen a dos vías que conectan al estriado con los núcleos externo e interno del GP (Graybiel, 1990):

- Una de ellas, la “**vía directa**”, GABAérgica, que también contiene dinorfina y sustancia P, que expresa receptores dopaminérgicos D<sub>1</sub>, proyecta directamente del putamen a las neuronas del GPi y la SNr sobre las cuales ejerce un efecto inhibitorio.
- Las neuronas del cuerpo estriado, que expresan receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub> y el péptido encefalina, generan proyecciones inhibitorias GABAérgicas (“**vía indirecta**”), hacia el GPe, cuyas neuronas también GABAérgicas inhibitorias proyectan al STN; de éste último se originan fibras glutamatérgicas excitadoras al GPi

y a la SNr. Las fibras de la vía indirecta, por tanto, producen inhibición del GPe, desinhibición del STN y excitación del GPi y SNr.



**Figura 2.** Esquema de las conexiones de los ganglios basales con la corteza cerebral y la sustancia negra. Las flechas indican los circuitos fundamentales y su grosor el nivel de actividad. (+) En rojo indica efecto activador y (-) en azul efecto inhibitorio. GABA: ácido gamma amino butírico, DA: dopamina, D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>: receptores dopaminérgicos.

El GPi proyecta sus axones GABAérgicos al tálamo, cuyas fibras excitadoras glutamatérgicas se proyectan finalmente hacia la corteza motora (Escobar, 2003). Los efectos opuestos de impulsos inhibitorios de la vía directa y excitadores de la indirecta, facilitan y suprimen respectivamente la actividad motora, cerrándose así el circuito. Por otro lado, la vía nigro-estriatal dopaminérgica, que se origina en las neuronas pigmentadas de la SNc, modula

el efecto glutamatérgico de la proyección córtico-estriatal por medio de un efecto dual sobre las neuronas del estriado: excita las neuronas que expresan receptores  $D_1$  en la vía directa, e inhibe las que expresan receptores  $D_2$  en la vía indirecta (Parent y cols, 1999; Obeso, 2000). El equilibrio entre la interacción constante de los componentes de este complejo circuito neuronal garantizan la correcta ejecución de los movimientos.

## 1.2. Fisiopatología de la enfermedad de Parkinson

La EP se caracteriza, como ya hemos comentado, por la pérdida de neuronas de la SNc, así como por la aparición de unas inclusiones citoplasmáticas eosinófilas conocidas como cuerpos de Lewy, las cuales no son exclusivas de las neuronas dopaminérgicas y que aparecen también en otras patologías neurodegenerativas asociadas a trastornos en el movimiento.

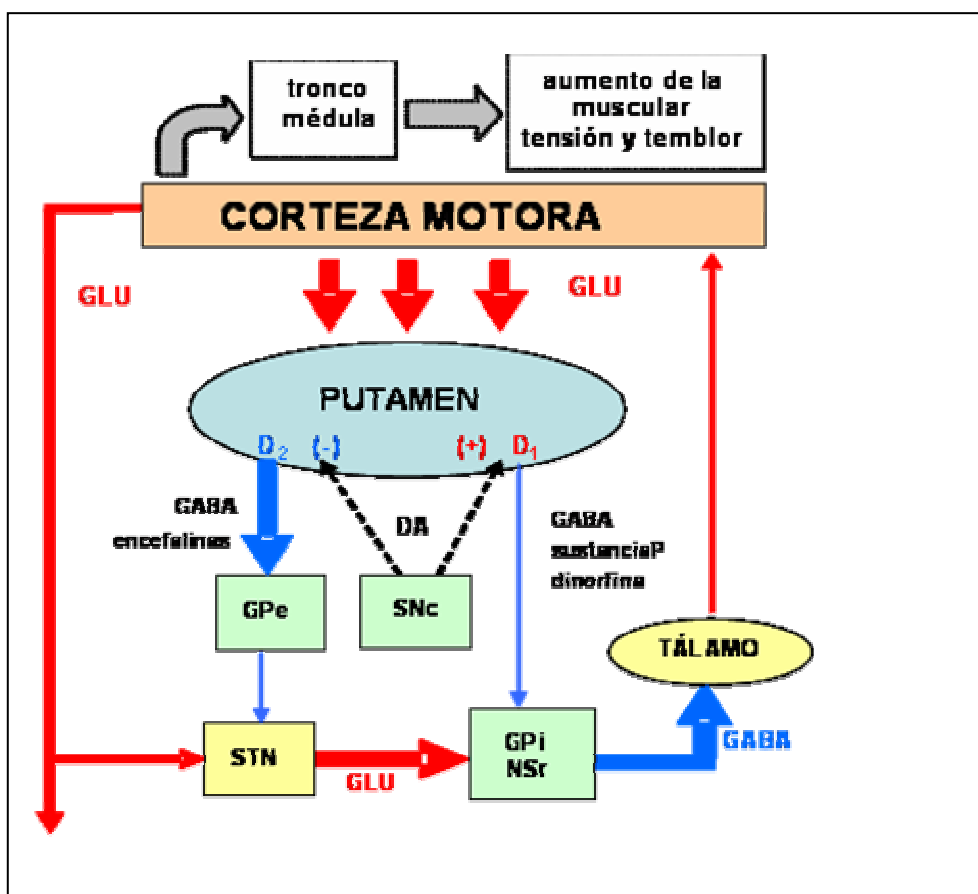
### 1.2.1 Alteraciones en el circuito motor

La EP se considera como el prototipo de enfermedad causada por una alteración funcional de los ganglios basales. Se sabe con certeza que la afección clave es la degeneración en la vía nigro-estriatal, debida a la muerte neuronal en la parte compacta de la sustancia negra.

La pérdida de dopamina produce una enorme desinhibición de las neuronas de cuerpo estriado que expresan los receptores  $D_2$  de dopamina en la vía indirecta que, a su vez, produce un aumento de la inhibición en el GPe y desinhibición del SNT (**figura 3**); la hiperactividad en las neuronas glutamatérgicas del STN producen incremento excitador sobre las neuronas del GPi y SNr, lo cual inhibe exageradamente los núcleos motores del tálamo, provocando el desequilibrio característico de la EP (Alexander y cols, 1990; Obeso, 2000). En los casos avanzados de la enfermedad hay un descenso de

las neuronas pigmentadas dopaminérgicas en la SNc de hasta un 70% (descenso de pigmentación apreciable fácilmente mediante microscopía electrónica).

En conclusión, en ausencia de dopamina se produce un incremento de la actividad del GPi y de la inhibición talámica. La hiperactividad tónica de estas estructuras impiden los cambios de programas a tiempo en el área motora, lo que produce dificultad para iniciar el movimiento o cambiar de actividad. Todo esto explica tanto la pobreza como la lentitud de los movimientos que caracterizan a la EP (hipo-bradicinesia) (Álvarez y cols, 2001).



**Figura 3.** Esquema de las conexiones de los ganglios basales con la corteza cerebral y la sustancia negra en caso de parkinsonismo. Las flechas indican los circuitos fundamentales y su grosor el nivel de actividad. (+) en rojo indica efecto activador y (-) en azul efecto inhibitor. GABA: ácido gamma amino butírico, DA: dopamina, D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>: receptores dopaminérgicos.

### 1.2.2 Cuerpos de Lewy

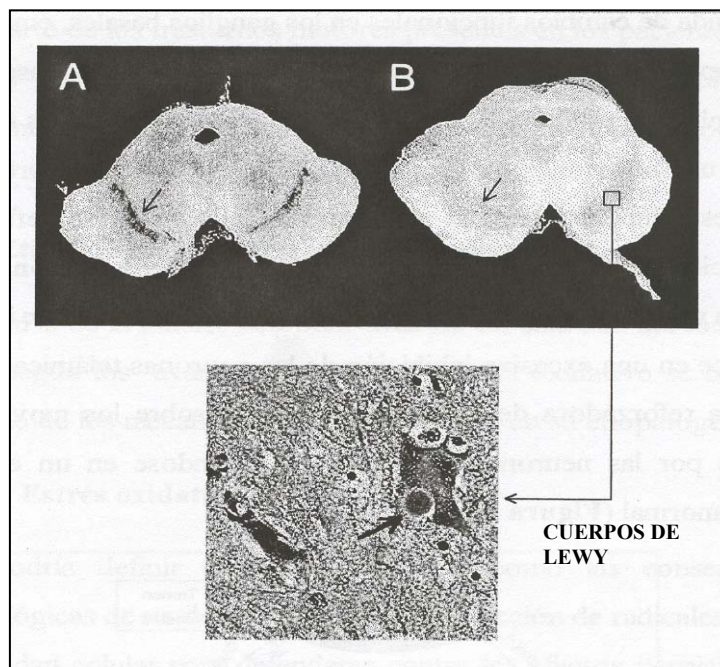
Los cuerpos de Lewy (CL) se describieron en 1912 y se relacionaron con la degeneración de la sustancia negra propia de la EP poco después; hoy en día constituyen uno de los principales marcadores histopatológicos de la enfermedad. Los CL son inclusiones eosinófilas citoplasmáticas esféricas, constituidas principalmente por neurofilamentos y diversas proteínas, sobre todo  $\alpha$ -sinucleína (Spillantini y cols, 1997). Se localizan en neuronas monoaminérgicas de la sustancia negra y otros núcleos del tronco, diencéfalo y prosencéfalo.

La  $\alpha$ -sinucleína, ubicada normalmente en las sinapsis neuronales, se expresa abundantemente durante la maduración cerebral y parece estar implicada en la plasticidad neuronal y sináptica, en la diferenciación y supervivencia celular y en la neurotransmisión dopaminérgica (Quijano, 2001). Se acumula en los CL y otros depósitos neurales ligada a componentes del citoesqueleto por un bloqueo del transporte axonal relacionado con estrés oxidativo, posiblemente mediado por el citocromo c (Giasson y cols, 2000). Además, el hecho de que la mayor parte de las proteínas que forman los CL se encuentren fosforiladas y que la enzima superóxido dismutasa esté presente en ellos, sugiere la implicación de mecanismos oxidativos en la formación de los CL (Obeso y cols, 2002).

En la actualidad se lleva a cabo un intenso trabajo de investigación dirigido a demostrar qué defectos en el sistema de degradación proteica asociado a la ubiquitina, conducen a la agregación proteica que da lugar a los CL. Parece claro que mutaciones en el gen que codifica para la  $\alpha$ -sinucleína y/o en el gen parkin, que codifica para una proteína semejante a la ubiquitina, están muy relacionadas con la formación de los CL (Gwinn-Hardy y cols, 2002).



Al igual que ocurre con el resto de inclusiones intraneuronales en las enfermedades neurodegenerativas, la importancia etiopatológica de los CL no está aclarada; no se ha definido si representa neuronas en proceso de degeneración o si se trata, en cambio, de una respuesta a un proceso tóxico, siendo por tanto un mecanismo de defensa intracelular (Obeso y cols, 2002).



**Figura 4.** Corte transversal de un mesencéfalo de rata normal (A) y con parkinsonismo (B). Se aprecia la pérdida de pigmentación de la sustancia negra como consecuencia de la degeneración de sus neuronas dopaminérgicas y cuerpos de Lewy presentes en el citoplasma de algunas de las neuronas supervivientes.

### **1.3 Etiología de la enfermedad de Parkinson. Papel del estrés oxidativo**

La causa de la muerte neuronal en la EP aún no se conoce con exactitud. Actualmente se barajan varias hipótesis como factores etiológicos, entre los que se incluyen genéticos, ambientales, mitocondriales, inflamatorios, excitotóxicos, aunque lo más probable es que sea una combinación de varios de ellos lo que propicie el inicio de la enfermedad. El **estrés oxidativo** se considera actualmente como uno de los mecanismos más importante en la etiopatología de la EP y aparece como denominador común en la práctica totalidad de las hipótesis formuladas para el desarrollo y propagación del daño neuronal. Está especialmente implicado en las alteraciones de las funciones mitocondriales y es el vehículo principal del daño ocasionado en los procesos excitotóxicos.

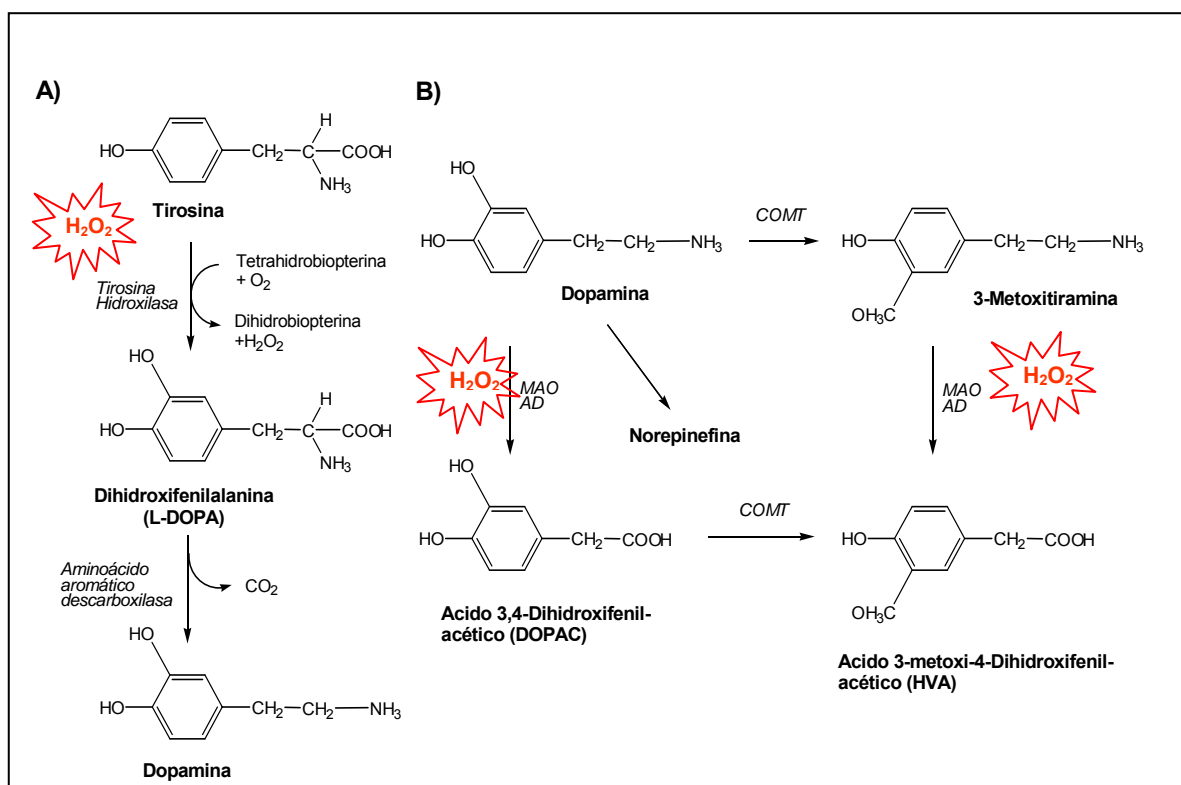
#### **1.3.1 Estrés oxidativo en la enfermedad de Parkinson**

En las últimas décadas se ha considerado a los radicales libres como una posible causa en la génesis de la EP y a la mitocondria como orgánulo fuente y diana de los mismos. El deterioro en la actividad mitocondrial contribuye a la generación de radicales libres, pero los radicales procedentes de otra fuente cercana, como el catabolismo de la propia dopamina, también causan daños en los complejos de la cadena de transporte electrónico (CTE), más susceptibles al estrés oxidativo, generándose aún más especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS) (Fariello, 1988).

#### **Catabolismo de la dopamina. Implicación del hierro.**

Las neuronas dopaminérgicas de la SNc son particularmente vulnerables a la degeneración (Hirsch y cols, 1997; Uhl, 1998), ya que los niveles basales de ROS en condiciones normales son elevados. Ello es debido a:

- 1) Tanto en la síntesis de DA por medio de la tirosina hidroxilasa (TH) como en su metabolismo enzimático normal, vía monoamino oxidasa (MAO), se genera  $H_2O_2$  (figura 5), que en presencia de metales, como el hierro contenido en estas neuronas, puede originar, a través de la reacción de Fenton, radicales libres más peligrosos.

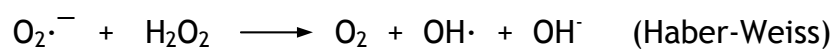
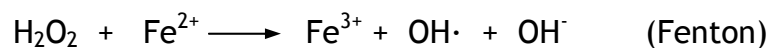
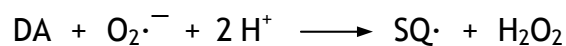
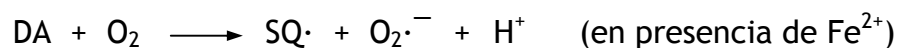


**Figura 5.** Vías de síntesis (A) y degradación (B) enzimáticas de la dopamina. La tirosina hidroxilasa es la enzima principal en la ruta de síntesis de la dopamina. En este proceso se libera  $H_2O_2$ , aunque es la acción de la MAO, en su catabolismo, la que más peróxido libera.

La DA, una vez sintetizada, es captada por un sistema dependiente de energía y almacenada en vesículas en forma de complejos proteínicos. La DA que queda libre en el citosol es deaminada por la MAO y deshidrogenada por la alcohol deshidrogenasa (AD) originando DOPAC, principal metabolito de la DA; en estas reacciones enzimáticas sucesivas se libera  $H_2O_2$ , como subproducto. La MAO se

localiza en la membrana externa de las mitocondrias (Costa, 1972), lo que le confiere un papel estratégico para eliminar la DA libre en el citosol, evitando así su autooxidación. Otra vía de degradación de la DA es la metilación por la catecol-O-metiltransferasa (COMT), dando lugar a 3-metoxitiramina, la cual es sustrato de nuevo de la MAO y la AD para seguir su catabolismo. La COMT es un enzima extraneuronal, por lo que esta vía de degradación tiene lugar fuera de la neurona (Wood y cols, 1988; Brown, 1991).

- 2) La autooxidación no enzimática de la DA produce **neuromelanina**. Esta proteína tiene un papel citoprotector en condiciones normales y actúa secuestrando iones metálicos (sobre todo hierro). Sin embargo, la presencia de un exceso de  $H_2O_2$  oxida al hierro formando radicales  $OH\cdot$  siguiendo la reacción de Fenton (Fahn y cols, 1992; Jellinger y cols, 1992, Jenner y cols, 1992). Curiosamente, la mayoría de las neuronas de la SNc afectadas en la EP son aquellas que contienen neuromelanina (Hirsch y cols, 1998).
  
- 3) Al tener un grupo catecol inestable, la DA también puede sufrir oxidación espontánea originando radicales  $O_2\cdot^-$  y semiquinonas ( $SQ\cdot$ ), que reaccionan a su vez con más moléculas de DA generando un elevado número de ROS (Kondo y cols, 1996; Aguilar y cols, 1998).



- 4) Tiene lugar un descenso importante de células en SNc que sintetizan glutathion peroxidasa, lo que conlleva a un defecto en la capacidad de detoxificación basal (Damier y cols, 1993).

Todos estos datos subrayan la predisposición de las neuronas de la SNc al estrés oxidativo y a la degeneración, situaciones que se hacen evidentes en el caso de la EP, donde se ha observado:

- a) un aumento de los niveles de  $Fe^{3+}$  en la SNc (Rieder y cols, 1989; Jellinger y cols, 1990) que posteriormente se demostró que estaba relacionado con el estrés oxidativo, según hemos descrito. Hay autores que defienden que este aumento de hierro es consecuencia de un descenso en la ferritina celular y de un aumento en la expresión de receptores de lactoferrina en las neuronas dopaminérgicas (Levay y Bodell, 1993; Leveugle y cols, 1996)
- b) un aumento de la actividad MAO-B, una de las isoformas de la MAO implicadas en el catabolismo de la DA (Yu, 1994; Napolitano y cols, 1995), con el consecuente incremento en la producción de  $H_2O_2$  y ROS que de él y de la presencia de hierro (también elevada) se derivan.
- c) un aumento en la relación glutathion oxidado/glutathion reducido (**GSSG/GSH**), incrementándose así la concentración de radicales OH· tóxicos (Sian y cols, 1994). Esta desregulación en las reservas de glutathion constituye uno de los defectos bioquímicos primarios en la EP. El deterioro de la detoxificación dependiente de GSH se puede ver afectado por un aumento de la dopamina recaptada, que, al metabolizarse vía MAO, puede por sí misma originar más  $H_2O_2$  y agotar las reservas de GSH. Además, un descenso de GSH va

acompañado de una caída de la catalasa (Ambani y cols, 1975) y de la expresión de GPx (Kish y cols, 1985). Todo esto alimenta el círculo vicioso de la producción de ROS, cuya concentración aumenta de forma exponencial.

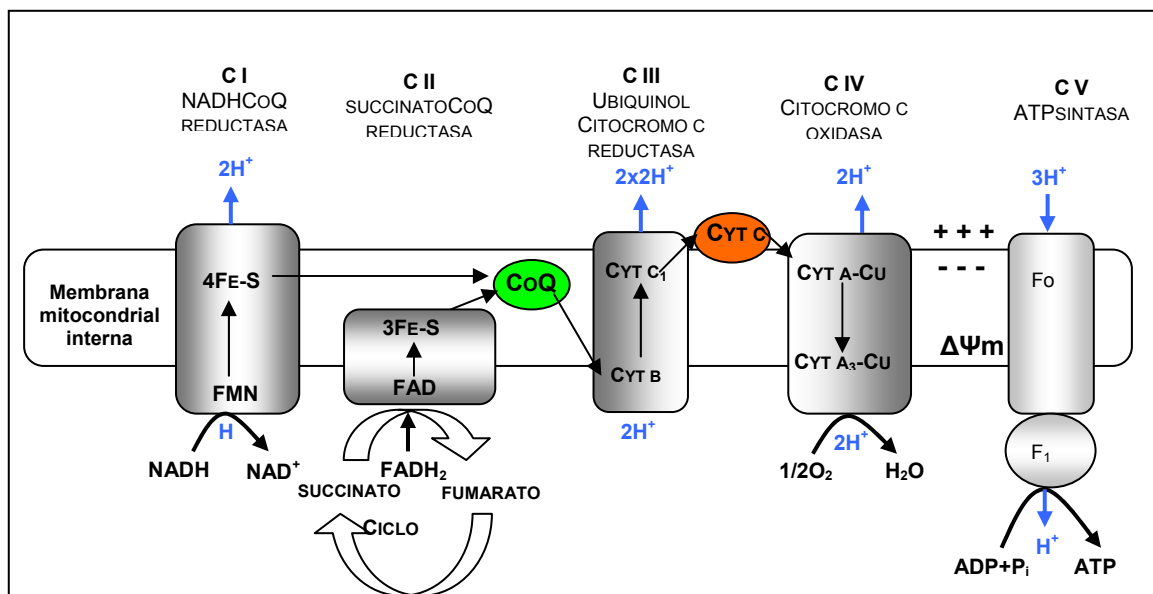
- d) en cerebros de pacientes de EP se ha encontrado un descenso en los niveles de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) y un aumento de los niveles de compuestos que reaccionan con ácido tiobarbitúrico, indicadores de peroxidación lipídica y la presencia de 8-hidroxi-2-deoxiguanosina, un marcador de daño oxidativo al DNA (Dexer y cols, 1989; Sánchez-Ramos y cols, 1994)
- e) activación de las células de la microglía en la SNc en degeneración (McGeer y cols, 1988), las cuales producen **NO** y **citoquinas**, como el TNF- $\alpha$ . Además la expresión de la oxido nítrico sintasa inducible (**iNOS**) está elevada en cerebros de pacientes de EP (Hunot y cols, 1996). Todo esto conduce a un aumento de los niveles de NO y a la generación del radical peroxinitrito ( $\text{ONOO}^\cdot$ ). Finalmente, el aumento de los niveles de ROS puede inducir una excitotoxicidad secundaria, aumentando los niveles de calcio libre intracelular, que activan a la NOS y aumentan los niveles de NO intracelulares.

### **Defectos mitocondriales**

La mitocondria es la principal fuente de energía de la célula. En ella tiene lugar la fosforilación oxidativa y la síntesis de ATP. En condiciones aerobias, la fosforilación oxidativa acoplada a la transferencia de electrones a través de la CTE es responsable de la producción del 90-95% del ATP que genera la célula (Skulachev, 1999).

La CTE tiene como misión oxidar los equivalentes reductores ( $\text{NADH}$  y  $\text{FADH}_2$ ) generados en el ciclo de Krebs por la oxidación del acetilCoA, que

procede de la combustión de los principios inmediatos. La cadena respiratoria está formada por cinco complejos multiproteicos unidos a la membrana interna de la mitocondria y por proteínas transportadoras (citocromos) ensambladas entre ellos. Los complejos I y II reciben electrones de la oxidación del NADH y del succinato, respectivamente, y los donan a la coenzima Q (CoQ), transportador electrónico lipídico. El CoQ reduce a su vez al citocromo c, transportador electrónico que puede desplazarse por el interior de la membrana interna. Por último, el complejo IV acopla la oxidación del citocromo c con la reducción del O<sub>2</sub> a agua. Las reacciones de los complejos I, III y IV proporcionan energía para bombear protones a través de la membrana interna, originando un gradiente protónico en la membrana interna asociado a una diferencia de potencial ( $\Delta\Psi_m \sim 0.15$  V). Los protones vuelven a entrar en la membrana a través de un canal específico en el complejo V. La energía liberada por este proceso impulsa la síntesis endergónica de ATP a partir de ADP y fósforo inorgánico (figura 6) (Lehninger, 1965; Mitchell, 1979).



**Figura 6.** Esquema de la cadena de transporte electrónico mitocondrial. Se representan los cinco complejos enzimáticos entre los cuales se dan reacciones de oxido-reducción que originan un gradiente de protones, que aprovecha el complejo V para la síntesis de ATP.

En los años 80 y a raíz del descubrimiento de que una toxina sintética (el MPTP) producía síntomas de parkinsonismo en heroinómanos que consumían droga adulterada con esta sustancia (Langston y cols, 1983), se empezó a estudiar el papel que la inhibición del complejo I podía tener en la patogénesis de la EP. El MPP+, metabolito activo del MPTP, es un potente inhibidor del complejo I de la CTE, y esta inhibición puede tener como consecuencias un descenso en la producción de ATP, un aumento del estrés oxidativo y una inducción muerte celular por apoptosis y (Nicklas y cols, 1985).

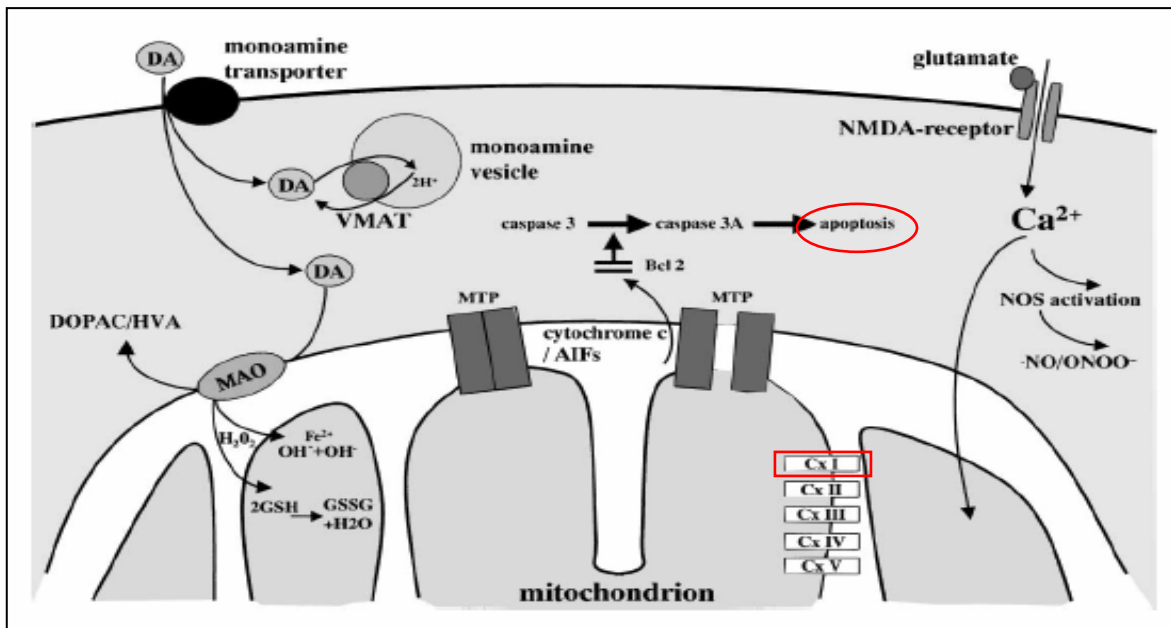
Otros datos sugieren que los pacientes de EP sufren un defecto sistémico en el complejo I, que afecta tanto al cerebro como a tejidos periféricos. En 1989 se encontró que pacientes de EP presentaban deficiencias en la actividad del complejo I mitocondrial en cerebro, plaquetas (Mizuno y cols, 1989; Parker y cols, 1989; Schapira y cols, 1989) y músculo (DiMauro, 1993). En plaquetas aparece aproximadamente un 25% de pérdida en la actividad del complejo I (Greenamyre y cols, 2001) y un 30-40% en la SNc (Schapira y cols, 1990).

El origen del daño en el complejo I aún no se conoce con certeza. Se ha sugerido la posibilidad de mutaciones en mtDNA como responsables de tal defecto (Swerdlow y cols, 1996; Gu y cols, 1998). A su vez, se señala al estrés oxidativo como causante de los daños en el mtDNA (Sherer y cols, 2002a). La proximidad de la MAO (ubicada en la membrana mitocondrial) apoya esta hipótesis, ya que puede actuar como fuente de radicales libres a este nivel. Por otra parte también se ha propuesto que la exposición a agentes ambientales tóxicos (como el caso del MPTP, el paraquat o la rotenona) es la causa la inhibición de este complejo (Schapira, 1998; Le Couteur y cols, 1999).



La inhibición de cada complejo respiratorio produce un bloqueo en la transferencia de electrones a través de la CTE, de modo que el bombeo de protones asociado al funcionamiento de la cadena cesa parcial o totalmente. Esto se traduce en un descenso en la actividad del complejo V y en una reducción en la producción de ATP. El complejo I es el que mayor control ejerce sobre la respiración mitocondrial (Nicholls y cols, 2000) 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). La inhibición del complejo I (**figura 6**) permite que el complejo III se pueda reducir, y, por tanto, continúe 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 FADH<sub>2</sub>, 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.

El mecanismo por el cual la disfunción en el complejo I conduce a una selectiva neurodegeneración en la EP está aún por dilucidar. No obstante queda claro que la reducción en la actividad del complejo I predispone a la excitotoxicidad y al daño oxidativo, ambos implicados en la etiopatogénesis de la EP (**figura 7**).



**Figura 7.** Resumen de la posible vía mitocondrial implicada en la enfermedad de Parkinson. La función mitocondrial se ve comprometida endógenamente por defectos en el complejo I. La mitocondria está involucrada en el metabolismo de la dopamina; la MAO B se localiza en la membrana mitocondrial externa, donde genera especies reactivas de oxígeno. El citocromo c y el factor inductor de apoptosis (AIFs) se localizan en el espacio intermembrana y cuando son liberados al citosol, por apertura del poro mitocondrial de transición, inducen la muerte celular por apoptosis. La mitocondria actúa como amortiguador celular de Ca<sup>2+</sup>. Los receptores NMDA median en un efecto excitotóxico incrementando la concentración de Ca<sup>2+</sup> en el citosol e induciendo a la NOS, productora de NO y peroxinitritos (ONOO<sup>-</sup>).

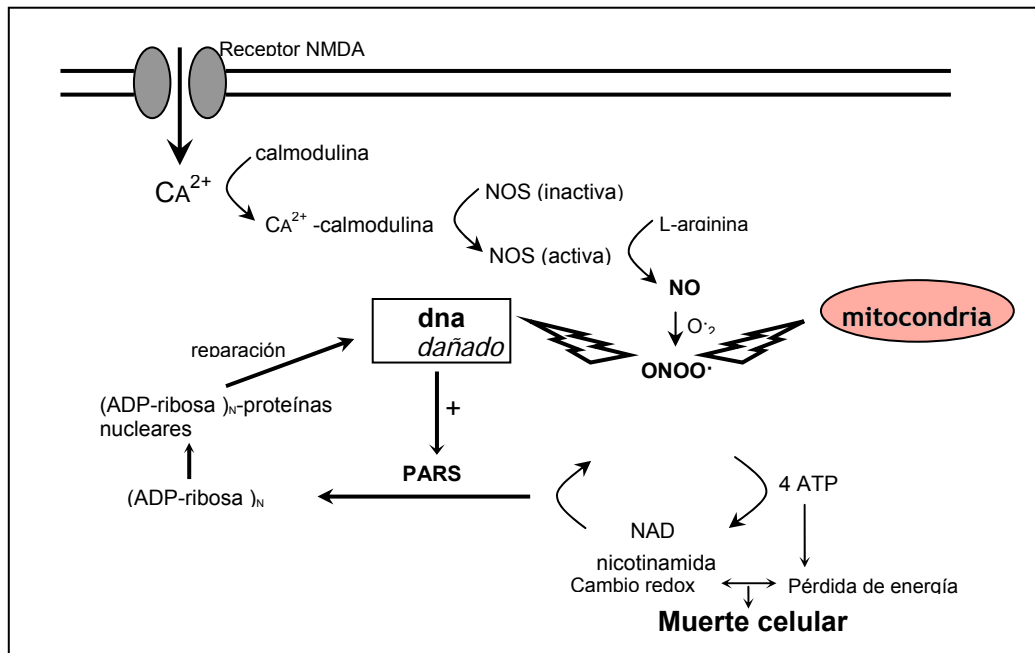
## Excitotoxicidad del glutamato

El glutamato es un neurotransmisor implicado en numerosas vías de excitación neuronal. Entre ellas, interviene en la vía excitadora del circuito 'corteza - ganglios basales - tálamo - corteza' y cuya conexión nigroestriatal se degenera en la EP. El glutamato actúa a nivel de dos grupos de receptores: los ionotrópicos (N-metil-aspartato o NMDA y no-NMDA) y los metabotrópicos (Nakanishi, 1992). La excitotoxicidad del glutamato fue descrita por primera vez en los años 70 (Olney y cols, 1971), y se refiere a la activación excesiva de los receptores ionotrópicos que conduce a la apertura de canales iónicos asociados a la entrada masiva de Ca<sup>2+</sup> en la célula (Meldrum y cols, 1990). El

aumento en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico activa numerosas enzimas  $\text{Ca}^{2+}$ -dependientes, entre ellas la nNOS, que cataliza la síntesis de NO. Cuando tiene lugar una sobreexcitación de los receptores NMDA por mayor presencia de glutamato, el NO daña a la neurona a través de los peroxinitritos que forma y que no pueden ser depurados en su totalidad por el sistema antioxidante celular (Radi y cols, 1991; Torreilles y cols, 1999; Carreras y cols, 2004). Además, el estrés oxidativo puede activar la poli ADP-ribosa sintetasa (PARS), enzima nuclear que interviene en los procesos de reparación del DNA (Gaal y cols, 1987). Este enzima se activa cuando se daña la molécula de DNA y añade unidades de ADP-ribosa a proteínas nucleares tales como las histonas con el fin de facilitar el acceso de las enzimas encargadas de reparar el DNA dañado.

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. Esto provoca un descenso de las defensas antioxidantes de la neurona y el aumento de los niveles de radicales libres (Pereira y cols, 1996; Tan y cols, 1998).

Durante el proceso de acoplamiento de ADP-ribosa se consume una molécula de NAD y cuatro de ATP, que son necesarios para regenerar el NAD. De esta forma la activación de la PARS, algo en un principio necesario y beneficioso para la célula, puede consumir las reservas de energía celular que, con un defecto mitocondrial asociado al estrés oxidativo, ya están bastante mermadas (**Figura 8**).



**Figura 8.** Mecanismo de neurotoxicidad del NO, mediada por los receptores NMDA del glutamato.

En las neuronas, la respiración mitocondrial es la única fuente de producción de ATP (Sherer y cols, 2002a), y los niveles de ATP desempeñan un papel muy importante en el mantenimiento de la homeostasis celular. Por ejemplo, niveles reducidos de ATP disminuyen la actividad de la ATPasa de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  de la membrana plasmática, produciendo una despolarización parcial de la neurona. La despolarización neuronal disminuye el bloqueo de magnesio voltage-dependiente del receptor NMDA de glutamato. Bajo estas condiciones, incluso niveles normales de glutamato extracelular pueden causar una activación excitotóxica de los receptores de NMDA y una elevación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Además, se ha demostrado que defectos crónicos en el complejo I alteran las cascadas de señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  en células neuronales (Sherer y cols, 2001). Así, daños 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 Greenamyre, 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 neuronas de núcleo subtálmico están sobreactivadas (Bergman y cols, 1990). Estas células son excitadoras y glutamatérgicas y además sus terminaciones actúan sobre neuronas de la sustancia negra (ver **figura 3**). De esta manera se acentúa el daño, ya existente *per sé*, sobre las neuronas dopaminérgicas.

### 1.3.2. Procesos inflamatorios

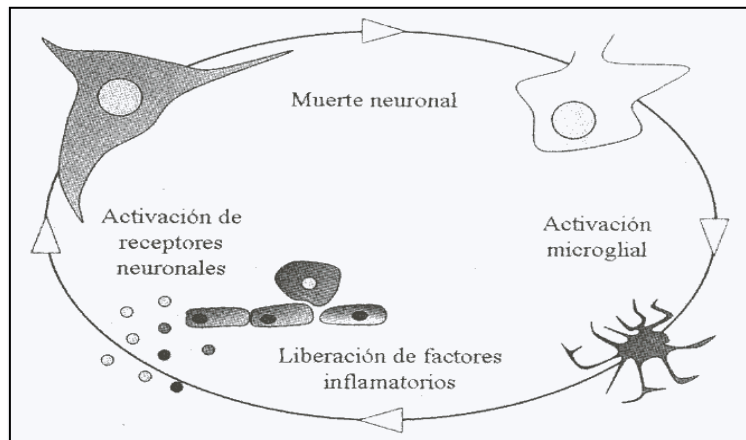
Desde que McGeer y sus colaboradores, en 1988, describieron la activación de células microgliales en el cerebro de pacientes parkinsonianos (McGeer y cols, 1988), el estudio de los procesos inflamatorios en la EP ha atravesado diferentes etapas. En la última década multitud de trabajos han demostrado la importancia que estos fenómenos pueden tener en la fisiopatología de la enfermedad. Actualmente se considera que la inflamación puede estar estrechamente ligada a la muerte neuronal y, por tanto, a la progresión de la enfermedad (McGeer, 1997; Teismann y cols, 2003; Barcia-González y Herrero-Ezquerro, 2004).

Las células gliales, y fundamentalmente la microglía, son las principales encargadas de llevar a cabo los procesos inflamatorios en el cerebro (Benveniste y cols, 1997, 2001). Estas células al activarse son capaces de liberar al medio citoquinas, quimioquinas o factores de crecimiento, que pueden ser beneficiosos, o bien ocasionar efectos dañinos (Benveniste y cols, 2004).

La evidencia de la activación microglial en la SNc de pacientes parkinsonianos tiene un significado importante; la microglía activa se caracteriza por la expresión del antígeno de histocompatibilidad de clase II

(MHC II), que en humanos se denomina específicamente HLA-DR (del inglés, *Human Leukocyte Antigen*). La expresión de este antígeno se relaciona con la presentación de antígenos a los linfocitos T, que tienen un alto poder citolítico (Watts y cols, 2003). La microglía responde normalmente a daños traumáticos o a la presencia de elementos patógenos, migra y prolifera en el lugar de la lesión y, una vez activada, en el lugar de la inflamación expresa el antígeno MHC II, se convierte en fagocítica y cambia su morfología. Las células microgliales activadas liberan diferentes citoquinas (TNF- $\alpha$ , que además induce la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B; IL 1- $\beta$ ; IL 1- $\alpha$ ; interferón- $\gamma$ ), que amplifican la respuesta inflamatoria en las células endoteliales vasculares (de hecho se ha observado un aumento del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) en la SNc de animales de experimentación (Barcia y cols, 2002)) y reclutan linfocitos en la región alterada, que pueden potenciar el daño en el sistema nervioso central (González- Scarano y Baltuch, 1999). Asimismo, las citoquinas liberadas son capaces de inducir la actividad de la iNOS en los astrocitos con el consecuente aumento de NO (Stewart y Heales, 2003).

En la **figura 9** se representa un esquema hipotético de la posible acción cíclica de los procesos inflamatorios en las neuronas dopaminérgicas de la SNc en el parkinsonismo; un factor inicial (o suma de factores desencadenantes) induciría la muerte en estas neuronas. La muerte neuronal a su vez activaría la microglía residente en el parénquima, y esta última liberaría los factores inflamatorios como citoquinas o factores de crecimiento, que podrían activar diferentes procesos inflamatorios como la proliferación de células astrogliales, reclutamiento de células del torrente sanguíneo o aumento de la vascularización. Estos eventos podrían ser los responsables de nueva muerte neuronal, ya sea por acción directa de citoquinas liberadas (tóxicas *per sé*) sobre receptores neuronales, o bien por acción del sistema inmune celular. Este fenómeno se podría presentar de forma cíclica, activando y perpetuando la muerte neuronal (Barcia-González y Herrero-Ezquerro, 2004).



**Figura 9.** Esquema hipotético de la posible acción cíclica de los procesos inflamatorios sobre las neuronas dopaminérgicas de la SNc en el parkinsonismo.

La actividad secretora de la microglía se ha asociado a otras enfermedades como el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), la esclerosis múltiple o la malaria cerebral. Sin embargo, en el parkinsonismo queda por esclarecer si esta activación microglial es causante de la muerte neuronal, es consecuencia de la muerte neuronal, y actúa simplemente como recogedor de residuos de las neuronas en el proceso de degeneración o si puede perpetuar la muerte neuronal cuando existe algún factor que active los procesos inflamatorios, ya sea genético, tóxico o ambiental (Barcia-González y Herrero-Ezquerro, 2004).

### 1.3.3. Factores genéticos

El mtDNA codifica para algunas proteínas que forman los complejos de la CTE, entre ellas 7 de las 41 subunidades que constituyen el complejo I. Los defectos encontrados en el complejo I de pacientes de EP pueden tener su raíz en daños en el código genético de la mitocondria. Este es extremadamente susceptible a los efectos del estrés oxidativo, debido a que se ubica en la matriz mitocondrial y a que está muy próximo a la fuente principal de radicales libres. Al carecer de intrones y estar desprovisto de histonas y otras proteínas, el mtDNA tiene una probabilidad 20 veces más alta que el nuclear de sufrir modificaciones en las áreas codificantes (Schapira y Cooper, 1992; Ozawa, 1995). Tras la inducción de estrés oxidativo en cultivos celulares, el daño que sufre el mtDNA es mayor y más duradero que el experimentado por el DNA nuclear (Yakes y Van Houten, 1997), indicando que los mecanismos de reparación del mtDNA son prácticamente nulos comparados con los del nuclear.

La primera mutación específica del mtDNA asociada con la EP la describió Ikebe, quien detectó en el estriado de pacientes con Parkinson deleciones puntuales en el mtDNA (Ikebe y cols, 1990). Esta observación se confirmó con posterioridad (Cortopassy y Amheim, 1990; Ikebe y cols, 1995; Michakiwa y cols, 1999) y recientemente se ha experimentado con híbridos de células de neuroblastoma y genes mitocondriales de pacientes de EP esporádico (Kosel y cols, 1999; Sherer y cols, 2002b), en los que se presenta una actividad reducida del complejo I mitocondrial y se generan inclusiones de cuerpos de Lewy con el tiempo (Trimmer y cols, 2004).

Entre el 5 y el 10% de los casos de EP se corresponden con los conocidos como hereditarios o familiares. Son aquellos en los que se ha encontrado una mutación concreta en un gen determinado responsable del desencadenamiento final de la enfermedad. En la **tabla 2** se muestran las



alteraciones genéticas que actualmente se asocian a la EP y sus características principales (Huang y cols, 2004).

De todos ellos, el gen de la  $\alpha$ -sinucleína es uno de los más estudiados, ya que fue en el primero en el que se detectó que una mutación (guanina por adenina en la posición 209 [G209A], resultando en la sustitución de alalina por treonina en la posición 53 [A53T]) en pacientes de EP de una misma familia (Golbe y cols, 1990). Posteriormente se encontró otra mutación en este mismo gen [A30P] en una familia alemana afectada por la enfermedad (Kruger y cols, 1998). Actualmente, una tercera mutación [E46K] se ha identificado en una familia española (Zarranz y cols, 2004). La  $\alpha$ -sinucleína es una proteína soluble de 140 aminoácidos que se encuentra de manera abundante en las neuronas y se concentra especialmente en las terminales presinápticas. Se sabe que actúa como chaperona en interacciones proteína-proteína y lípido-proteína (Kim y cols, 2000) y se ha encontrado unida o asociada a multitud de proteínas (Sinfilina-1, tubulina, microtúbulos asociados a la proteína TAU, proteína quinasa C, tirosina hidroxilasa desfosforilada) (Huang y cols, 2004). En pacientes de EP, la  $\alpha$ -sinucleína suele aparecer depositada junto con otras proteínas en los llamados Cuerpos de Lewy, considerado el principal marcador de la enfermedad idiopática (Spillantini y cols, 1997). Todos estos estudios reflejan el interés que la regulación y expresión génica de esta proteína presenta como factor de riesgo de la EP.

El gen **nurr1** o **nr4A2** es determinante en la diferenciación y mantenimiento de las neuronas dopaminérgicas, lo que lo sitúa en excelente posición como gen candidato para la EP. No obstante, son los genes **park** los que codifican para la proteína parkina, los que más se han estudiado. La parkina se expresa principalmente en el sistema nervioso central y es miembro de una familia de las ligasas de ubiquina E3; se encarga de unir cadenas peptídicas cortas de ubiquitina a proteínas para prepararlas para su degradación vía proteosoma (Huang y cols, 2004). Las alteraciones en los

genes park y dj-1 (Kimpara y cols, 1998; Bonifati y cols, 2003) se han relacionado directamente con lo que se conoce como *parkinsonismo juvenil*, caracterizado por el inicio temprano de la enfermedad (unos 32 años de promedio). Actualmente se siguen estudiando mutaciones en genes de la amplia familia park (1-10), que se relacionan con casos de EP familiar (Hisks y cols, 2002; Valente y cols, 2002).

En general, alteraciones genéticas en cualquier proteína que intervenga de una forma u otra en los eventos que conlleva la EP son susceptibles de tener en cuenta en el desarrollo de la misma. En conjunto, podemos decir que existe una combinación entre la predisposición genética junto con desencadenantes endógenos y/o exógenos que podrían explicar la causa de la EP, al menos en buena parte de los casos (Schapira y Cooper, 1992).

**Tabla 2.** Mutaciones genéticas específicas en parkinsonismo

Tipo	Gen	Localización	Herencia	Nº familias	C. Lewy	Signos clínicos
Mutación	$\alpha$ -sinucleína	4q21	AD	14	Si	Comienzo temprano, progresión rápida, defectos cognitivos
Triplicado	$\alpha$ -sinucleína	4q21	AD	2	Si	Comienzo temprano, progresión rápida, temblor, demencia tardía
Mutaciones	Nurr1	2q22-23	AD	10	Si	Comienzo tardío
Unión	PARK3	2p13	AD	6	Si	Comienzo tardío
Unión	PARK8	12p11.2-q13.1	AD	3	No	Comienzo tardío
Fragmentación del alelo	PARK10	1p32		51	Desconocido	Comienzo tardío
Mutación	UCHL1	4p14		1	Desconocido	Comienzo tardío
Mutación	NF-M	8p21		1	Desconocido	Comienzo juvenil, demencia tardía
Delección/mutación	Parkin	6q25-27	AR	>60	No	Comienzo juvenil, progresión lenta, distonía focal
Unión	PARK6	1p35	AR	9	Desconocido	Comienzo temprano, progresión lenta
Delección/mutación	DJ-1	1p36	AR	2	Desconocido	Comienzo temprano, progresión lenta, distonía focal

AD: autonómico dominante, AR: autonómico recesivo, Nurr1: receptor nuclear afín1, UCHL1: ubiquitin C-hidrolasa L1, NF-M: neurofilamento medio.

#### 1.3.4. Factores ambientales

El caso más conocido de parkinsonismo inducido por un agente tóxico externo fue el que tuvo lugar a principios de los ochenta en California, donde unos heroinómanos empezaron a presentar signos típicos de la EP (Langston y cols, 1983). Posteriormente se supo que dichos pacientes se habían inyectado, como contaminante de la droga, una sustancia denominada 1-metil,4-fenil,1-2-3-6-tetrahidropiridina (MPTP). Cuando los pacientes se volvían a inyectar de nuevo la mezcla de drogas, se desarrollaban gradualmente síntomas cada vez más persistentes de parkinsonismo. Esto hizo pensar que alguna sustancia más común y emparentada estructuralmente con el MPTP captada del entorno o producida naturalmente en el cerebro, se hallaba en el trasfondo del Parkinson idiopático. Esta teoría se vio apoyada con casos en los que el paraquat (herbicida ampliamente usado en agricultura y actualmente prohibido) y la tetrahidroisoquinolina (toxina endógena relacionada con la degeneración dopaminérgica) inducían también parkinsonismo, dado que su estructura química es muy similar a la del MPTP o concretamente a la de su metabolito activo, el MPP+ (Barbeau y cols, 1985; Naoi y cols, 1993).

El estudio de estos factores de riesgo resulta muy complicado por diversos motivos; la exposición al ambiente y la interacción entre gen-agente tóxico ambiental tienen lugar en un momento o periodo de tiempo determinado, pero sus efectos no son detectables hasta años después. Además, los síntomas más característicos en el proceso neurodegenerativo de la EP suelen deberse al resultado aditivo o sinérgico de múltiples factores que concluyen en un aumento de la vulnerabilidad del sistema nigroestriatal a daños tóxicos (Di Monte, 2003).

Entre los factores tóxicos ambientales, los de mayor interés de estudio son aquellos capaces de ocasionar daño en la vía nigroestriada, como ciertos metales y pesticidas:

- *metales*

Los metales de transición, como el hierro y el cobre, se pueden considerar como factores de riesgo en base a su acumulación en la sustancia negra y a su participación en las reacciones oxidativas originando  $H_2O_2$  en la oxidación enzimática de la dopamina y radical hidroxilo según las reacciones de Fenton y Haber-Wiess (Dexter y cols, 1989).

Recientemente se ha mostrado que hay metales que interaccionan con la  $\alpha$ -sinucleína y promueven su fibrilación *in vitro* (Uversky y cols, 2001). Esta interacción puede jugar un papel importante en el desarrollo de la patología de la EP, ya que la  $\alpha$ -sinucleína es el principal componente de los Cuerpos de Lewy.

Aunque no existen estudios epidemiológicos concluyentes que admitan una relación directa entre la exposición a metales y la EP, sí se ha sugerido que la combinación de metales (por ejemplo, hierro y cobre) puede aumentar el riesgo de desarrollar la enfermedad, siempre y cuando la exposición a los mismos se haya dado durante un largo periodo de tiempo (Gorell y cols, 1999).

- *pesticidas*

Se ha demostrado, tanto en clínica como en trabajos experimentales, el efecto de los pesticidas como neurotoxinas. Existen muchos estudios epidemiológicos que defienden que la exposición a ciertos pesticidas se asocia con un mayor riesgo de sufrir EP (Semchuk y cols, 1992; Liou y cols, 1997; Gorell y cols, 1998; Petrovitch y cols, 2002). Estos resultados están en concordancia con los visto en agricultores, donde el riesgo aumenta de manera directamente proporcional a la dosis y al tiempo de exposición al pesticida; un estudio en Taiwan, revela que el riesgo de padecer EP es de hasta seis veces mayor en agricultores que usaron durante más de 20 años el

paraquat como pesticida en los campos de arroz (Petrovitch y cols, 2002). Además del paraquat, se han estudiado otros pesticidas como organoclorina, derivados del carbamato y rotenona (Liou y cols, 1997; Gorell y cols, 1998).

A pesar de estos resultados, se hace necesario un estudio mucho más exhaustivo sobre la relación entre el riesgo de padecer EP y la exposición a herbicidas, ya que hay que tener en cuenta muchos factores a la hora de la recogida de datos entre la población (análisis prospectivos o retrospectivos, población ocupacional o residencial, variabilidad genética de la población, etc.) (Di Monte, 2003).

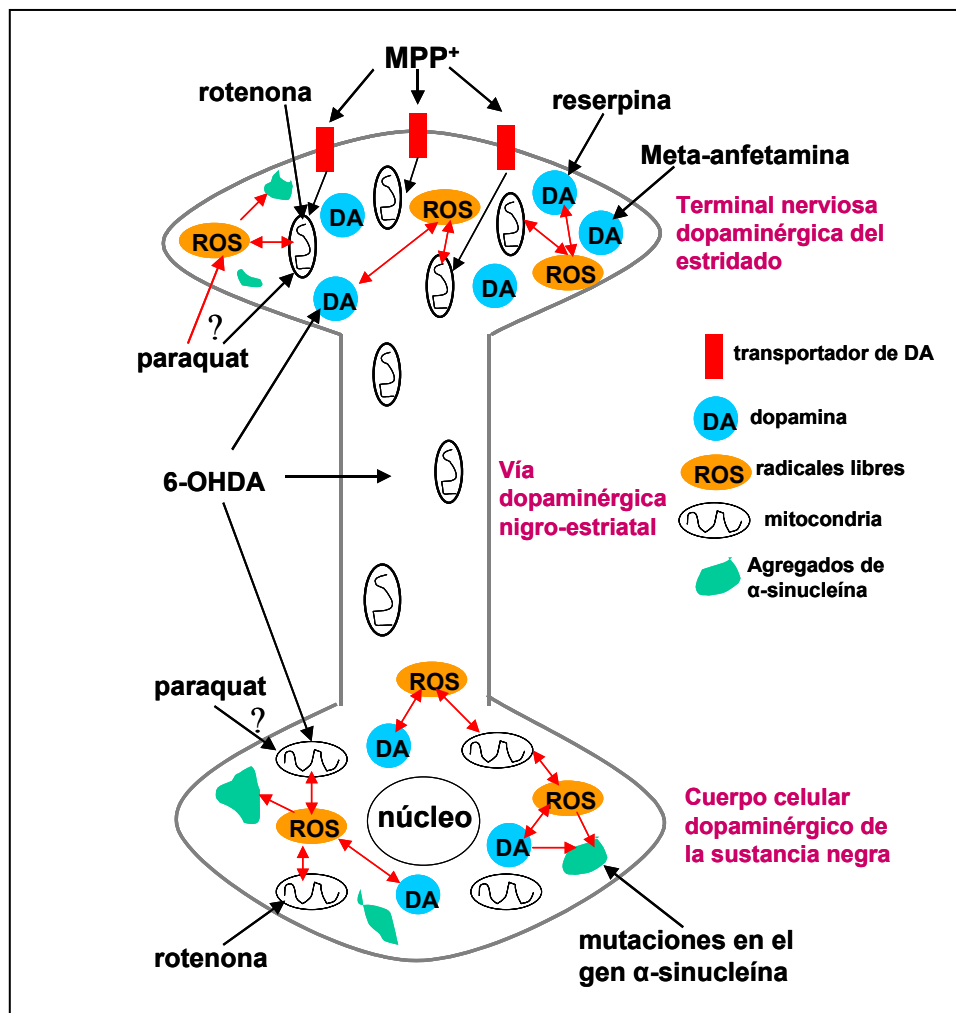
No obstante, el uso de algunos de estos agentes se ha extendido en investigación para emplearlos como tóxicos en modelos de EP experimental, tal es el caso de la rotenona, el MPTP o el paraquat, que se ha demostrado que, al igual que los metales, inducen la fibrilación de la  $\alpha$ -sinucleína y provocan una degeneración de la vía nigro-estriada (Betarbet y cols, 2000; Ubersky y cols, 2001).

#### **1.4. Modelos experimentales de Enfermedad de Parkinson. La rotenona como tóxico en modelos *in vitro* con células PC12.**

Los modelos experimentales son necesarios para la ciencia médica y son herramientas muy útiles en investigación, ya que permiten comprender la patoagénesis de enfermedades desarrolladas en humanos y ser usados como objetivos terapéuticos para el tratamiento de dichas patologías.

La EP fue la primera enfermedad neurológica de la que se desarrollaron modelos experimentales. Para ello se han empleado multitud de sustancias capaces de mimetizar en cierta medida lo que sucede en la enfermedad real. Así, se han usado agentes que destruyen selectivamente el sistema catecolaminérgico, como la reserpina, metanfetaminas, 6-hidroxidopamina y

MPTP. Desde hace unos años se estima que productos químicos usados en agricultura, como el paraquat y la rotenona, reproducen situaciones características de la EP (aparentemente vía estrés oxidativo) cuando son administrados sistemáticamente (Semchuk y cols, 1992; Liou y cols, 1997; Gorell y cols, 1998; Betarbet y cols, 2000; Ubersky y cols, 2001; Petrovitch y cols, 2002). La **figura 10** muestra los mecanismos moleculares de actuación de diversas drogas usadas como neurotóxicos en modelos experimentales de EP.



**Figura 10.** Esquema de los principales mecanismos de acción de distintos neurotóxicos usados en modelos experimentales de EP.

## La rotenona como tóxico en modelos experimentales de EP.

La rotenona es un compuesto natural derivado de las raíces de algunas plantas. Se usa comúnmente como insecticida para jardines o para eliminar ciertas poblaciones de peces en lagos y estanques.

La rotenona se caracteriza por ser un inhibidor altamente selectivo del complejo I de la CTE. Es un compuesto extremadamente lipofílico, por lo que atraviesa sin problemas las membranas biológicas y no depende del transportador de la dopamina para entrar en el citoplasma, lo que le confiere ventaja frente a otros tóxicos inhibidores del complejo I como el MPTP (dependiente de dicho traslocador para penetrar en la célula, donde es transformado por la MAO B en su metabolito activo, el MPP+) (Betarbet y cols, 2000).

De la misma forma que tiene lugar en pacientes de EP, la rotenona es capaz de inducir inhibición del complejo I en distintas regiones del organismo, dependiendo de la dosis empleada, tiempo de exposición y vulnerabilidad que el tejido presente al tóxico (Betarbet y cols, 2000; Sherer y cols, 2002a).

Existen protocolos de administración crónica de rotenona a ratas mediante infusión sistémica en los que se controla la dosis para producir una inhibición sustancial del complejo I, pero con un mínimo impacto sobre la respiración mitocondrial (el cerebro presenta un “efecto límite” para no verse privado de la respiración aunque el complejo I esté inhibido (Davey y Clark, 1996)). Esta inhibición sistémica, uniforme y crónica, mantenida durante un periodo de varios días o semanas, causa una degeneración selectiva de las neuronas de la sustancia negra (Betarbet y cols, 2000). La degeneración empieza en las terminales nerviosas y progresa retroactivamente hacia el soma celular. Además, muchas de las neuronas presentan inclusiones citoplasmáticas que, al igual que los cuerpos de Lewy en la EP, contienen  $\alpha$ -sinucleína y ubiquitina (Greenamyre y cols, 2003). La degeneración dopaminérgica va acompañada



por un marcado aumento en proteínas dañadas oxidativamente (aumento del nivel de carbonilos) en estas regiones del cerebro, similar al que tiene lugar en la EP (Greenamyre y cols, 2003).

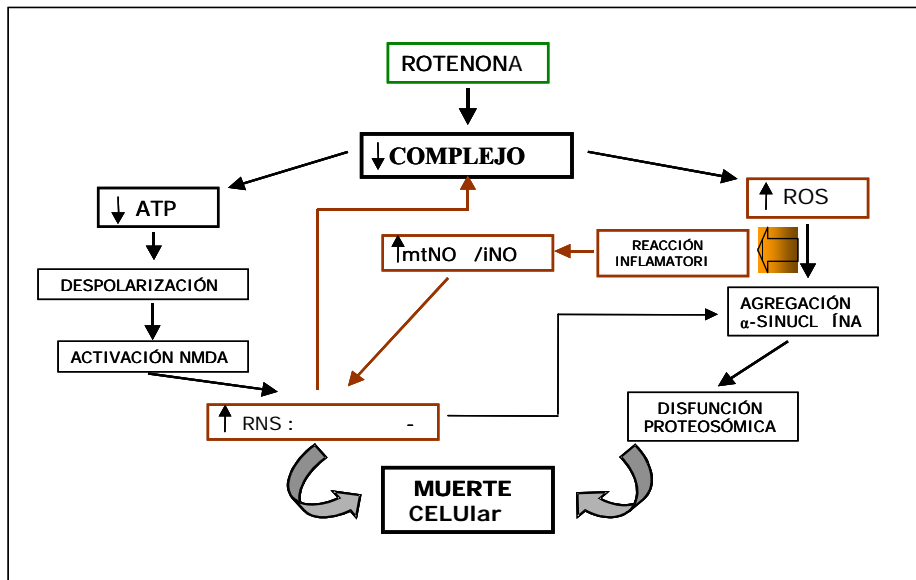
En cuanto a su comportamiento, los animales tratados con rotenona presentan síntomas de parkinsonismo como bradicinesia y rigidez; las ratas más afectadas permanecen en posturas flexionadas y sufren las parálisis motoras típicas de los estadios más avanzados de la EP (Greenamyre y cols, 2003).

- *Mecanismo de acción de la rotenona*

Los modelos de toxicidad crónica de la rotenona muestran, tanto *in vivo* como *in vitro*, que este pesticida causa un marcado descenso de glutatión, acompañado de daño oxidativo a proteínas y DNA (Sherer y cols, 2002b). Se cree que hay un sitio de escape de electrones próximo al sitio de unión de la rotenona al complejo I (Hensley y cols, 1998). En presencia de rotenona, los electrones se escapan del complejo y se combinan con el oxígeno presente dando lugar a las conocidas ROS. Estas ROS atacan a las proteínas y al DNA causándoles modificaciones específicas que permiten su detección en modelos experimentales (Greenamyre y cols, 2003). Así, una inhibición baja, pero crónica del complejo I por rotenona, reproduce el daño oxidativo característico de la EP.

En modelos *in vivo*, se ha observado una dramática activación de la microglía en el tracto nigro-estriatal y una débil activación en áreas no dopaminérgicas como la corteza (Sherer y cols, 2002b). La activación de la microglía comienza antes de que haya evidencias anatómicas de degeneración, sugiriendo que presenta un papel activo en la degeneración dopaminérgica en este modelo. Apoyando esta idea, Gao y sus colaboradores afirman que en células en cultivo, la rotenona sólo es tóxica en la presencia de célula microgliales (Gao y cols, 2002).

En la **figura 11** se representa esquemáticamente el efecto de la inhibición que la rotenona ejerce sobre el complejo I de la ETC. Posiblemente sean los mismos eventos, o muy parecidos, que ocurren en las neuronas de la sustancia negra en pacientes de EP.



**Figura 11.** Representación esquemática del efecto de la inhibición del complejo I por la rotenona y su relación con la muerte celular.

### Los modelos *in vitro*. Las células PC12 como modelo de estudio para la EP.

Los modelos *in vitro* permiten determinar los mecanismos de acción de fármacos y tóxicos y describirlos farmacológica y molecularmente, antes de sean corroborados posteriormente con estudios en animales.

Uno de los primeros ensayos de citotoxicidad en cultivos celulares con tóxicos inductores de parkinsonismo lo utilizaron en 1973 Hill y sus colaboradores (Hill y cols, 1973). Desde entonces se han empleado cultivos de células cromafines (Unsicker y cols, 1976; Kirpekar y cols, 1983), células de neuroblastoma (Tiffany-Castiglioni y Pérez-Polo, 1981), células de feocromocitoma (Yoffe y Borchardt, 1982), gránulos cerebelosos (Garber-

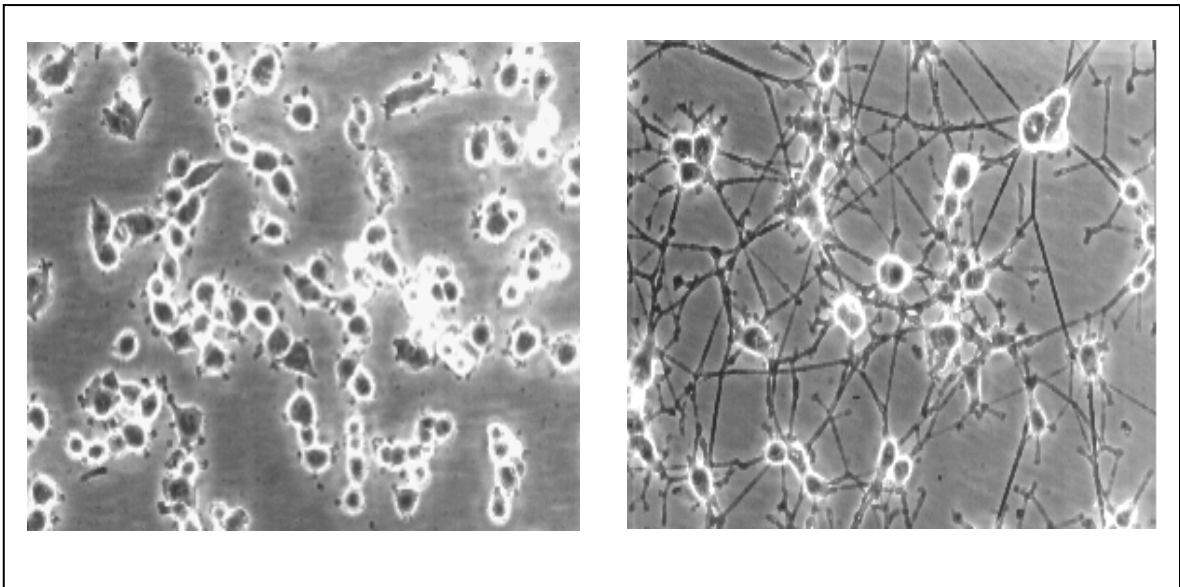
Goldsman y cols, 1986), cultivos de cresta neural de pollo (Christie y cols, 1987), células mesencefálicas fetales de rata (Michel y Hefti, 1990; Pietz y cols, 1996) o humanas (Spenger y cols, 1996).

Todos estos modelos se basan en células dopaminérgicas en cultivo que son susceptibles de ser dañadas por ciertos neurotóxicos inductores de parkinsonismo (6-OHDA, MPTP, rotenona). Estos experimentos han conseguido avanzar en el estudio de los mecanismos de acción de estas drogas, así como en la búsqueda de nuevas sustancias para prevenir el daño. Sin embargo, uno de los modelos de estudio en células dopaminérgicas más atractivo y utilizado es la **línea celular PC12**.

El empleo de las células PC12 como modelo para el estudio de la EP parte de mediados de los 70, cuando Greene y Tischler establecen una línea celular clonal a partir de un trasplante de feocromocitoma de rata. Presenta un número de cromosomas (40) muy cercano a la diploidía. Una de las características más llamativas es su capacidad de respuesta de forma reversible al factor de crecimiento nervioso (**NGF**). Así, al cabo de una semana de cultivo con este factor las células PC12 cesan de dividirse y comienzan a emitir neuritas adoptando una morfología neuronal típica (**Figura 12**). También comienzan a producirse los potenciales de acción y la despolarización de la membrana. Si se elimina el NGF y se vuelven a cultivar en condiciones normales la neuritas acaban degenerando y las células vuelven a dividirse (Greene y Tischler, 1976). Se puede llegar a conseguir una diferenciación irreversible de las PC12 con NGF si se añaden análogos de nucleótidos de adenina en el medio de cultivo (Charles y cols, 2003).

En condiciones normales de cultivo, las células PC12 (indiferenciadas) son redondeadas u ovals y tienden a agregarse unas a otras formando los llamados “clusters”, sin emitir ningún tipo de neuritas. Estos cultivos duplican su población cada 92 horas.

Desde un punto de vista estructural, las PC12 presentan al microscopio electrónico una serie de gránulos densos redondeados u ovoideos de 40-350 nm similares a los que se encuentran en el citoplasma de las células cromafines de la rata. Algunos de estos gránulos son fuertemente electrodensos, mientras que otros son más pálidos y granulares. Las células contienen en ocasiones, además de esos gránulos, una serie de vesículas más pequeñas y claras.



**Figura 12.** Aspecto de un cultivo de células PC12 no diferenciadas (izquierda) frente a uno de células PC12 diferenciadas con NGF (derecha).

Funcionalmente hablando, las PC12 contienen **catecolaminas** y las enzimas que las sintetizan (tirosina hidroxilasa (TH), dopa descarboxilasa y dopamina  $\beta$ -hidroxilasa) así como sus enzimas catabólicas monoamino oxidasa (MAO) y catecol-O-metiltransferasa (COMT). Producen principalmente dopamina y, al contrario que las células adrenérgicas, no sintetizan adrenalina ya que carecen de feniletanolamil N-metiltransferasa, su enzima sintetizante. El tratamiento con NGF no altera los contenidos de catecolaminas ni las correspondientes actividades enzimáticas (Greene y Tischler, 1976).

Debido a su respuesta reversible al NGF, las PC12 son útiles en el análisis de las acciones de este factor trófico en la supervivencia neuronal, y de los mecanismos de muerte celular inducida por la eliminación de suero o por la eliminación de NGF del medio de cultivo (Rukenstein, 1991; Batistatou y Grenne, 1991), proceso que induce apoptosis y la fragmentación del ADN en pocas horas (Batistatou y Grenne, 1991). Quizá por esta razón Pittman y cols proponen esta línea celular como un modelo muy interesante para caracterizar los principales eventos que tienen lugar durante la diferenciación neuronal (Pittman y cols, 1993).

Está sobradamente demostrado que la rotenona induce estrés oxidativo y apoptosis en células PC12 en cultivo (Hartley y cols, 1994; Seaton y cols, 1997; Liu y cols, 2005). Si a esto unimos el hecho de que estas son una herramienta fundamental para estudiar la muerte neuronal programada, todo ello hace que este sea un modelo inmejorable para estudiar a nivel celular y molecular los siguientes hechos:

- El proceso de daño inducido por estrés oxidativo que culmina con la muerte neuronal por apoptosis.
- El empleo de sustancias que puedan rescatar las células del daño inducido por estos mecanismos, y que tengan, por tanto, potencialidad en el tratamiento de la EP.

## 2. MECANISMOS DE MUERTE NEURONAL EN LA EP. APOPTOSIS.

Actualmente se desconoce el mecanismo de muerte 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

Las dificultades metodológicas para encontrar células apoptóticas en la SN de pacientes de EP, o incluso en modelos animales, son enormes; la degeneración es prácticamente del 70% cuando aparecen los primeros síntomas de la enfermedad, por lo que los datos que se puedan obtener a partir de muestras de estos pacientes están muy limitados. En este sentido, se ha determinado apoptosis en el 5% de las neuronas dopaminérgicas de pacientes (Agid, 1995). Más recientemente, se han encontrado elevadas concentraciones de transglutaminasa en el líquido cerebroespinal en pacientes de EP (Vermes y cols, 2004), proteína que se expresa en procesos apoptóticos. Otros estudios ponen de manifiesto la implicación de la apoptosis en la muerte neuronal en pacientes de Parkinson, donde se ha encontrado la

proteína proapoptótica Bax-inmunorreactiva en neuronas del cerebro medio de dichos pacientes (Horowitz y cols, 2003).

Por otra parte, los eventos que acompañan a la degeneración de las neuronas dopaminérgicas parecen apuntar finalmente hacia la activación de la vía de muerte celular programada; la disfunción en la CTE, la presencia de radicales libres en la mitocondria, y el colapso en el potencial de la membrana a que esto conduce, implican una apertura del complejo del poro de transición mitocondrial, hecho que precede a la liberación de citocromo c y del factor inductor de apoptosis (AIF) del espacio intermembrana al citosol y posterior activación de la vía apoptótica en la célula.

## **2.1. Muerte celular programada.**

En todo organismo multicelular adulto debe existir un equilibrio entre la generación o proliferación y la desaparición o muerte de las células que lo componen. La alteración de este equilibrio conduce a situaciones patológicas como el cáncer, cuando la proliferación aumenta descontroladamente, o las enfermedades degenerativas, cuando los procesos de muerte celular están incrementados.

Desde el embrión hasta el organismo adulto fisiológicamente sano, millones de células mueren sin dejar cicatrices ni activar células inflamatorias. Este fenómeno no tiene lugar de una forma aleatoria, sino que se trata de un proceso controlado bien definido genéticamente, en el que las células están destinadas a morir en un tiempo fijado. Así, los episodios que rodean a la **muerte celular programada** entran a formar parte de los procesos fisiológicos que resultan necesarios para el funcionamiento normal de un organismo. No obstante, dependiendo de la etiología, los procesos apoptóticos pueden resultar perjudiciales siendo responsables de diversas afecciones y su desregulación conduce a situaciones patológicas (Jordán, 2003).

Virchow, en 1858, fue el primer investigador en describir los procesos de muerte celular y, basándose sólo en parámetros macroscópicos, los definió como degeneración, mortificación y necrosis (Virchow, 1858). El término “apoptosis” fue implantado en 1972 por Kerr, Wyllie y Curie (Kerr y cols, 1972), y se refiere a la caída de las hojas desde los árboles en otoño o la de los pétalos de las flores.

## 2.2. Características morfológicas de la apoptosis.

En la **tabla 3** se detallan comparativamente la diferencias a nivel morfológico entre necrosis y apoptosis (Kerr y cols, 1987, 1994; Arends y cols, 1991).

**Tabla 3.** Comparación de las características morfológicas de la necrosis y la apoptosis

RASGO	NECROSIS	APOPTOSIS
<b>Aspecto histológico</b>	A menudo afecta a células contiguas  Habitualmente con signos de inflamación	Afecta a pocas células, de forma individual  Las células afectadas contienen partículas de cromatina condensada en el espacio intercelular y dentro de las células tisulares  Sin signos aparentes de inflamación
<b>Cambios ultraestructurales en la cromatina</b>	Agregados pequeños y sin textura; desaparece en muchos casos, cuando se destruye la membrana plasmática	Se condensa en la zona marginal, con agregados granulados densos, que confluyen en el núcleo completo o en cápsulas (medias lunas)
<b>Nucleolo</b>	Queda como cuerpo compacto, muy evidente hasta un estado avanzado durante la degradación	Disperso en gránulos, mientras el citoplasma está intacto
<b>Membrana nuclear</b>	Retiene los poros hasta la degradación citoplasmática. Eventualmente se destruye con otros orgánulos.	Sufre una involución progresiva disminuyendo de tamaño. Retiene los poros adyacentes a la eucromatina. A veces se hace discontinua, de forma que las masas de cromatina se encuentran entre los orgánulos citoplasmáticos
<b>Citoplasma</b>	Hinchazón de todos los compartimentos seguido de una ruptura de las membranas y destrucción de orgánulos. Característica densidad de la matriz mitocondrial.	Mitocondrias intactas



Al microscopio óptico, todas estas características apoptóticas se traducen en una intensa basofilia celular, causada por la compactación de la cromatina. Al final del proceso de apoptosis, las protuberancias superficiales se separan de la célula arrastrando parte del citosol y de los orgánulos, formando unas estructuras esféricas, llamadas cuerpos apoptóticos, que pueden llevar algún fragmento nuclear. Estos cuerpos aparecen dispersos por el tejido y normalmente son liberados a los lúmenes más cercanos o fagocitados por macrófagos (Kerr y cols, 1994).

Los cambios morfológicos que sufre la célula apoptótica van acompañados por modificaciones bioquímicas características tales como:

- Incremento moderado, pero sostenido, de la concentración de calcio libre en el citoplasma.
- Cambios en la composición de la membrana celular: traslocación de grupos glicanos a la superficie celular que van a actuar como señal de reconocimiento, permitiendo la unión de fagocitos y evitando la liberación del contenido celular y la posible reacción inflamatoria.
- Aumento y activación de la síntesis de determinadas proteínas necesarias en las rutas metabólicas de los procesos de muerte celular.

### 2.3. Mecanismos moleculares de la apoptosis

Los estudios llevados a cabo a lo largo de los últimos años ponen de manifiesto que existen dos vías principales de apoptosis: la vía **mitocondrial** o intrínseca y la vía de **receptor de muerte celular (DR)** o extrínseca. La vía DR está regulada por una enorme variedad de niveles de expresión de dichos receptores, los cuales son diferentes según el tipo de célula, mientras que la vía mitocondrial está considerada como la principal diana del sistema de señalización de supervivencia y su activación depende de diversos factores de

estrés celular, como la eliminación de factores de crecimiento, daños en el DNA, drogas tóxicas, estrés oxidativo, etc. (Blum y cols, 2001; Evan y Vousden, 2001).

Ambas vías están moduladas por un sistema de proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP), altamente conservado y que inhiben la activación de las conocidas como **caspasas** (Deveraux y Reed, 1999). Las caspasas son una familia de proteasas que constituyen el mecanismo central de la maquinaria de muerte de cualquier célula. Se trata de Cisteín-proteASAS que hidrolizan a su sustrato junto a un residuo de ácido ASPártico (de ahí su nombre).

Las caspasas se consideran los principales efectores intracelulares de la apoptosis. Responden al estímulo apoptótico mediante activación de una cascada intracelular proteolítica que ocasiona la activación o inactivación de diferentes sustratos celulares y provoca la muerte celular. La primera caspasa que se describió fue la caspasa-1 o ICE (Interleukin-1 $\beta$ -Converting Enzyme), homóloga en mamíferos de la proteína CED-3 de *Caenorhabditis elegans* (Thornberry y cols, 1992), producto del gen ced-3, imprescindible para que la muerte celular programada tenga lugar (Ellis y cols, 1991; Xue y Horvitz, 1995).

Las caspasas que participan en la apoptosis pueden dividirse en dos grandes grupos:

- iniciadoras (caspsas 1, 2, 4, 5, 8, 9, 10, 11 y 12), que se activan en respuesta a señales apoptóticas y activan a las caspasas efectoras.
- efectoras (3, 6, 7 y 14), que proteolizan sustratos celulares provocando la desorganización de la célula y los cambios morfológicos típicos de la apoptosis (Thornberry y Lazebnik, 1998).

Se conocen unos 40 sustratos celulares para las caspasas (Cryns y Yuan, 1998). Entre ellos se encuentran proteínas que inhiben la muerte celular, como las Bcl-2 (Cheng y cols, 1997), proteínas que participan en la reparación del DNA o en la organización de la cromatina (Kaufmann y cols, 1993; Casciola-Rosen y cols, 1996) y proteínas implicadas en la regulación del citoesqueleto (Rudel y Bokoch, 1997).

- *Vía apoptótica de receptor de muerte*

Depende de procaspasas que contienen un dominio “efector de muerte” que se activa por la unión de ligandos extracelulares que poseen un “dominio de muerte” en la superficie de la célula (**figura 14**). Los receptores de muerte (DR) pertenecen a la superfamilia de los receptores del Factor de Necrosis Tumoral (TNF). Se conocen como TRADD (receptores de TNF asociados a dominios de muerte) y poseen un dominio extracelular rico en residuos de cisteína y una secuencia citoplasmática intracelular conocida como “dominio de muerte” (DD). Al unirse el ligando tiene lugar una trimerización del receptor que provoca el reclutamiento del adaptador de proteínas (FADD, dominio de muerte asociado a Fadd), que induce la transformación de las procaspasas o caspasas iniciadoras (principalmente caspasa 8 y 10) en un complejo multimérico (DISC, complejo inductor de la señal de muerte). Estas son las que van a activar a las procaspasas efectoras, como la caspasa 3, que induce directamente la muerte celular. Por otra parte, la activación de la caspasa 8 promueve el envío de señales a la mitocondria (a través de la activación de proteínas pertenecientes a la familia Bcl-2: Bid, Bax/Bak) favoreciendo la liberación del citocromo c al citosol y relacionando las vías extrínsecas e intrínsecas de la apoptosis (Sainz y cols, 2003).

- *Vía apoptótica mitocondrial*

La apoptosis se induce a través de diversos estímulos tanto intra como extracelulares. Se trata de agentes que, directa o indirectamente actúan sobre la membrana mitocondrial, afectando a su estructura y, por tanto, a su función (Green y Kroemer, 1998; Loeffler y Kroemer, 2000). Cuando tiene lugar una despolarización de la misma, se anula la regulación de los canales iónicos o dependientes de voltaje contenidos en la membrana, de modo que se produce una liberación al citosol de diversas moléculas propias de la mitocondria. Entre ellas, el **citocromo c**, normalmente contenido en el espacio intermembrana mitocondrial, que es liberado al citosol (Desagher y Martinou, 2000). Una vez liberado, el citocromo c interacciona con el adaptador de proteínas CED-4/Apaf-1 en presencia de dATP (Zhou y cols, 1997; Cecconi, 1999), se oligomerizan y recluta al iniciador de la procaspasa 9, dando lugar a la formación del apoptosoma. La procaspasa 9 se activa a caspasa 9, actuando sobre otras caspasas efectoras como la procaspasa 3. Además del citocromo c, la mitocondria libera otro efector de la apoptosis, el **factor inductor de apoptosis** o AIF (Zamzami y cols, 1996; Susin y cols, 1999), que parece ser un elemento independiente de caspasas, responsable de la dispersión inicial del núcleo y que parece tener un papel esencial en la condensación de la cromatina y la fragmentación del DNA (Lorenzo y cols, 1999; Daugas y cols, 2000).

En la **figura 14** se muestran las vías intrínseca y extrínseca de la apoptosis y la interconexión entre ambas (Sainz y cols, 2003).

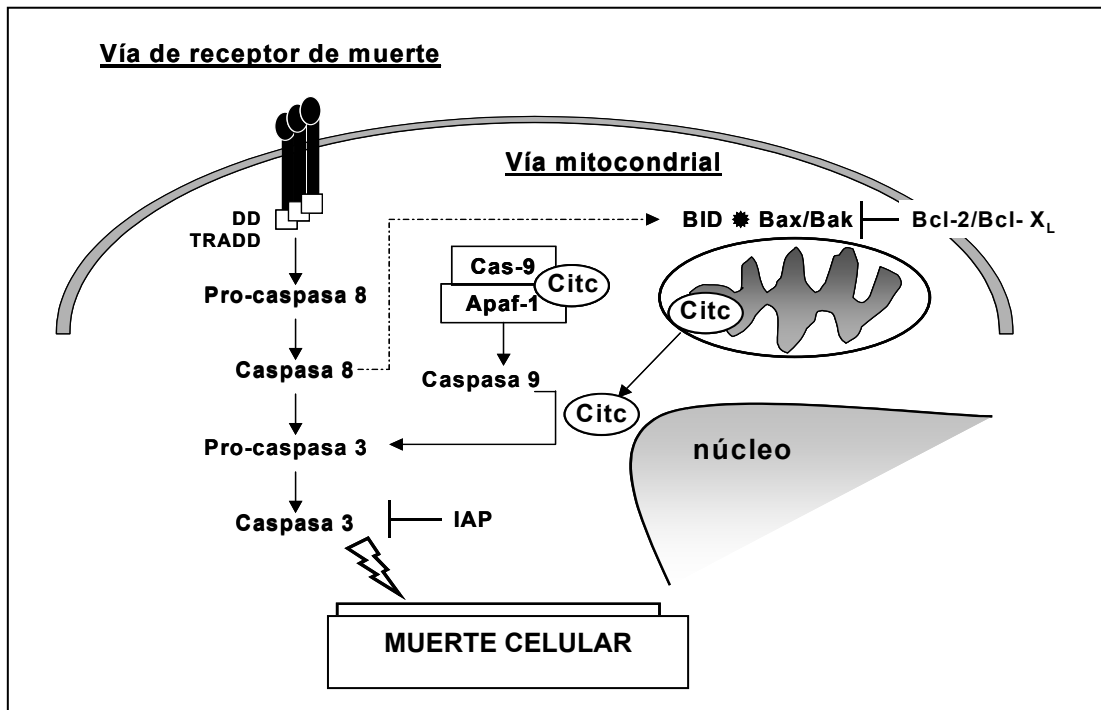


Figura 14. Esquema representativo de las vías extrínseca (de receptor de muerte) e intrínseca (mitocondrial) de muerte por apoptosis.

### 2.3.1. Reguladores intracelulares

Los principales reguladores intracelulares de la muerte celular programada son la familia de proteínas relacionadas con **Bcl-2**, proteína de mamíferos homóloga estructural y funcionalmente a la CED-9 de *C. elegans* (Hengartner y Horvitz, 1994). Todos los miembros de la familia Bcl-2 presentan al menos uno de los cuatro dominios conservados de homología a Bcl-2 (BH1-BH4), que median en la interacción con proteínas y son esenciales para su función (Reed, 1998; Blum y cols, 2001).

Algunos miembros de la familia inhiben la muerte celular (**Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>**) y otros la activan (**Bax, Bad, Bid**). Puesto que ambos tipos pueden formar heterodímeros, sus concentraciones relativas pueden regular el balance entre

muerte y supervivencia (Oltvai y cols, 1993). Actualmente se conocen hasta 15 miembros de esta familia en mamíferos (Dlamini y cols, 2004). Muchas de estas proteínas presentan un dominio c-terminal hidrofóbico que les permite anclarse a la cara citoplasmática de las membranas de la mitocondria, del retículo endoplásmico y de la membrana nuclear, de forma que pueden registrar daños en dichos orgánulos (revisado por Green y Kroemer, 1998).

El siguiente nivel de regulación se produce en la interacción entre Apaf-1 y las proteínas Bcl-2 y Bcl-X<sub>L</sub>, que impiden la activación del complejo Apaf-1/procaspasa 9 (Hu y cols, 1998), además de evitar directa o indirectamente la liberación del citocromo c de la mitocondria, lo que a su vez parece ser responsable de un cambio conformacional de Apaf-1 que le permite procesar a la procaspasa-9 (Zhou y cols, 1997; Li y cols, 1997; Green y Kroemer, 1998). El propio Bcl-2 es una proteína integral de la membrana de la mitocondria, y previene la apoptosis mediando sólo a través de algunas caspasas (Sutton, 1997).

### **2.3.2. Reguladores extracelulares.**

Las proteínas de la familia Bcl-2 y las procaspasas, a su vez, son reguladas por señales extracelulares de supervivencia o de muerte. Diversas familias de neurotrofinas y factores de crecimiento forman parte de las moléculas señalizadoras de supervivencia en el sistema nervioso. Estas moléculas siguen diversas vías de señalización intracelulares como:

- Vía de las fosfatidil-inositol-3-quinazas (PI3K), que activan a la proteína-quinasa B o Akt (Yao y Cooper, 1995; Dudek y cols, 1997; Franke y cols, 1997).
- Vía de las proteínas-quinazas activadas por mitógenos (MAPK) (Parrizas y cols, 1997; Núñez y del Peso, 1998).

La activación de Akt supone la fosforilación directa de Bad (Datta y cols, 1997) impidiendo que ejerza su función proapoptótica; sin embargo, si Bad permanece no fosforilado, se une a Bcl-X<sub>L</sub> (o a Bcl-2) e inhibe la apoptosis (Zha y cols, 1996).

Los DR, de los que ya hemos hablado, constituyen la otra vía extracelular de inducción de muerte. Los más caracterizados son los Fas y los TNF.

#### **2.4. Mitocondria y apoptosis. Papel del poro de transición mitocondrial.**

La apoptosis puede activarse por distintas vías de señalización, pero todas ellas parecen converger hacia un único evento: la **permeabilización de la membrana mitocondrial**. Este “punto de no retorno” en la muerte celular programada es un proceso complejo regulado por la propia composición de la membrana mitocondrial y por los efectos de la transducción señales implicados en los procesos apoptóticos.

La permeabilización de la membrana permite que diversas proteínas proapoptóticas contenidas en el espacio intermembrana de la mitocondria (**citocromo c, AIF, Smac/DIABLO, endonucleasa G, Omi/HtrA2**) sean liberadas al citosol donde ejercerán su función inductora de la muerte celular (Batandier y cols, 2004).

Existen dos mecanismos de permeabilización de la membrana de la mitocondria, que permiten la salida de estas sustancias. Uno de ellos implica a un canal formado en la membrana externa por proteínas proapoptóticas pertenecientes a la familia **Bcl-2**, mientras que el otro se debe a la apertura de un canal desde la membrana interna, el llamado **poro de transición mitocondrial (PTM)**.

### 2.4.1 Permeabilización de la membrana mitocondrial.

La permeabilización de la membrana mitocondrial está regulada por diversos agentes pro y antiapoptóticos, así como por distintos metabolitos (Debatin y cols, 2002). Las moléculas más importantes que regulan el proceso son:

- La sobreexpresión de las proteínas proapoptóticas **Bax** y **Bak** es suficiente para matar a las células. Bak se asocia normalmente a la membrana externa y, cuando se induce la apoptosis, cambia de conformación y queda insertada totalmente en ella; Bax (perteneciente a la familia de Bcl-2) es una proteína citosólica que en la apoptosis transloca a la mitocondria insertándose y oligomerizando en su membrana externa. La proteína Bax puede permeabilizar membranas liposomales y formar canales en bicapas lipídicas planas, cuyo tamaño puede ser suficiente para liberar a través de él compuestos como el citocromo c (Saito y cols, 2000). Esta permeabilización se puede inhibir por la ciclosporina A (Gogvadze y cols, 2001), lo cual sugiere que el canal abierto por Bax puede involucrar a la ciclofilina D (componente del poro de transición con gran afinidad por la ciclosporina A).
- Otros miembros de la familia Bcl-2, como el **Bad**, **Bim** y **Noxa**, inducen la apoptosis mediante la interacción con Bax o Bak, generando complejos estables con las moléculas antiapoptóticas Bcl-2/Bcl-X<sub>L</sub> (Adams y Cory, 2001). Por su parte, **t-Bid** es capaz de desestabilizar a la membrana mitocondrial, formando canales en la bicapa lipídica (Kudla y cols, 2000).
- Las proteínas antiapoptóticas **Bcl-2** y **Bcl-X<sub>L</sub>** están situadas en la membrana mitocondrial y actúan como una barrera frente a la permeabilización, bien neutralizando la función de las proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2, bien interactuando física o



funcionalmente con diversos componentes del poro de transición mitocondrial (Kroemer, 1997; Martinou y Green, 2001).

- Los lípidos de la membrana interna mitocondrial son distintos a los de cualquier otra membrana celular; es rica en colesterol libre y es la única membrana en eucariotas que contiene **cardiolipina**. La membrana interna posee una cantidad relativamente alta de fosfolípidos cargados negativamente, como la fosfatidilserina. Estas características determinan la inserción preferente de ciertas proteínas en las membranas mitocondriales. La composición de la membrana cambia durante la apoptosis; la cardiolipina se oxida (Matsko y cols, 2001) y la fosfolipasa A2 y la esfingomielinasa aumentan la concentración de dos agentes inductores de la permeabilización de la membrana, como son el ácido araquidónico y la ceramida, respectivamente (Birbes y cols, 2001; Williams y Gottlieb, 2002).

#### **2.4.2. Importancia de los componentes del PTM en la apoptosis.**

El PTM es un megacanal o canal de conductancia múltiple formado por un complejo multiproteico que conecta la membrana interna de la mitocondria con la membrana externa y el citosol. El complejo del PTM ayuda a mantener la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ , el pH, el potencial transmembrana ( $\Delta\Psi_m$ ) y el volumen de la mitocondria, actuando a distintos niveles de conductancia y permitiendo el paso selectivo de pequeños iones. El canal abierto tiene un diámetro de 2.0-2.6 nm y permite el paso de solutos con masa molecular de hasta 1.5 kD (Vyssokikh y Brdiczka, 2003).

El PTM está íntimamente relacionado con los procesos de muerte celular y se considera como un ejecutor central del destino de la célula tras su exposición a diversos agentes como el estrés oxidativo, la eliminación de factores de crecimiento o exposición a citocinas como el TNF- $\alpha$  (Gottlieb, 2000; Kronemer y Reed, 2000).

La apertura del PTM disipa el potencial de la membrana, desacoplando la mitocondria y causando un hinchamiento del orgánulo. Los principales componentes del poro implicados en la inducción de la apoptosis son:

- *Canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC).*

Es la proteína más abundante de la membrana externa de la mitocondria. Normalmente se responsabiliza del transporte de metabolitos entre el citosol y el espacio intermembrana. En presencia de ROS, este canal facilita la permeabilización de la membrana mitocondrial y permite la salida al citosol de citocromo c (Madesh y Hajnoczky, 2001), induciendo la apoptosis. Se cree, como ya hemos dicho antes, que la interacción entre Bax o Bak con este canal permite la formación de poros suficientemente grandes como para liberar al citocromo c (Shimizu y cols, 2000). Su actividad proapoptótica se ve frenada por las proteínas Bcl-2 o Bc-X<sub>L</sub>.

Se ha sugerido que un aumento en el potencial transmembrana afecta directamente a la membrana externa creando un gradiente de voltaje local que cierra el canal iónico (Vander-Heiden y cols, 2000).

- *Traslocador de nucleótidos de adenina (ANT).*

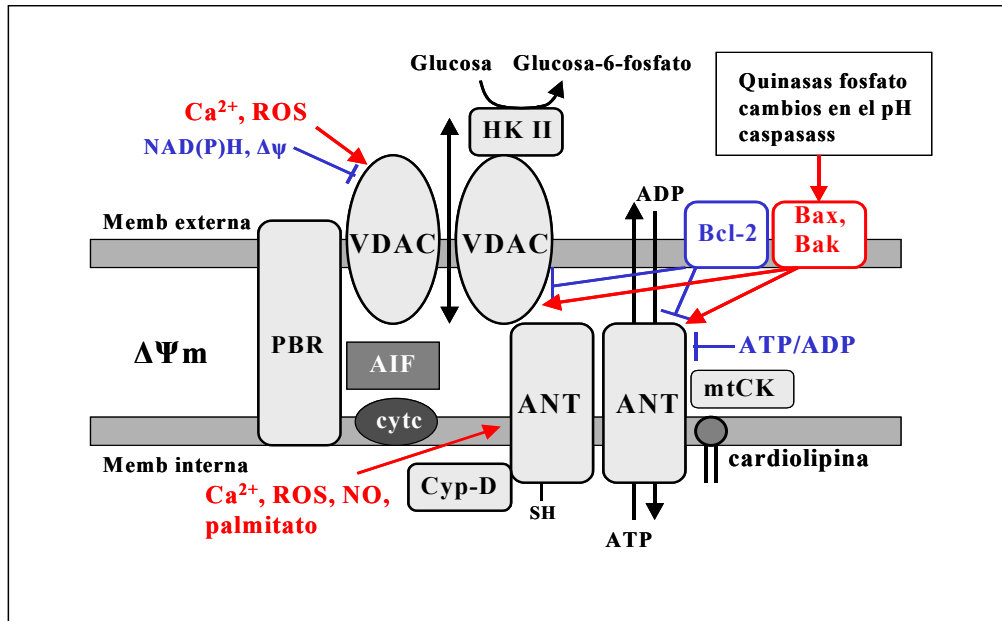
Es la proteína más abundante de la membrana interna de la mitocondria. Es el responsable del intercambio de ATP y ADP con el citosol. Junto con el VDAC y la ciclofilina D, constituyen la principal estructura del poro de transición (Marzo y cols, 1998; Brenner y cols, 2000; Crompton, 2000). El ANT actúa normalmente como un transportador específico de ATP y ADP. Bajo condiciones proapoptóticas, como aumento de la concentración de Ca<sup>2+</sup>, presencia de ácido atractilósido, palmitato o de NO, forma un poro no específico (Vieira y cols, 2002). La superficie de la membrana mitocondrial

interna es mucho mayor que la de la externa, así, cuando se produce la apertura de este poro, la membrana interna se permeabiliza causando un hinchamiento osmótico de la matriz y la consecuente ruptura de la membrana externa, de menor superficie. Este canal se bloquea por acción de Bcl-2 y, en ocasiones, por la ciclosporina A (Crompton, 2000).

- *Receptor periférico de benzodiazepinas (PBR).*

Su función más conocida es la síntesis de esteroides a partir de colesterol (Besman y cols, 1989; Papadopoulus y cols, 1997), aunque también desempeña un importante papel como regulador de los procesos oxidativos de la mitocondria, ya que está involucrado en la actividad de la succinato-citocromo c oxidorreductasa (Moreno-Sánchez y cols, 1991) y es conocido como un sensor del oxígeno celular que media en la respuesta de adaptación de la célula (Casellas y cols, 2002). Además, se ha demostrado que el PBR ejerce un papel protector frente al estrés oxidativo en presencia de ROS (Stoebner y cols, 1999) y que su expresión aumenta en situaciones patológicas que cursan con elevada producción de ROS, sobre todo en el sistema nervioso central (Casellas y cols, 2002). Antagonistas del PBR inducen un colapso del  $\Delta\Psi_m$  y un hinchamiento de la mitocondria, que llevan a la célula a la muerte por apoptosis (Fennel y cols, 2001), mientras que los agonistas del PBR ejercen un efecto antiapoptótico (Bono y cols, 1999).

En la **figura 15** se representan los principales componentes del PTM, con sus efectores (activadores e inhibidores) más importantes:

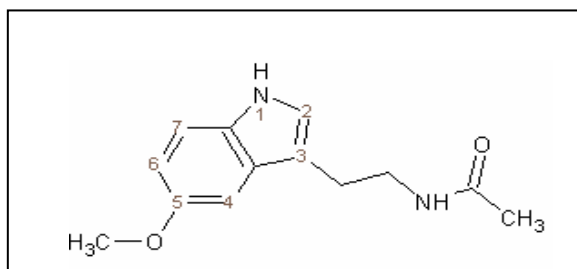


**Figura 15.** Esquema de la estructura del PTM con algunos de sus efectores más importantes. En rojo se marcan los inductores de la apertura del PTM y en azul los inhibidores.

La activación del megacanal supone la formación inicial de un complejo ANT-VDAC, en el que VDAC aparece en un estado de baja conductividad y selectivo para los cationes y ANT ha perdido contacto con la creatina quinasa mitocondrial (mtCK). La interacción entre estos dos componentes suponen cambios estructurales de la membrana externa, exponiendo lugares diana para proteínas Bax/Bak que compiten y desplazan a la hexoquinasa II (HkII) de su sitio de unión a VDAC (Pastorino y cols, 2002). En las zonas de contacto de ANT-VDAC entre las membranas internas y externas se concentran pequeñas cantidades de citocromo c que, tras la interacción de moléculas Bax, es liberado junto con el factor AIF (Pastorino y cols, 1999; Capano y Crompton, 2002). En un segundo paso, el citocromo c que se localiza en grandes cantidades en la superficie de la membrana de las crestas mitocondriales se libera tras la apertura del PTM y de la disrupción de la membrana interna (Halestrap y cols, 2002). La presencia de ROS en la mitocondria permite la ruptura de puentes disulfuro que mantenían los canales ANT cerrados e induce cambios de conformación en las estructuras que posibilitan la formación del megacanal (Debatin y cols, 2002).

### 3. MELATONINA

La melatonina o N-acetil-5-metoxitriptamina, es una indolamina, que fue aislada por primera vez por Lerner (Lerner, 1958) a partir de extractos de glándula pineal de oveja. Un año más tarde, en 1959, este mismo grupo dilucidó su estructura química (Lerner y cols, 1959).



**Figura 16.** Estructura química de la molécula de melatonina.

Desde un punto de vista químico, es un cristal orgánico, de color blanco, con un punto de fusión entre 116 y 118°C, difícilmente soluble en agua y fácilmente soluble en etanol (Szmuskowicz y Heinzelman, 1960).

La melatonina es un compuesto filogenéticamente muy estable, altamente conservado a lo largo del tiempo y en distintas especies, desde unicelulares (Tilden y cols, 1997; Macías y cols, 1999) hasta organismos vertebrados (León y cols, 2004). En mamíferos, la melatonina se sintetiza en la glándula pineal a partir de triptófano y está regulada por el fotoperiodo y por hormonas. Existe un ritmo circadiano en los niveles de melatonina en suero de mamíferos, relacionada tanto con su producción como con su metabolismo (Matthews y cols, 1982). Su concentración en suero es del orden de picomolar/nanomolar (Reiter, 1991a). Actualmente se sabe que la mayoría de los órganos y tejidos del organismo sintetizan melatonina por la misma vía metabólica que la pineal (Stefulj y cols, 2001), aunque los niveles tisulares de melatonina son 2-3 órdenes de magnitud mayores que los del plasma (Reiter y Tan, 2003b). La melatonina se concentra específicamente en determinadas organelas celulares, como el núcleo y la mitocondria (Menéndez-Peláez y Reiter, 1993;

Acuña-Castroviejo y cols, 2003). Además, se han identificado y caracterizado receptores nucleares para la melatonina en órganos periféricos (Acuña-Castroviejo y cols, 1993; Acuña-Castroviejo y cols, 1994; Becker-André y cols, 1994; Carlberg y cols, 1994; Giguere y cols, 1994).

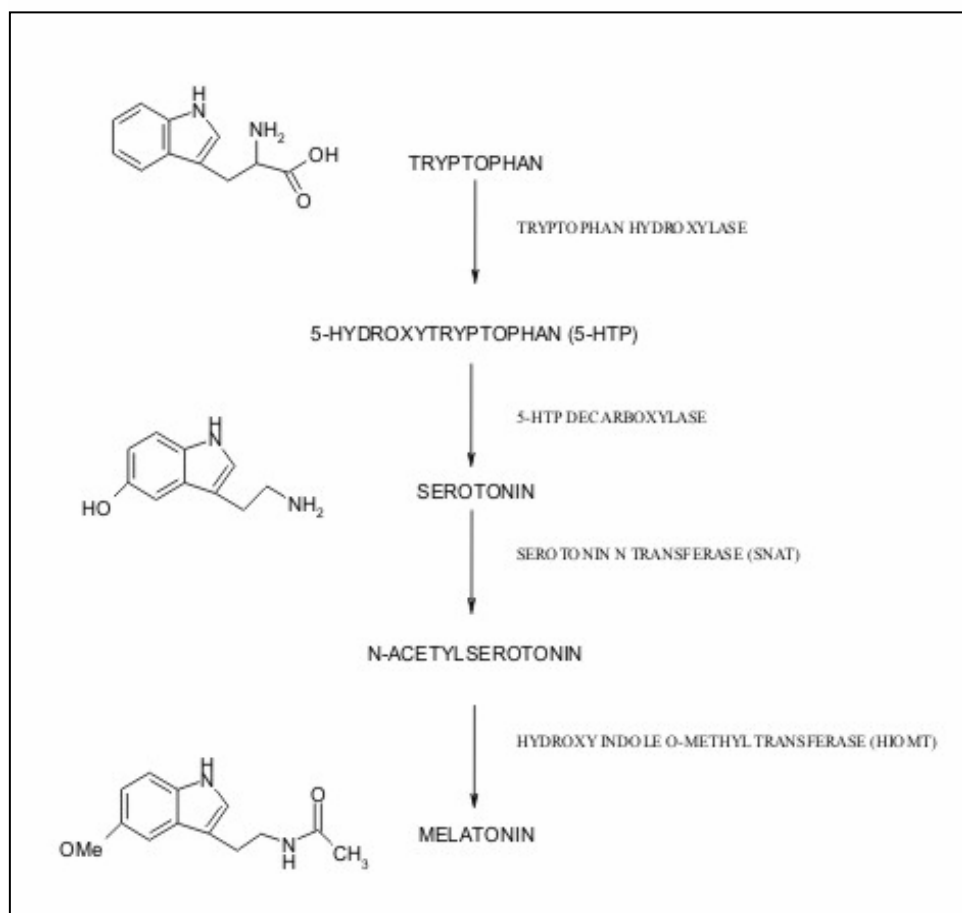
Aunque inicialmente se encuadró a la melatonina exclusivamente en la fisiología circadiana y reproductora, estudios posteriores permitieron relacionarla con aspectos de la fisiología intracelular independientes de sus acciones hormonales. Así, se demostró que la melatonina es un potente depurador de radicales libres (Tan y cols, 1993).

Asimismo se demostró la capacidad de la melatonina como modulador del calcio intracelular mediante interacciones con diversas proteínas citosólicas como la proteína quinasa C (Benítez-King y Antón-Tay, 1996), la calmodulina (Huerto-Delgadillo y cols, 1994; Pozo y cols, 1994; León y cols, 2000), y la calreticulina (Macías y cols, 2003).

En cuanto a su acción sobre el SNC, la melatonina regula tanto a los neurotransmisores y como a sus receptores (Acuña-Castroviejo y cols, 1986a; Acuña-Castroviejo y cols, 1986b; Khaldy y cols, 2002; Escames y cols, 2004). La melatonina regula la neurotransmisión GABAérgica por mecanismos dependientes de receptores opioides (Gomar y cols, 1993) y aumenta los niveles de GABA (Rosenstein y Cardinali, 1990). También actúa directamente sobre aminoácidos excitadores como el glutamato (Pellegrini-Giampietro y cols, 1990) e inhibe la activación de la nNOS a través de su interacción con el complejo calcio-calmodulina (León y cols, 1998a; León y cols 2000). Además, la melatonina regula la actividad iónica de la membrana neuronal y ejerce un efecto hiperpolarizante regulando la actividad y función de la bomba de sodio. Por todo ello, la melatonina ejerce un efecto depresor de la actividad eléctrica cerebral, lo que le confiere, entre otras, propiedades anticonvulsivantes, sedantes e hipnóticas (Acuña-Castroviejo y cols, 1992).

### 3.1. Metabolismo de la melatonina. Biosíntesis y degradación.

La glándula pineal fue el primer lugar en el que se identificó la síntesis de melatonina. Dicha síntesis se realiza a partir de triptófano, que entra en el pinealocito por transporte activo en contra de gradiente de concentración (Sugden, 1979). El triptófano es hidroxilado y descarboxilado en dos reacciones sucesivas para dar lugar a serotonina. La serotonina capta un grupo acetilo de la N-acetiltransferasa o NAT (enzima limitante del proceso de síntesis de la melatonina) y finalmente, la hidroxindol-*O*-metiltransferasa o HIOMT, origina la molécula de melatonina (Weissbach y cols, 1960; Axelrod, 1961; Axelrod and Weissvach, 1974) (**Figura 17**).



**Figura 17.** Síntesis de melatonina a partir de triptófano en la glándula pineal.

La melatonina pineal pasa al líquido cefalorraquídeo y a la sangre, donde sigue un ritmo circadiano con una acrofase hacia las 2-4 horas de la madrugada en la especie humana. En plasma, los niveles de melatonina alcanzan por la noche un máximo de 0.5-1.0 nM, mientras que los niveles diurnos son de 0.025-0.050 nM.

Recientemente, se ha demostrado la expresión de los genes que codifican los enzimas clave de la síntesis de melatonina (NAT e HIOMT) en prácticamente todos los tejidos del organismo (Stefulj y cols, 2001), lo que sugiere que cada tejido puede producir la melatonina que necesita en cada momento, sin depender de la melatonina circulante. De hecho, en mamíferos la melatonina se sintetiza en una gran variedad de tejidos (retina, glándula harderiana, mucosa intestinal, cerebelo, epitelio respiratorio, hígado, riñón, timo, tiroides, páncreas, ovarios, cuerpo carotídeo, placenta y endometrio) y en células no endocrinas como células NK (*natural killer*), eosinófilas, plaquetas y endoteliales (Kavetnoy, 2002). Esta melatonina extrapineal se produce en cantidades mucho mayores que la pineal, alcanzando concentraciones del orden micromolar (Reiter y Tan, 2003a; Reiter y cols, 2003b).

La vida media de la melatonina en suero oscila entre 20-40 minutos (Ilnerova y cols, 1978; Vakkuri y cols, 1985). En el hígado, la melatonina sufre hidroxilación a 6-hidroximelatonina, la cual después se conjuga con el ion sulfato y con el ácido glucurónico. De modo que los principales metabolitos de la melatonina en orina y heces son el sulfato y el glucuronato de 6-hidroximelatonina (Kopin y cols, 1961).

Fundamentalmente en la retina, aunque también en el hígado, la melatonina puede sufrir descetilación y desaminación hasta convertirse en ácido 5-metoxiindolacético y 5-metoxitriptofol (Cahik y Besharse, 1989). Otra importante vía de degradación de la melatonina tiene lugar en el cerebro,



plexo coroideo y pineal. En este caso, la melatonina se transforma primero en N<sup>1</sup>-acetil-N<sup>2</sup>-formil-5-metoxikinurenamina (aFoMK) y después en N-acetil-5-metoxikinurenamina (aMK), siendo esta una de las vías más importantes de metabolización de la melatonina en cerebro de mamíferos (Hirata y cols, 1974; Fujiwara y cols, 1978) (figura 18). El aMK también se excreta por la orina y su origen puede no ser exclusivamente cerebral. De hecho, la melatonina puede transformarse de forma no enzimática en aMK (figura 19), cuando depura en primer lugar un radical hidroxilo (OH·) y en segundo lugar un radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>) (Hirata y cols, 1974; Fujiwara y cols, 1978).

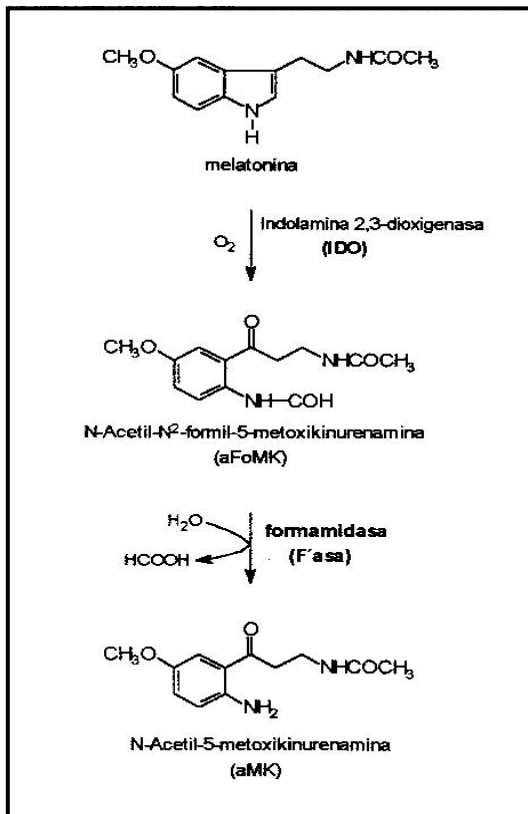


Figura 18. Ruta enzimática de degradación  
Degradación de la melatonina

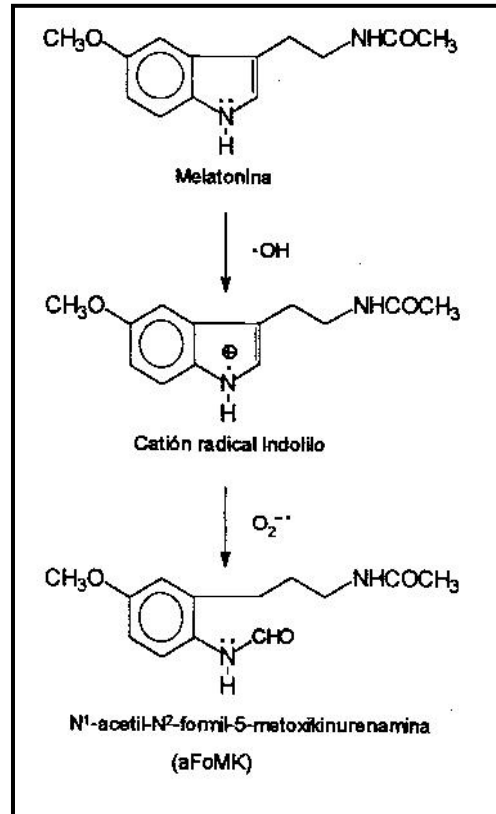


Figura 19. Ruta oxidativa de degradación de la melatonina

### 3.2. Melatonina como antioxidante.

La melatonina tiene la capacidad de eliminar y depurar radicales libres (mediante un mecanismo independiente de receptor), así como de aumentar la expresión y la actividad de algunos de los enzimas antioxidantes de la célula (Reiter, 1998; Antolin y cols, 1996; Pablos y cols, 1998; Reiter y cols, 2000; Kilanczyk y Bryszewska, 2003; Rodríguez y cols, 2004).

Las propiedades antioxidantes de la melatonina se describieron inicialmente por Iltis y colaboradores en 1991 (Iltis y cols, 1991). La melatonina actúa como depurador de radicales libres, sobre todo del peligroso radical  $\text{OH}\cdot$  (Tan y cols, 1993; Khaldy y cols, 2000; Reiter y Tan, 2002), de  $\text{ROO}\cdot$  (Pieri y cols, 1994) y oxígeno singlete (Cagnoli y cols, 1995). La melatonina endógena es relevante en cuanto a su participación en la capacidad antioxidante del organismo, ya que su ubicuidad le confiere la propiedad de poder actuar allí donde se producen los radicales libres y donde éstos pueden ser más dañinos, como en la mitocondria, en el núcleo (protegiendo al DNA) y en las membranas (actuando directamente sobre los lípidos de membrana y salvaguardando la fluidez de la misma) (Benot y cols, 1998). La melatonina depura también radicales de nitrógeno, principalmente  $\text{NO}$  y  $\text{ONOO}\cdot$  (Reiter y cols, 2003a). El efecto de la melatonina es doble: por un lado, actúa como depurador de radicales libres eliminándolos directamente por cesión electrónica; por otro lado, también se ha demostrado estimula la expresión y la actividad de enzimas antioxidantes como la glutathion peroxidasa, glutathion reductasa, catalasa y posiblemente superóxido dismutasa, e inhibe la expresión y actividad de enzimas prooxidantes como la NOS (Antolin y cols, 1996; Acuña-Castroviejo y cols, 2002; Escames y cols, 2003; Acuña-Castroviejo y cols, 2005).

El mecanismo por el cual la melatonina neutraliza al radical  $\text{OH}\cdot$  consiste en que la indolamina cede un electrón al radical, transformándose en el denominado catión radical indolilo (Hardeland y cols, 1993; Poeggeler y cols, 1994). Éste interacciona entonces con un anión radical  $\text{O}_2\cdot^-$ , precursor del  $\text{OH}\cdot$ , para generar aFoMK, que se elimina por la orina (**figura 20**). En este caso, la melatonina elimina en realidad dos radicales libres a la vez.

Se han encontrado otras vías de metabolización de la melatonina al depurar dos radicales  $\text{OH}\cdot$  (**figura 20**): la melatonina se transforma en 3-hidroximelatonina cíclica (3-OHaMT), que se elimina por la orina y constituye un índice muy fiable para la medición del estrés oxidativo en el organismo (Tan y cols, 1998). Se ha demostrado que la melatonina depura también el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , dando lugar a aFoMK, que se transforma en aMK por acción de una formamidasa (Tan y cols, 2000; 2003). Puesto que aFoMK también puede actuar como depurador de radicales libres, el efecto de la melatonina da lugar a una cascada de reacciones protectoras (López-Burillo y cols, 2003).

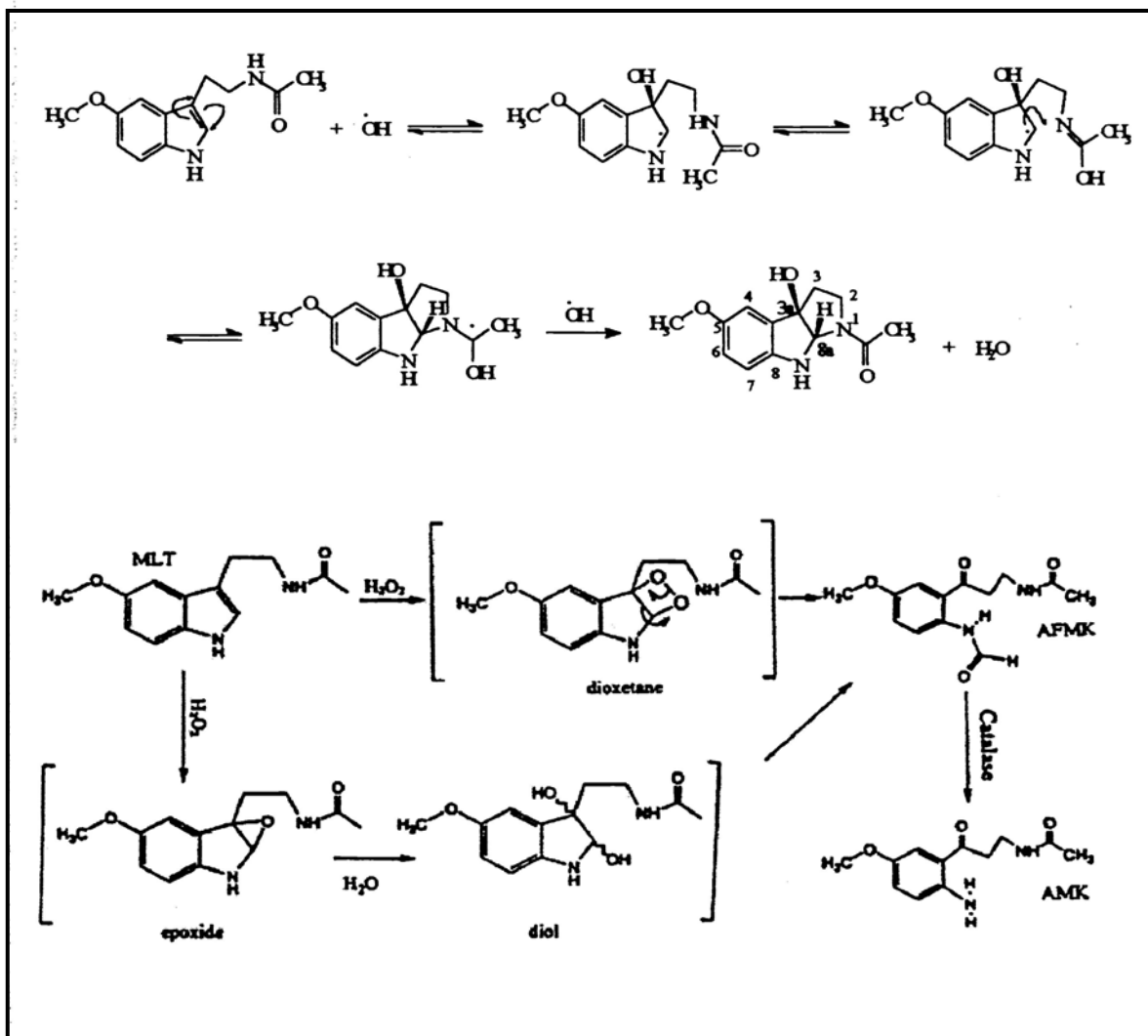


Figura 20. Rutas de reacción de la melatonina propuestas para la degradación de radicales HO· (arriba) y de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (abajo).

La melatonina ejerce también un efecto **antioxidante indirecto** debido a su capacidad para regular la producción de NO a través de su interacción con enzimas que lo sintetizan (León y cols, 2004). La melatonina inhibe la actividad de la NOS neuronal (nNOS) en cerebelo (Pozo y cols, 1994), hipotálamo (Bettahi y cols, 1998) y estriado (León y cols, 1998), mediante su unión al complejo calcio-calmodulina (León y cols, 2000). Derivados de la melatonina, como el aMK también inhiben la actividad de la nNOS en estriado de rata de forma dosis-dependiente, sugiriendo que el efecto de la melatonina sobre este enzima se realiza, al menos en parte, a través de sus

metabolitos (León y cols, 1998, 2000). Otros estudios revelan que la melatonina inhibe la expresión y actividad de la NOS inducible (iNOS) y la mitocondrial (mtNOS) (Crespo y cols, 1999; Escames y cols, 2003).

El mecanismo de acción de la melatonina como depurador de radicales libres no requiere la presencia de ningún receptor, ya que depende exclusivamente de la estructura química de la hormona y de su gran capacidad para difundir a través de todo tipo de membranas. Sin embargo, su efecto antioxidante sí se realiza a través de efectos genómicos que podrían estar ligados a su receptor nuclear (Acuña-Castroviejo y cols, 1994; Antolín y cols, 1996; León y cols, 2004).

### **3.3. Melatonina y mitocondria.**

La disfunción mitocondrial, con una caída en la producción de ATP, puede estar asociada con un aumento de la producción de ROS. De hecho, la mitocondria está continuamente expuesta al daño oxidativo, por ser la mayor productora de ROS durante el proceso de transporte electrónico.

La melatonina, además de poder atravesar fácilmente la membrana mitocondrial, se acumula a elevadas concentraciones en dicha organela (Martín y cols, 2000a; Acuña-Castroviejo y cols, 2002; Acuña-Castroviejo y cols, 2003; León y cols, 2004), estabiliza su membrana interna (García y cols, 1999) y puede mejorar la actividad de la CTE (Acuña-Castroviejo y cols, 2001, 2005).

Existen estudios que avalan la influencia de la melatonina en el mantenimiento de la homeostasis mitocondrial; en condiciones normales, la melatonina es capaz de aumentar de forma dosis-dependiente la actividad de los complejos I y IV de la CTE (Martín y cols, 2000b) y de prevenir la reducción

de la misma tras el daño ocasionado por algún agente inductor de estrés oxidativo (Martín y cols, 2000b, 2002). Su capacidad para regular la actividad de estos complejos puede no deberse sólo al poder antioxidante de la melatonina, ya que teniendo en cuenta su potencial de óxido-reducción (0.74V) (Tan y cols, 2000), la melatonina podría interactuar con los complejos de la CTE donando y aceptando electrones, incrementando así el flujo electrónico, cosa que no sucede con otros antioxidantes (Martín y cols, 2002).

Puesto que la mitocondria es la principal fuente de radicales libres de la célula (Turrens, 2003), también debe disponer de mecanismos antioxidantes propios que le permitan mantener su equilibrio redox; el principal es el llevado a cabo por el ciclo del glutatión (GSH) el cual destoxifica peróxidos con ayuda de NADP(H) y a través de la glutatión peroxidasa, transformándose en glutatión oxidado (GSSG), que vuelve a reducirse por acción de la glutatión reductasa. Este ciclo ha de funcionar permanentemente con fin de asegurar una reserva de GSH en la mitocondria. La melatonina no sólo ayuda a mantener este almacén, detoxificando por sí misma radicales libres, sino que se ha demostrado que estimula la actividad de los enzimas participantes en el ciclo del glutatión, aumentando su reserva y disminuyendo los niveles de GSSG (Martín y cols, 2000a). Estos resultados concuerdan con otros que muestran que la melatonina mantiene la homeostasis del GSH en cerebro (Floreani y cols, 1997) y en la mucosa gástrica (Othman y cols, 2001), donde también podría estar implicada en el restablecimiento de las actividades de la Mn y CuZn superóxido dismutasa en ratas tratadas con indometacina (León y cols, 2004).

Como consecuencia de su acción sobre la CTE, la melatonina es capaz de aumentar la producción ATP (Martín y cols, 2002) y acelerar el metabolismo en mitocondrias aisladas de oocitos de rana (de Atenor y cols, 1994); este efecto puede deberse a que la melatonina inhibe el estado 3 de la respiración mientras que el estado 4 no se ve afectado. La habilidad de la melatonina para reducir el consumo de oxígeno en mitocondrias de hígado puede proteger

a la organela del daño de un excesivo estrés oxidativo (Reyes-Toso y cols, 2003).

Recientemente se ha intentado comprobar si la melatonina puede proteger al mtDNA de su oxidación por los radicales libres que fisiológicamente se “escapan” de CTE; así se ha mostrado, *in vivo* e *in vitro*, que la exposición a cianuro y a ácido kaínico inducen peroxidación lipídica y daño en el mtDNA. Este efecto desaparece cuando las mitocondrias son tratadas con melatonina (Yamamoto y Mohanan, 2002,2003).

La presencia de ROS y RNS se relaciona con el inicio de una serie de daños oxidativos irreversibles para la mitocondria que resultan en una inhibición de la síntesis de proteínas, peroxidación de la membrana lipídica y mutaciones y deleciones en el mtDNA (Halliwell y Gutteridge, 1989). Una disfunción así en la mitocondria conduce a una despolarización en su membrana, un descenso en la producción de ATP y el inicio de los procesos mitocondriales proapoptóticos, como apertura del PTM, salida de proteínas del espacio intermembrana al citosol y la subsiguiente activación de las caspasas que fragmentarán el DNA nuclear (Halestrap y cols, 2000; Zamzami y Kroemer, 2001; Kim y Lemasters, 2003). La melatonina, al reducir la peroxidación lipídica de las membranas y proteger del daño oxidativo al mtDNA y nuclear, desempeña un papel antiapoptótico en la muerte celular mediada por la mitocondria (León y cols, 2004). De hecho, el efecto antiapoptótico de la melatonina se ha descrito en muchos sistemas y en diferentes situaciones (Sainz y cols, 2003).

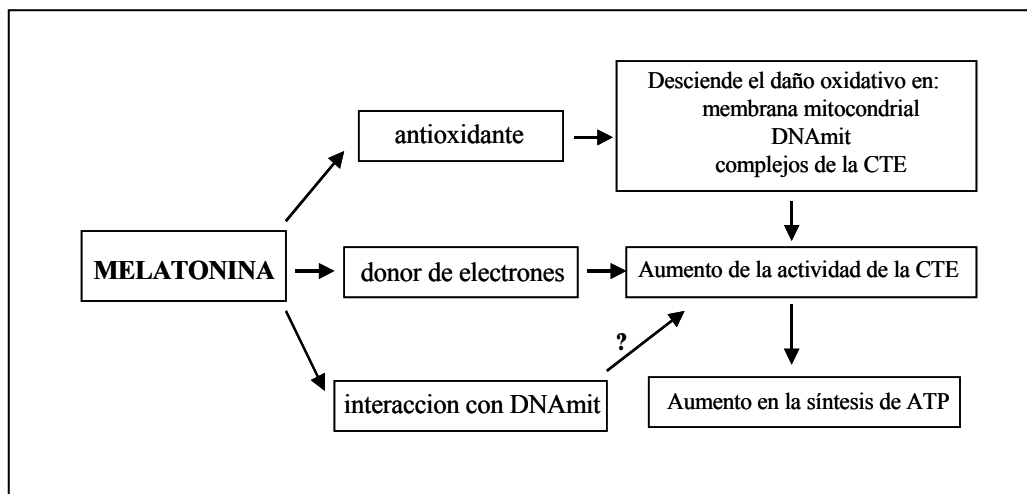


Figura 21. Diferentes efectos de la melatonina en la mitocondria.

### 3.4. Melatonina y Enfermedad de Parkinson.

La producción endógena de melatonina disminuye con la edad en todas las especies donde se ha estudiado (Poeggeler, 1993; Reiter, 1995). En el caso de los humanos, los niveles nocturnos de melatonina en adultos de edades comprendidas entre los 70 y 80 años, son casi nulos (Sack y cols, 1986). Estos y otros datos han conducido a la teoría de que el descenso de melatonina con la edad, en parte debido a sus propiedades antioxidantes, 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).

Con el objetivo de determinar si la melatonina tiene un papel beneficioso en enfermedades como la EP, que cursan con un elevado índice de estrés oxidativo (con peroxidación lipídica, descenso de GSH, inhibición del complejo I, daños 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 melatonina desempeña un papel protector (Acuña-Castroviejo y cols, 1997; Mayo y cols 1998, 1999; Khaldy y cols, 2000, 2003; Absi y cols, 2000; Ortiz y cols, 2001; Antolín y cols, 2002).



La melatonina aumenta el número de neuronas tirosina-hidroxilasa positivas (enzima sintetizadora de dopamina) y disminuye la peroxidación lipídica en el estriado de ratones tras ser inyectados con MPTP (Acuña-Castroviejo y cols, 1997). Sin embargo, la indolamina no recupera la actividad de dicho enzima una vez que se ha perdido (Khaldy y cols, 2003). La melatonina, aunque no el deprenil, previene la inhibición del complejo I en dichos ratones (Khaldy y cols, 2003) y la autooxidación de la dopamina, *in vitro* (Khaldy y cols, 2000). También presenta un efecto sinérgico con el deprenil para recuperar los niveles de dopamina perdidos tras la exposición al MPTP, así como la actividad locomotora de los ratones tratados (Khaldy y cols, 2003). Estos resultados sugieren una disociación entre la inhibición del complejo I y el descenso en los niveles de dopamina en este modelo de EP y dan pie a la idea de la combinación del efecto antioxidante de la melatonina junto con el efecto específico en la recaptación de dopamina del deprenil, como una buena estrategia para el tratamiento de la enfermedad (Khaldy y cols, 2003). Además, la melatonina es responsable del mantenimiento del ritmo circadiano de la DA, lo que indica su participación en la función normal de la vía nigroestriatal (Khaldy y cols, 2002).

En experimentos con mitocondrias aisladas de hígado y con sinaptosomas de estriado tratados con MPP<sup>+</sup> (metabolito activo del MPTP), la melatonina consiguió recuperar la actividad del complejo I (Absi y cols, 2000). Además, la melatonina inhibió la fragmentación de ADN y la apoptosis asociada en cerebro de ratón con un tratamiento agudo (Ortiz cols, 2001) o crónico (Ortiz y cols, 2001; Antolín y cols, 2002) de MPTP.

En modelos de EP *in vitro*, con células PC12 tratadas con el tóxico 6-hidroxidopamina (6-OHDA), la melatonina inhibe la apoptosis y los cambios estructurales inducidos por el tóxico (Mayo y cols, 1998). La administración de melatonina corrige el hemi-parkinsonismo inducido en ratas a las que se les ha inyectado 6-OHDA en la sustancia negra, mejorando también los trastornos motores asociados (Dabbeni-Sala y cols, 2001).

El NO está implicado en la toxicidad de anfetaminas y meta-anfetaminas, dos drogas que inducen parkinsonismo originando la formación de radicales libres, daño en la mitocondria y descenso en la síntesis de ATP (Virmani cols, 2002, 2003). La melatonina restablece los parámetros mitocondriales y reduce la producción de ONOO<sup>-</sup>, tanto en células PC12 como en estriado de ratón adulto.



# **OBJETIVOS**



Una vez revisadas las causas más probables por las que se desencadena la muerte de las neuronas dopaminérgicas en la EP y, dados los antecedentes beneficiosos de la melatonina frente al estrés oxidativo y los procesos neurodegenerativos, cabe esperar un papel neuroprotector de la indolamina en el desarrollo y progresión de la enfermedad.

El principal objetivo de este trabajo se centra en el estudio de la relación entre el daño oxidativo en la mitocondria y la muerte celular por apoptosis en la EP. Para ello estudiaremos en detalle:

1. Efecto de la rotenona como neurotóxico inductor de estrés oxidativo, daño mitocondrial y apoptosis en la línea celular dopaminérgica PC12, como modelo experimental de enfermedad de Parkinson.
2. Relación entre el daño mitocondrial y la apertura del poro PTM como etapa desencadenante de la apoptosis.
3. Efecto protector de la melatonina frente al daño mitocondrial ocasionado por la rotenona.
4. Efecto de la melatonina para inhibir la apertura del poro de transición mitocondrial y, consecuentemente la muerte celular por apoptosis y su estudio comparativo con la ciclosporina A.



# **MATERIAL Y MÉTODOS**





## 1. CULTIVO Y MANTENIMIENTO DE LA LÍNEA CELULAR PC12.

Todos los experimentos se realizan con células de la línea PC12 obtenidas del banco celular del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada (España).

Los cultivos se mantienen en medio RPMI-1640 complementado con un 10% de suero de caballo, 5% de suero bovino fetal (ambos sueros inactivados por choque térmico), 2 mM de L-glutamina, 100 µg/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin y 25 µg/ml de anfotericina (Green y Tischler, 1976). El cultivo se mantiene bajo condiciones de temperatura de 37° C, 5% CO<sub>2</sub> y 90% de humedad relativa. Para asegurar el cultivo, se realizan pases (aproximadamente cada 5 días) centrifugando las células (200 g durante 10 minutos a temperatura ambiente), desechando el sobrenadante, resuspendiendo las células en medio fresco y depositándolas en nuevos frascos de cultivo. En cada pase, el factor de dilución empleado es entre 1:2 y 1:4, manteniendo el cultivo en una densidad aproximada de 5x10<sup>5</sup> células/ml.

### *Diferenciación de células PC12*

Para realizar los experimentos se emplean células PC12 diferenciadas, con morfología neuronal. Para ello, se toman células del cultivo en suspensión, se cuentan en una cámara de Neubauer (por exclusión, con azul tripán) y se depositan en placas o frascos de cultivo previamente colagenizados (0.1 mg/ml) en una densidad de 2x10<sup>5</sup> células/cm<sup>2</sup>. Para su diferenciación, las células se cultivan en medio RPMI-1640, complementado con un 1% de suero de caballo, 2 mM de L-glutamina, 100 µg/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin, 25 µg/ml de anfotericina y 50 ng/ml de factor de crecimiento nervioso (NGF-7S). El medio de cultivo se reemplaza cada dos días por medio fresco con esta composición hasta la total diferenciación de las células (entre 12-14 días).

### *Preparación de las placas y frascos de cultivo con colágeno*

Para colagenizar las placas y frascos de cultivo se emplea colágeno de cola de rata comercial (SIGMA). El colágeno se prepara disolviéndolo por agitación en ácido acético 0.1 M previamente esterilizado por filtración (0.22  $\mu\text{m}$ ). Una vez disuelto, se diluye hasta una concentración de 0.1 mg/ml y se conserva a 4° C hasta su utilización.

#### *Procedimiento:*

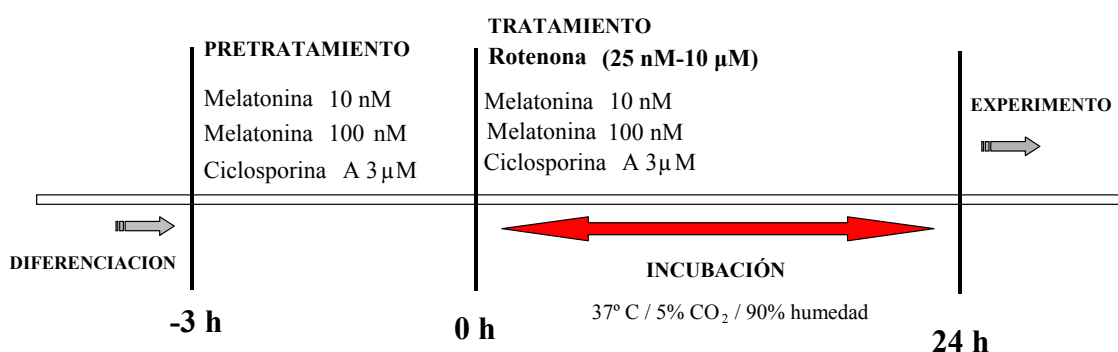
- Cubrir las placas y los frascos de cultivo con la disolución de colágeno 0.1 mg/ml a una concentración de 5  $\mu\text{g}$  de colágeno por  $\text{cm}^2$  de superficie de placa.
- Mantener los frascos durante varias horas en una campana de flujo laminar para que se adhiera el colágeno.
- Eliminar la solución sobrante y lavar la superficie colagenizada con disolución amortiguadora salina estéril (PBS, pH 7.4).
- Esterilizar los frascos colagenizados mediante exposición a la luz UV durante al menos 3 horas en la campana de flujo laminar.

## 2. DISEÑO EXPERIMENTAL.

En todos los experimentos, salvo que se indique lo contrario, se establecen los siguientes grupos experimentales:

- Grupo control
- Grupo vehículo, en el que se añade al cultivo el volumen correspondiente de vehículo en el que se disuelven las drogas (este grupo pasa a formar parte del control, tras comprobar que el vehículo no ejerce ningún efecto sobre el cultivo en los parámetros medidos)
- Grupos tratados con melatonina (10 nM y 100 nM)
- Grupo tratado con ciclosporina A (3  $\mu$ M)
- Grupo tratado con rotenona (25 nM-10  $\mu$ M)
- Grupos tratados con melatonina (10 nM y 100 nM) e incubados en presencia de rotenona (500 nM)
- Grupo tratado con ciclosporina A (3  $\mu$ M) e incubado en presencia de rotenona (500 nM).

El procedimiento de tratamientos en los distintos grupos sigue el siguiente esquema:



Según el caso correspondiente, se realiza un pretratamiento de 3 h de 10 nM de melatonina, 100 nM de melatonina o 3  $\mu$ M de ciclosporina A. Pasado este tiempo se añade la rotenona a una concentración de 500 nM. Tras 24 h de incubación en las condiciones descritas, se prepara el cultivo para cada experimento concreto.

### 3. ENSAYO DE LA VIABILIDAD CELULAR.

Para determinar la viabilidad del cultivo a distintas concentraciones de rotenona, se emplea el método de la sulforrodamina-B.

La sulforrodamina-B es un fluoróforo soluble en agua que se une a los aminoácidos básicos de las proteínas celulares formando un aducto que emite fluorescencia al ser excitado a una determinada longitud de onda; así, las medidas fluorimétricas del colorante unido a las proteínas, muestra una estimación sobre la masa total de proteínas, que se relaciona con el número de células presentes.

#### *Preparación de muestras*

Sembrar  $2 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> en una placa de 96 pocillos. Diferenciar y tratar con diferentes dosis de rotenona: 0, 25, 100, 250, 500, 1000 y 10000 nM durante 24 h.

Para realizar el ensayo de viabilidad se procede de la siguiente manera:

- Eliminar con cuidado el medio de cultivo, sin alterar la monocapa, y lavar cada pocillo dos veces con disolución salina (PBS) estéril.
- Añadir etanol absoluto a cada pocillo y mantener durante 30 minutos a temperatura ambiente para fijar las células.
-

- Una vez fijadas, cubrir las células con sulforrodamina-B a 0.4% en etanol absoluto e incubar durante 15 minutos.
- Lavar las células con ácido acético al 1% 10 veces y dos más con Tris base 10 nM (pH 10.4) para disolver la sulforrodamina-B.
- Determinar la fluorescencia de las células usando una longitud de onda de excitación de 530 nm y 590 nm de emisión en un fluorímetro con lector de microplacas (FLx800 Bio-Tek Instruments, IZASA, Sevilla).

Estos experimentos de viabilidad se realizaron en cada uno de los grupos experimentales antes mencionados.

#### **4. VALORACIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL.**

Para estudiar la validez de nuestro modelo experimental de EP propuesto, nos disponemos a realizar distintas determinaciones; por un lado comprobar la capacidad de almacenaje y liberación de catecolaminas del cultivo, determinando la concentración de dopamina y sus metabolitos tanto en el interior de las células como en el medio extracelular, y por otro lado, comprobando la eficacia de la rotenona en su papel como inhibidor del complejo I de la CTE de la mitocondria.

##### **4.1. Determinación de catecolaminas.**

El contenido en catecolaminas, principalmente dopamina (DA) y sus metabolitos, de las células PC12, así como la cantidad que éstas liberan al medio extracelular, se realiza mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC) con detección electroquímica (ED).

##### *Preparación de muestras*

Las muestras se preparan según el método descrito por Lamensdorf y cols (2000) con diversas modificaciones:

- Sembrar y diferenciar las células en placas de 6 pocillos.
- Sustituir el medio de cultivo RPMI-1640 por medio HBS estéril (NaCl 115 mM, KCl 5.4 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.8 mM, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.8 mM, sacarosa 5.5 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 1 mM, HEPES 15 mM, pH 7.4).
- Incubar durante 15 minutos.
- Pasado este tiempo, reemplazar el medio por HBS fresco en el que se encuentre disuelta la droga a utilizar según el grupo experimental en estudio e incubar en la estufa durante 24 h.
- Trascurrido la incubación, eliminar el medio extracelular con cuidado y proceder a extraer las catecolaminas intra y extracelulares:

**a) catecolaminas extracelulares;** centrifugar el medio extracelular a 200 *g* durante 10 minutos a temperatura ambiente para eliminar los restos de células que puedan haberse desprendido. Añadir en un eppendorf 150 µl de medio extracelular y otros 150 µl de disolución conservante (HClO<sub>4</sub> 0.1 M, etanol 1% y EDTA-Na<sub>2</sub> 0.02%) (para evitar la oxidación de las catecolaminas) en la que están disueltos los estándares internos (DHBA y DE). Proteger las muestras de la luz y conservarlas a -80° C hasta el momento de su análisis.

**b) catecolaminas intracelulares;** despegar las células del pocillo con PSB-EDTA (0.2%) incubando durante unos minutos a 37° C, 5% CO<sub>2</sub> y 90% humedad. Una vez despegadas, centrifugar a 200 *g* durante 10 minutos y a temperatura ambiente, desechando el sobrenadante. Homogeneizar las células en disolución de lisis (HClO<sub>4</sub> 0.2 N, EDTA-Na<sub>4</sub> 1 mM y S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>Na<sub>2</sub> 0.4 mM) en la que están disueltos los estándares internos (DHBA y DE), y se centrifugar a 200 *g* durante 5 minutos a 4° C. Guardar los sobrenadantes protegidos de la luz a -80° C hasta su análisis. Reservar el precipitado para la determinación de las proteínas celulares.

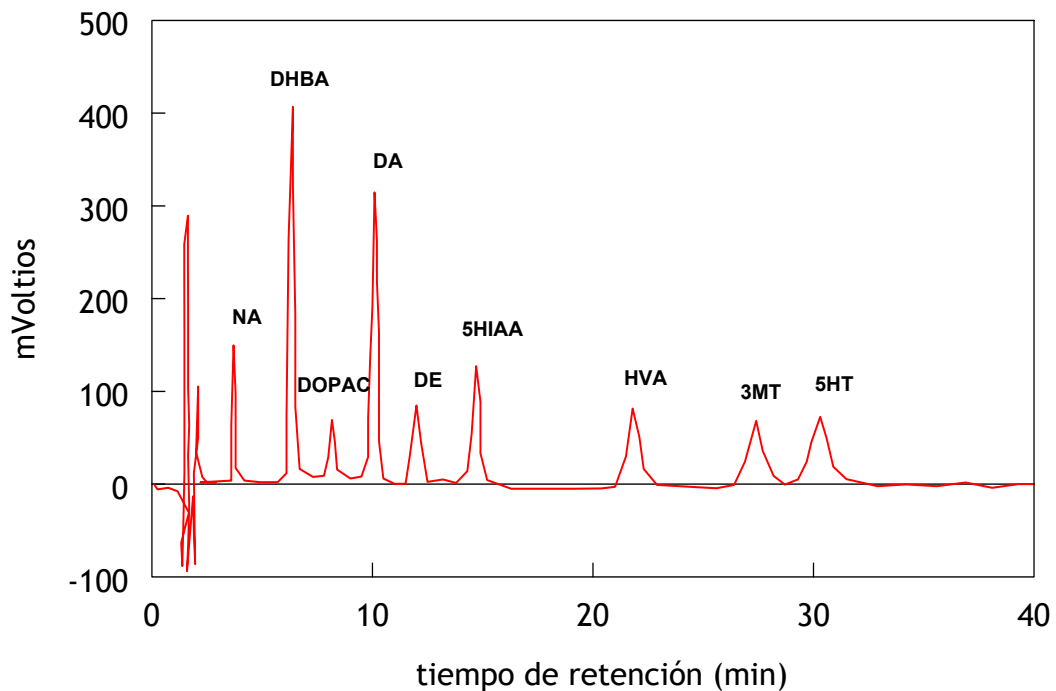
### *Cuantificación de catecolaminas*

Las concentraciones de las monoaminas y sus metabolitos en el medio extracelular y en las propias células se determinan por HPLC-ED. La separación se realiza en una columna analítica de fase inversa C-18 (Waters) conectada en serie a un sistema de HPLC (Gilson). Las muestras se analizan mediante un detector electroquímico (ESA Coulochem III), aplicando un potencial de -50 mV a la célula acondicionadora ( $E_0$ ) y -50 mV y +400 mV el los electrodos de la célula analítica, empleando un electrodo de trabajo de carbono frente al electrodo de referencia ( $H_2/2H^+$ ). Los cromatogramas se analizan con el programa informático UNIPPOINT LC SYSTEM.

La composición de la fase móvil empleada es: acetato sódico 50 mM, ácido cítrico 50 mM, octil-sulfato sódico 0.4 mM, n-dibutilamina 1.1 mM, EDTA- $Na_2$  0.15 mM y un 5% (v/v) de metanol/agua. La fase móvil se filtra (0.45  $\mu$ m de tamaño de poro) y se desgasifica burbujeando helio antes de introducirse en el sistema de HPLC. La separación de catecolaminas se lleva a cabo de modo isocrático con un flujo de 1 ml/min y a temperatura ambiente. Las concentraciones de ácido dihidroxifenil acético (DOPAC), dopamina (DA), ácido 5-hidroxi-indolacético (5HIAA), ácido homovalínico (HVA), 3-metoxitriptamina (3MT) y 5-hidroxitriptamina (5HT) en las muestras se calculan usando 3,4-dihidroxibenzilamina (DHBA) y deoxiepinefrina (DE) como estándares internos y la curva de calibración obtenida de los correspondientes estándares inyectados en el sistema de HPLC, la cual presenta un coeficiente de correlación entre 0 y 150 ng/ml de  $0.998 \pm 0.001$ . Cada monoamina o metabolito analizado se identifica fácilmente comparando sus tiempos de retención y características electroquímicas con sus correspondientes estándares.

En la **figura 1** se representa el cromatograma digitalizado (UNIPPOINT LC SYSTEM) donde cada pico corresponde a los diferentes estándares de la muestra patrón.





**Figura 1.** Cromatograma obtenido de la inyección de una muestra estándar, en el que se representa a qué analito corresponde cada pico. DHBA y DE se usan como estándares internos.

#### 4.2 Medida de la actividad específica del complejo I de la CTE.

La determinación de la actividad del complejo I de la CTE nos indica la validez de la rotenona como tóxico inductor de parkinsonismo en nuestro modelo experimental. Para medir la actividad de este complejo, se usa la fracción cruda de mitocondrias de las células PC12 diferenciadas.

*Preparación de la muestra. Obtención de la fracción mitocondrial.*

La fracción mitocondrial se obtiene por centrifugación diferencial en gradiente de sacarosa (Gottlieb y cols, 2002). Todo el proceso se realiza a 4°C:

- Lavar las células dos veces con PBS y resuspenderlas en tampón 100 mM de sacarosa (MOPS 20 mM, EGTA 1 mM, BSA 1% y sacarosa 100 mM, pH 7.4) a una concentración de  $2 \times 10^8$  células/ml. Homogenizar manualmente en un homogenizador de teflón hasta comprobar mediante tinción con azul tripán que más del 90% de las células están rotas. En nuestro caso, con 3 pasadas a 500 rpm es suficiente.
- Elevar la concentración de sacarosa en el medio hasta 250 mM y centrifugar el homogenado a 2500 *g* durante 5 minutos, para precipitar los núcleos y restos celulares. Reservar el sobrenadante ( $S_1$ ).
- Resuspender el precipitado en tampón sacarosa 250 mM (MOPS 20 mM, EGTA 1 mM, BSA 1% y sacarosa 250 mM, pH 7.4) y centrifugar a 2500 *g* durante 5 minutos. Recoger el sobrenadante ( $S_2$ ) y unirlo a  $S_1$ .
- Centrifugar  $S_2 + S_1$  a 10000 *g* durante 5 minutos. El precipitado constituye la fracción cruda de mitocondrias.

#### *Protocolo experimental.*

Para poder medir la actividad específica del complejo I se emplean partículas submitocondriales. Para ello se sigue un método sencillo y eficaz que consiste en un proceso reiterado de congelación-descongelación de los precipitados mitocondriales obtenidos anteriormente, resuspendidos adecuadamente en un medio ligeramente hipotónico (TRIS-HCl 10 mM, KCl 140 mM, pH 7.4 a 4° C), para asegurar el hinchamiento mitocondrial y posterior ruptura de la membrana externa mitocondrial, sin alterarla composición y actividad catalítica de las proteínas de la membrana interna (Parsons y cols, 1965).

La actividad del complejo I se determina monitorizando espectrofotométricamente la oxidación del NADH a 340 nm en presencia de decilubiquinona (DB), un análogo hidrosoluble de la ubiquinona, siguiendo el método de Zheng (1990), con algunas modificaciones (Escames y cols, 2003):

- Preincubar la fracción submitocondrial (0.4-0.6 mg proteína/ml) en un agitador rotatorio a 25° C durante 3 minutos en medio de reacción (sacarosa 0.25 M,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM y KCN 1 mM, pH 7.4) y en presencia de antimicina A (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y decilubiquinona (50  $\mu\text{M}$ ).
- Añadir NADH (100  $\mu\text{M}$ ) para iniciar la reacción y determinar inmediatamente la caída de absorbancia a 340 nm durante 1.5 minutos en un espectrofotómetro UV- visible (Shimadzu UV-1603).

La actividad del complejo I se expresa como nmoles de NADH oxidados por minuto y por miligramo de proteína, calculados usando el coeficiente de extinción molar del NADH ( $5.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

## 5. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL.

La inhibición del complejo I lleva consigo una disfunción generalizada de la mitocondria, ya que puede disminuir la eficiencia del transporte electrónico que culmina en la reducción del oxígeno molecular a agua, así como disminuir la síntesis de ATP por medio de la fosforilación oxidativa.

### 5.1. Determinación de la bioenergética mitocondrial. Medida de las concentraciones de AMP, ADP y ATP.

Los nucleótidos mono, di y tri fosfatados de adenina se determinan mediante cromatografía líquida de alta presión con detección ultravioleta (HPLC-UV). Para ello es necesario obtener la fracción pura de mitocondrias y de citosol de las células PC12.

#### *Extracción y purificación de mitocondrias y citosol.*

Se obtienen las fracciones crudas de mitocondrias y citosol mediante centrifugación diferencial en gradiente de sacarosa, que se purifican por

centrifugación diferencial a alta velocidad (citosol) y por gradiente de percoll (mitocondrias) siguiendo la técnica descrita por Gottlieb y Granville (Gottlieb y Granville, 2002). Al igual que en el caso anterior, todo el proceso se realiza a 4°C.

La sacarosa aporta un medio no iónico, que permite la obtención de mitocondrias purificadas, facilitando su separación de otros elementos del citoesqueleto. La ultracentrifugación en gradiente de percoll permite la separación de la fracción mitocondrial en función de la densidad de la misma. En el tampón de homogenización se emplea EGTA como quelante de  $\text{Ca}^{2+}$  y con poca afinidad por el  $\text{Mg}^{2+}$  que nos interesa que esté presente en el medio, ya que es necesario para la síntesis de ATP. La albúmina elimina los ácidos grasos endógenos como acetil CoA, ésteres o lipofosfolípidos que interfieren en la medida final.

*Procedimiento:*

- Lavar las células dos veces con PBS y resuspenderlas en tampón de sacarosa 100 mM (MOPS 20 mM, EGTA 1 mM, BSA 1% y sacarosa 100 mM, pH 7.4) a una concentración de  $2 \times 10^8$  células/ml. Centrifugar a 600 *g* durante 5 minutos, desechar el sobrenadante.
- Homogenizar las células en tampón de sacarosa 100 mM en presencia de inhibidores de proteasas (leupeptina, aprotinina y pepstatina 10  $\mu\text{M}$  y PMSF 1 mM), con 5 pases en un homogenizador de teflón a 500 rpm.
- Aumentar la concentración de sacarosa del medio a 250 mM y centrifugar el homogenado a 2500 *g* durante 5 minutos, para precipitar núcleos y restos celulares. Reservar el sobrenadante ( $S_1$ ).
- Resuspender el precipitado en tampón sacarosa 250 mM (MOPS 20 mM, EGTA 1 mM, BSA 1% y sacarosa 250 mM, pH 7.4) y centrifugar a 2500 *g* durante 5 minutos. Recoger el sobrenadante ( $S_2$ ) y unirlo a  $S_1$ .

- Centrifugar  $S_2 + S_1$  a 10000  $g$  durante 5 minutos. El precipitado constituye la fracción cruda de mitocondrias (M) y el sobrenadante la fracción cruda de citosol (C).
- Ultracentrifugar C a 50000 rpm durante 30 minutos. El sobrenadante obtenido constituirá el citosol puro (guardar una alícuota para posterior determinación de proteínas).
- Resuspender M en un tampón sacarosa 300 mM (MOPS 20 mM, EGTA 1 mM, BSA 1% y sacarosa 300 mM, Ph 7.4) al 13% de percoll, en el que se encuentren disueltos inhibidores de proteasas.
- Preparar el gradiente de percoll añadiendo lentamente en un tubo 1ml de percoll al 40%, sobre él 1ml de percoll al 19% y, finalmente, 1ml de la disolución de percoll al 13% que contenga la fracción cruda de mitocondrias.
- Ultracentrifugar a 32000  $g$  durante 10 minutos.
- Recoger la banda de mitocondrias purificadas entre la fase de percoll de 40% y la de 19%
- Resuspender en tampón de sacarosa 300 mM y centrifugar a 16700  $g$  durante 10 minutos, para eliminar restos de percoll. El precipitado se reserva para la determinación de AMP, ADP y ATP.

#### *Preparación de la muestra*

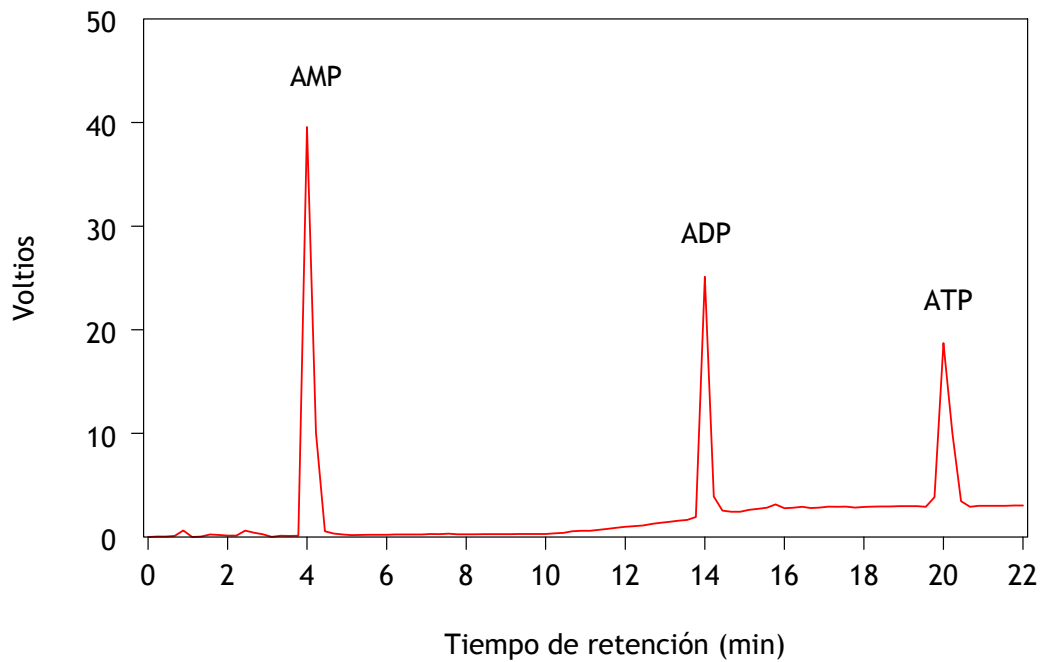
Para la determinación de nucleótidos de adenina, las muestras se homogenizan en ácido perclórico siguiendo el método descrito por Manfredi y cols (Manfredi y cols, 2002). Una vez obtenidos el citosol y las mitocondrias puras, resuspender en  $\text{HClO}_4$  0.5 M y homogeneizar por agitación durante 1-2 minutos. Centrifugar a 25000  $g$  durante 15 minutos a 2° C y añadir al sobrenadante  $\text{K}_2\text{CO}_3$  5 M, para neutralizar el  $\text{HClO}_4$  (este último precipita las proteínas mitocondriales, por lo que se reserva el precipitado para su posterior determinación de proteínas), dejar reposar sobre hielo durante 5 minutos y centrífugar a 1200  $g$  durante otros 10 minutos a 2° C. Separar el sobrenadante y mantenerlo a -80° C hasta su análisis.

### *Cuantificación de nucleótidos de adenina*

Las concentraciones de AMP, ADP y ATP citosólicas y mitocondriales se determinan por HPLC-UV (Pissared, 1999). La separación se realiza en una columna analítica ProPac PA1 de 4x250 mm (Dionex) conectada en serie con un sistema Shimadzu de HPLC que consta de un desgasificador DGU-14, una bomba LC- 10<sup>a</sup> y un detector UV que determina la absorbancia de la muestra a 254 nm de longitud de onda. La fase móvil está formada por agua desionizada (A) y carbonato amónico pH 8.9 (B) (ambas filtradas por 0.45 µm) y se emplea un flujo (1ml/min) de gradiente binario con un 50% de A y 50% de B durante los primeros 5 minutos; un 100% entre 5-40 minutos y un 50% de A y 50% de B durante los últimos 5 minutos. Los cromatogramas se analizan con el programa informático CLASS-VP CHROMATOGRAPHY DATA SYSTEM.

Los picos de AMP, ADP y ATP de las muestras se identifican fácilmente comparando sus tiempos de retención con los que presentan los correspondientes estándares analizados por el sistema, y su concentración se calcula por interpolación en la recta de regresión elaborada con dichos estándares de AMP, ADT y ATP, que presentan una linealidad entre 0 y 25 mg/l con un coeficiente de regresión de  $0.99 \pm 0.01$ . Los estándares han de prepararse en las mismas condiciones de preparación de las muestras (Manfredi y cols, 2002).

En la **figura 2** se representa se representa el cromatograma digitalizado (CLASS-VP CHROMATOGRAPHY DATA SYSTEM) donde cada pico corresponde a los diferentes estándares de la muestra patrón.



**Figura 2.** Cromatograma obtenido de la inyección de una muestra estándar. Los compuestos detectados se representan encima de cada pico.

El cálculo de carga energética mitocondrial y/o citosólica se realiza a partir de las concentraciones mitocondriales y/o citosólicas, siguiendo la siguiente fórmula (Ataullakhanov y Vitvitsky, 2002) :

$$\text{Carga energética} = \text{ATP} + (0.5 \times \text{ADP}) / (\text{AMP} + \text{ADP} + \text{ATP})$$

## 5.2. Estimación de la permeabilidad de la membrana mitocondrial.

### 5.2.1 Medida del potencial de membrana mitocondrial.

El ioduro de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetil-benzimidazolilcarbocianina (JC-1) (figura 3) es un compuesto lipofílico catiónico sensible a los cambios de potencial de la membrana mitocondrial. En células sanas, marca la mitocondria emitiendo fluorescencia roja. La carga negativa establecida por la membrana mitocondrial intacta permite al JC-1, que posee una carga positiva deslocalizada, entrar en la matriz mitocondrial donde se acumula. Cuando alcanza una concentración crítica, se forman J-agregados que emiten fluorescencia roja. En células apoptóticas, el potencial de membrana de la mitocondria decae, con lo que el JC-1 no se puede acumular dentro de la organela y permanece en el citosol en forma monomérica, emitiendo fluorescencia verde. De esta forma, es fácil distinguir las células apoptóticas, que sólo emiten fluorescencia verde, de las sanas, que emiten fluorescencia roja y verde. La forma agregada roja posee un máximo de absorción/emisión a 585/590 nm, mientras que para la forma monomérica verde es a 510/527 nm.

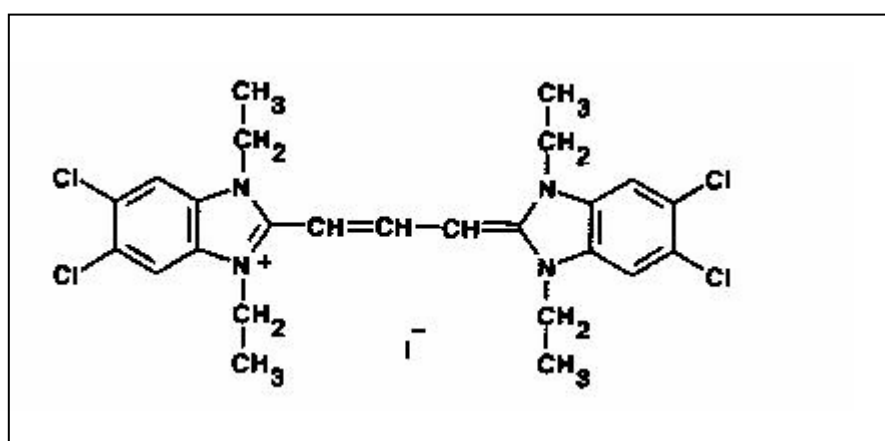


Figura 3. Estructura química del ioduro de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetil-benzimidazolilcarbocianina (JC-1)



Normalmente se suele utilizar como marcador del estado del potencial de membrana mitocondrial el cociente entre la fluorescencia roja y verde emitida por el JC-1, ya que esta relación depende sólo del potencial de la membrana y no de otros factores como el tamaño de la mitocondria, su forma o su densidad, que sí pueden influir en la señal neta de fluorescencia, pero no en la relación entre ambas emisiones.

### *Preparación de la muestra*

Las muestras de células PC12 diferenciadas se preparan siguiendo las indicaciones del fabricante expuestas en el kit de detección de potencial de membrana mitocondrial BIOCARTA JC-1:

- Lavar las células dos veces con PBS.
- Despegar con PBS-EDTA (0.2%) y centrifugar a 400 *g* durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Resuspender las células en PBS a una concentración de  $5 \times 10^5$  células/ml. Centrifugar a 400 *g* durante 5 minutos a temperatura ambiente y desechar el sobrenadante.
- Resuspender las células en 0.5 ml de tampón de incubación con reactivo JC-1 e incubar durante 15 minutos a 37° C, a un 5% de CO<sub>2</sub> y 90% de humedad (en el incubador).
- Centrifugar las muestras a 400 *g* durante 5 minutos a temperatura ambiente y eliminar el sobrenadante.
- Lavar dos veces las muestras con 2 ml de tampón de incubación y centrifugar a 400 *g* durante 5 minutos.
- Finalmente resuspender las células en 300 µl de tampón de incubación y leer por triplicado en un fluorímetro de placas.

### *Determinación fluorimétrica*

La medida de la emisión de fluorescencia roja y verde se lleva a cabo en un fluorímetro con lector de microplaca FLx800-1 (Bio-Tek) previa agitación de la placa de 30 segundos en cada lectura, en las siguientes condiciones:

- Lectura 1: fluorescencia roja
  - Longitud de onda: excitación 545/40 nm  
emisión 590/20 nm
  - Posición de la óptica: abajo
  - Sensibilidad: 50
  
- Lectura 2: fluorescencia verde
  - Longitud de onda: excitación 450/50 nm  
emisión 528/20 nm
  - Posición de la óptica: abajo
  - Sensibilidad: 75

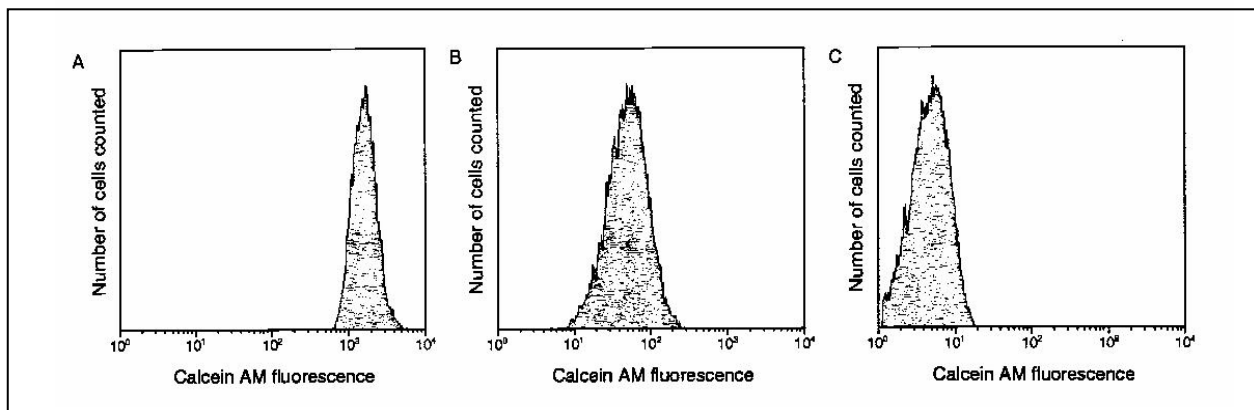
Los resultados se expresan como el cociente entre la fluorescencia roja y la fluorescencia verde emitidas.

#### **5.2.2. Cinética del poro de transición mitocondrial.**

La cinética del poro de transición mitocondrial se determina mediante el método descrito por Jones y cols (2002), mediante la medida de la fluorescencia emitida por un acetoximetil éster de calceína (calceína AM).

La calceína AM es un compuesto lipofílico que difunde pasivamente a las células y se acumula en los compartimentos citosólicos, incluyendo la mitocondria. Un vez dentro de las células, las esterasas intracelulares actúan

sobre los ésteres acetoximetilos permitiendo la liberación calceína, agente fluorescente de elevada polaridad, que no es capaz de atravesar las membranas mitocondriales o citoplasmáticas en cantidades apreciables durante periodos de tiempo relativamente cortos. Si añadimos cloruro de cobalto en este momento, la fluorescencia que la calceína emite en el citosol queda bloqueada, mientras que la fluorescencia emitida de la mitocondria se mantiene (el cloruro de cobalto no es capaz de atravesar la membrana mitocondrial). Como control, además de calceína y cloruro de cobalto, las células también se tratan con un ionóforo, la ionomicina, que permite la entrada de un exceso de  $\text{Ca}^{2+}$  en las células que dispara la activación del poro mitocondrial y la consecuente pérdida de la fluorescencia emitida por la calceína en la mitocondria. Así, la diferencia entre la fluorescencia emitida cuando las células son tratadas con calceína y cloruro de cobalto y la fluorescencia emitida cuando se añade ionomicina, nos dará una indicación sobre la actividad del poro de transición en dichas células (**figura 4**).



**Figura 4.** Fluorescencia emitida por la calceína en una muestra celular (A) en ausencia de cloruro de cobalto e ionomicina y, por tanto correspondiente a la calceína presente tanto en citosol como en mitocondria; (B) en presencia de cloruro de cobalto, la fluorescencia se debe a la calceína contenida en las mitocondrias y (C) la fluorescencia emitida por la calceína prácticamente cesa en presencia de cloruro de cobalto e ionomicina.

### *Preparación de la muestra*

Las muestras de PC12 se preparan siguiendo las indicaciones del fabricante expuestas en el kit de análisis MitoProbe™ Transition Pore Assay Kit (Molecular Probes):

- Resuspender las células en HBSS/Ca<sup>2+</sup> a una concentración final de 1x10<sup>6</sup> células/ml.
- Separar tres alícuotas de 1 ml de la suspensión celular: tubo 1, tubo 2 y tubo 3.
- Añadir 5µl de calceína AM 2 µM a los tubos 1, 2 y 3 y agitar bien.
- Añadir 5µl de cloruro de cobalto 80 mM a los tubos 2 y 3 y agitar bien.
- Añadir 5µl de ionomicina 100 mM al tubo 3 y agitar bien.
- Incubar las muestras a 37° C durante 15 minutos protegidas de la luz.
- Añadir 3.5 ml de HBSS/Ca<sup>2+</sup> a cada tubo y centrifugar a 200 *g* durante 10 minutos a temperatura ambiente, para eliminar el exceso de reactivos.
- Resuspender las células en disolución salina y mantener las muestras en hielo hasta su determinación. Su análisis en el citómetro de flujo debe hacerse antes de una hora.

### *Citometría de flujo*

Las muestras se analizan en un citómetro de flujo BECTON DICKINSON modelo FACS Vantage, dotado de un láser dual ultravioleta-visible a 488 y 365 nm y un láser rojo a 635 nm. La adquisición de la muestra se realiza a una concentración de 5x10<sup>5</sup> células/ml y a una velocidad de 500 células/seg, midiéndose en el canal FL<sub>1</sub> con un filtro BP de 530 ± 30 nm. Los resultados se analizan con el programa informático CELL-QUEST.

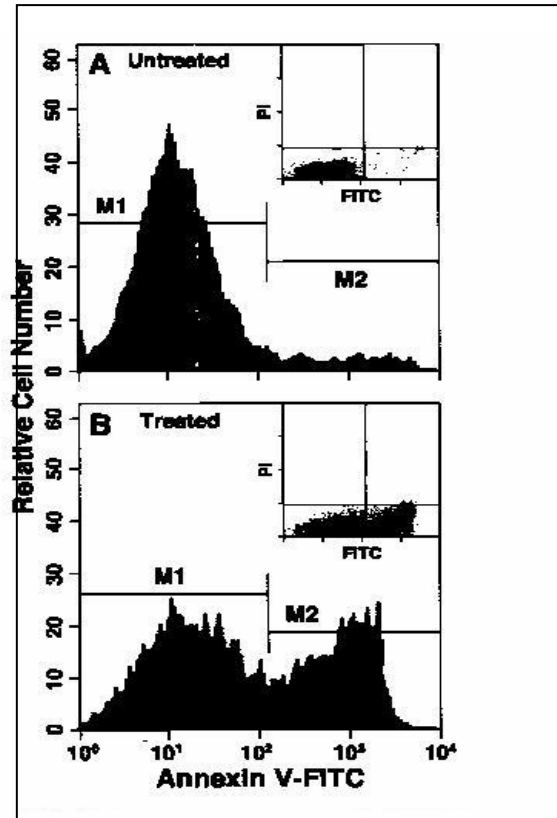
La actividad del poro de transición se determina sustrayendo la fluorescencia emitida por la calceína en presencia de cloruro de cobalto e ionomicina (**figura 4, C**) a la emitida por la calceína en presencia únicamente de cloruro de cobalto (**figura 4, B**). En todos los experimentos se resta la fluorescencia emitida por un blanco (muestra sin reactivos) a la emitida por cada muestra problema. Los resultados se representan en porcentaje con respecto al control.

## 6. DETERMINACIÓN DE LA MUERTE CELULAR POR APOPTOSIS

La muerte celular por apoptosis se ha estimado mediante mediciones de citometría de flujo tras tratar las muestras celulares con anexina V-FITC e yoduro de propidio (PI).

El proceso apoptótico se caracteriza por diversos cambios morfológicos en la célula, entre ellos se encuentra la pérdida de asimetría de las membranas plasmáticas, que además es uno de los eventos que ocurren al principio del proceso apoptótico; la capa fosfolípida de fosfatidilserina (PS) se transloca desde la cara interna hacia la cara externa de las membranas plasmáticas, dejando la PS expuesta al medio extracelular.

La anexina V es una proteína de 35-36 kDa, dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , capaz de unirse a la superficie cargada negativamente de fosfolípidos y que presenta gran afinidad por la PS, uniéndose a las células que exponen dichos residuos (Raynal y Pollard, 1994). Cuando la anexina V se une a algún fluorocromo, como el yoduro de propidio (PI), no pierde su afinidad por la PS y permite su medida por citometría de flujo (**figura 5**), constituyendo una prueba muy sensible para determinar células apoptóticas en fase temprana (Van Engeland y cols, 1996).



**Figura 3.** Imágenes obtenidas por citometría de flujo de una muestra celular no tratada (A) donde no se ha inducido la apoptosis y las células son viables (negativas para anexina V-FITC y PI: la población celular permanece en el cuadrante inferior izquierdo); y una muestra tratada con un inductor de apoptosis (B), donde se ven dos poblaciones celulares, una viable (cuadrante inferior izquierdo) y otra que sufre apoptosis (positiva para anexina V-FITC y negativa para PI: población que se desplaza hacia el cuadrante inferior derecho)

### *Preparación de la muestra*

Las muestras celulares se preparan siguiendo las indicaciones del fabricante del Annexin V-FITC apoptosis detection kit I (BD Pharmingen<sup>TM</sup> Technical Data Sheet), según el siguiente protocolo:

- Lavar las células con PBS frío dos veces y resuspenderlas en tampón de unión (Hepes 0.1 M/NaOH, pH 7.4; NaCl 1.4 M, CaCl<sub>2</sub> 25 mM) a una concentración final de  $1 \times 10^6$  células/ml.
- Tomar 100  $\mu$ l de la suspensión celular y añadir 5  $\mu$ l de anexina V-FITC y 5  $\mu$ l de PI.
- Agitar suavemente e incubar en la oscuridad durante 15 minutos a temperatura ambiente (25° C).
- Transcurrida la incubación, añadir 400  $\mu$ l de tampón de unión a cada muestra. Su análisis en el citómetro de flujo debe hacerse antes de una hora.

### *Citometría de flujo*

Las muestras se analizan en un citómetro de flujo BECTON DICKINSON modelo FACS Vantage, dotado de un láser dual ultravioleta-visible a 488 y 365 nm y un láser rojo a 635 nm. La adquisición de la muestra se realiza a una concentración de  $5 \times 10^5$  células/ml y a una velocidad de 500 células/seg, midiéndose en los canales FL<sub>1</sub> y FL<sub>2</sub> con filtros BP de  $530 \pm 30$  nm y  $585 \pm 42$  nm respectivamente. Los resultados se analizan con el programa informático CELL-QUEST.

El porcentaje de células al que le ha sido inducida la apoptosis se calcula sustrayendo el porcentaje de células apoptóticas en una población no tratada (control) del porcentaje de células apoptóticas en una población tratada (rotenona, melatonina y demás drogas empleadas).

## 7. MEDIDA DE ESTRÉS OXIDATIVO CELULAR

### 7.1. Determinación de los niveles de GSSG/GSH

El glutatión (GSH) es un tiol muy abundante en tejidos animales, vegetales y bacterias. Se trata de un tripéptido que tiene funciones muy importantes, tales como la protección frente a especies reactivas de oxígeno y el mantenimiento de los grupos -SH de las proteínas. Durante estas reacciones, el GSH se transforma en glutatión oxidado (GSSG), el cual puede ser reciclado nuevamente a GSH por acción de la glutatión reductasa (GRd), que utiliza NADPH como coenzima. En condiciones normales, el GSH es la forma predominante en los organismos.

EL DTNB (ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoico)), conocido como el reactivo de Ellman, se utiliza para detectar compuestos tiol. En 1985, Anderson, basándose en un método anterior descrito por Griffith (1980), sugirió que el sistema de reciclaje del GSH por el DTNB y GRd representa un método muy sensible para la cuantificación de GSH. DTNB y GSH reaccionan para generar ácido 2-nitro-5-tiobenzoico (NTB) y GSSG. El NTB es un producto coloreado que posee un máximo de absorción a 412 nm. Midiendo la absorbancia que presenta una muestra a esta longitud de onda, podremos determinar indirectamente su contenido en GSH. El GSH se recicla continuamente mientras no se agoten el DTNB y la GRd. La velocidad de aparición de NTB será directamente proporcional a la concentración de glutatión total (GSX), suma de GSH y GSSG.

Si conseguimos “anular” antes de dar comienzo la reacción al GSH (tratando con vinilpiridina), se podrá determinar, con el mismo método, el contenido de GSSG de la muestra, ya que la reacción se iniciará transformando el GSSG en GSH por la GRd en presencia de NADH y la absorbancia emitida se corresponderá en este caso únicamente con el contenido en GSSG. Restando al contenido en GSX el obtenido en GSSG, tendremos la concentración de GSH de la muestra.



### *Preparación de la muestra*

Antes del tratamiento con DTNB, es necesario eliminar las proteínas de las soluciones de muestras; Para ello se tratan las muestras con ácido sulfosalicílico (SSA), que permite precipitar proteínas y aminoácidos libres y prevenir la oxidación del GSH en la reacción de la  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa.

El procedimiento a seguir es el siguiente:

- Recoger las células ( $5 \times 10^5$ ) por centrifugación a 200 *g* durante 10 minutos a 4°C y lavar el precipitado con 300  $\mu$ l de PBS.
- Resuspender el precipitado celular en 100  $\mu$ l de SSA al 5%.
- Lisar las células mediante sonicación (3 ciclos de 10 segundos al 20% de intensidad) con la muestra sobre hielo para disipar el calor.
- Centrifugar las muestras a 8000 *g* durante 1 minuto a 4°C y recoger el sobrenadante para las mediciones de GSX y GSSG. Conservar el precipitado para su posterior determinación de proteínas.
- Para la determinación de GSX, tomar una alícuota de la muestra que se diluye 1:5 en tampón fosfato-EDTA 0.125 M a pH 7.5.
- Para la determinación de GSSG, tomar una alícuota de la muestra, diluir 1:2 con tampón fosfato-EDTA 0.125 M a pH 7.5 y añadir 1  $\mu$ l de 2-vinilpiridina por cada 100  $\mu$ l de volumen de muestra. Agitar bien e incubar la muestra 30 minutos a 30°C. Centrifugar a 1000 *g* durante 1 minuto a 4°C. Tomar sobrenadante y diluir 1:4 con tampón fosfato-EDTA 0.125 M a pH 7.5.

### *Determinación espectrofotométrica de GSX y GSSG.*

Preparar soluciones estándar de GSH a concentraciones crecientes (de 0 a 12.5  $\mu\text{M}$ ) en SSA a la misma concentración final que la muestra.

Una vez preparadas las muestras problema y los estándares, en un eppendorf añadir:

- 200  $\mu\text{l}$  de muestra o estándar
- 100  $\mu\text{l}$  de DTNB 6 mM preparado en tampón fosfato-EDTA 0.125 M a pH 7.5
- 700  $\mu\text{l}$  del coenzima NADPH 0.3 mM preparado fresco en tampón fosfato-EDTA 0.125 M a pH 7.5

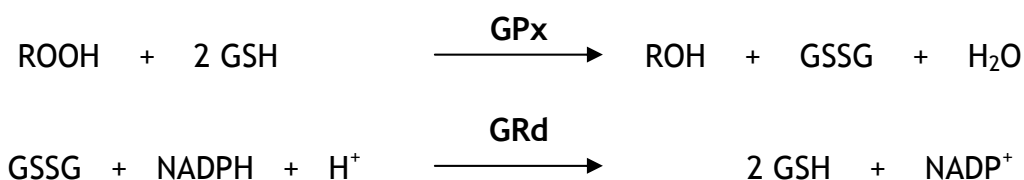
Agitar bien e incubamos a 30° C durante 3 minutos en el baño maría. Pasado este tiempo añadir 5  $\mu\text{l}$  de GRd (200 U/ml), agitar bien y medir inmediatamente su absorbancia a 412 nm durante 3 minutos en un espectrofotómetro de UV-visible (Shimadzu UV-1603).

Los valores obtenidos por el espectrofotómetro indican el incremento de absorbancia del NTB formado durante 3 minutos de reacción, este incremento no es más que la pendiente de la curva cinética de la reacción colorimétrica del DTNB con los patrones de GSH. Tomando los valores de estas pendientes y representándolos en función de la concentración de los estándares de GSH obtenemos una recta de regresión (coeficiente de regresión de  $0.99 \pm 0.01$ ) donde interpolar los valores de las pendientes obtenidos para las muestras problema, tanto para el GSX como para el GSSG, restando ambos resultados se obtiene la concentración de GSH en la muestra. Los resultados se expresan en nmoles de GSH ó de GSSG por miligramo de proteína.

## 7.2. Medida de la actividad de los enzimas glutathion peroxidasa (GPx) y glutathion reductasa (GRd).

La actividad de los enzimas implicados en el ciclo del GSH, GPx y GRd, se determinaron espectrofotométricamente siguiendo la caída de absorbancia del coenzima implicado, el NADPH, medida a una longitud de onda de 340 nm.

La GPx cataliza la reducción de hidroperóxidos por GSH. La GPx está formada por cuatro subunidades idénticas, cada una de las cuales contiene un residuo de selenocisteína en su sitio activo, que participa en la reducción de dos electrones del peróxido sustrato. El enzima usa GSH como último donante de electrones para generar la forma reducida de la selenocisteína (Ursini, 1985).



La reacción de detoxificación de la GPx lleva ligada la reacción de recuperación del GSH, catalizada por la GRd. La GRd contiene una unidad FAD en cada una de sus subunidades, que muestran una elevada afinidad por el NADPH y por el GSSG. La enzima se inhibe con iones metálicos divalentes ( $\text{Zn}^{2+}$  o  $\text{Cd}^{2+}$ ) y desciende su actividad en presencia de sulfato amónico a concentraciones mayores de 60 mM.

### *Preparación de la muestra*

La preparación de los cultivos para la determinación de la actividad de GPx y GRd es la misma, y sigue el siguiente procedimiento:

- Despegar las células ( $5 \times 10^5$ ) del colágeno y lavar con PBS. Centrifugar a 200 *g* durante 10 minutos.
- Homogenizar las células en 100  $\mu$ l tampón fosfato (50 mM pH 7.4) con EDTA(K<sup>+</sup>) 1 mM mediante sonicación (3 ciclos de 10 seg al 20% de intensidad), con la muestra sobre hielo para disipar el calor.
- Centrifugar la muestra a 10.000 *g* durante 10 minutos a 4° C, recoger el sobrenadante y separarlo en sendas alícuotas para determinar la actividad de GPx y GRd (guardar las muestras a -80° C hasta el momento de su determinación).

### *Medida de la actividad de la GPx*

Se determina la caída de absorbancia a 340 nm de la muestra catalizada por la GRd añadida al medio de reacción y, paralelamente la caída de absorbancia de la muestra por oxidación espontánea de NADPH (reacción no catalizada). La resta entre ambas indicará la actividad de la GPx de la muestra problema.

- **Reacción no catalizada:** en un eppendorf añadir 600  $\mu$ l de NADPH 0.2 mM preparado fresco en tampón fosfato-EDTA, y 25  $\mu$ l de muestra problema e incubar en el baño maría durante 4 minutos a 37° C. Tras la incubación, añadir 25  $\mu$ l de cumeno hidroperóxido (a concentración suficiente para lanzar la reacción) y medir su absorbancia a 340 nm durante 3 minutos en un espectrofotómetro de UV-visible (Shimadzu UV-1603).

- **Reacción catalizada:** en un eppendorf añadir 600 µl de disolución de trabajo preparado fresco en tampón fosfato EDTA (azida sódica 4.2 mM, GSH 4.2 mM, NADPH 0.2 mM y GRd 0.5 U/ml), 25 µl de la muestra problema e incubar durante 4 minutos a 37° C. Pasado este tiempo añadir 25 µl de cumeno hidroperóxido y medir su absorbancia a 340 nm durante 3 minutos en un espectrofotómetro de UV-visible (Shimadzu UV-1603).

La actividad enzimática se determina siguiendo la siguiente fórmula:

$$\text{nmol/min/ml} = \frac{(\Delta \text{Abs}_{\text{r.catalizada}} - \Delta \text{Abs}_{\text{r. no catalizada}})_{340 \text{ nm}} / 3 \text{ minutos}}{\epsilon_{\text{NADPH}}} \times \frac{V_{\text{total}}}{V_{\text{muestra}}}$$

donde  $\epsilon_{\text{NADPH}}$  es el coeficiente de extinción molar del NADPH (  $0.00622 \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ). Los valores de actividad de GPx se expresan como actividad enzimática específica en nmol/min/mg de proteína de muestra.

#### *Medida de la actividad de la GRd*

Se determina la caída de absorbancia a 340 nm de la muestra tras añadir GSSG como sustrato para la GRd y, paralelamente la caída de absorbancia de la muestra por oxidación espontánea de NADPH (reacción no catalizada). La diferencia entre ambas indicará la actividad de la GRx de la muestra problema.

- **Reacción no catalizada:** en un eppendorf añadir 465 µl de tampón fosfato-EDTA, añadir 35 µl de muestra problema e incubar en el baño maría durante 4 minutos a 37° C. Tras la incubación añadir 8.5 µl de NADPH y medir su absorbancia a 340 nm durante 3 minutos en un espectrofotómetro de UV-visible (Shimadzu UV-1603).

- **Reacción catalizada:** en un eppendorf añadir 465  $\mu$ l de GSSG 2 mM preparado fresco en tampón fosfato EDTA; poner 35  $\mu$ l de la muestra problema e incubar durante 4 minutos a 37° C. Pasado este tiempo añadir 8.5  $\mu$ l de NADPH y medir su absorbancia a 340 nm durante 3 minutos en un espectrofotómetro de UV-visible (Shimadzu UV-1603).

La actividad enzimática se calcula de igual manera que para la GPx y se expresa también en nmol/minutos/mg de proteína de la muestra problema.

## 8. DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

La concentración de proteínas de las muestras se determina siguiendo el método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976). Se basa en la formación de un compuesto coloreado entre el azul comassie y las proteínas, que se caracteriza por presentar un máximo de absorción a 595 nm y un alto coeficiente de extinción, lo que permite una elevada sensibilidad en la determinación.

El reactivo de Bradford se prepara disolviendo 100 mg de azul comassie G 250 en 50 ml de etanol 96% y añadiendo 100 ml de ácido ortofosfórico 85% y cantidad suficiente de agua destilada hasta un volumen final de un litro.

### *Preparación de la muestra*

Preparar una disolución patrón de albúmina en agua destilada y distintos estándares de concentración creciente de albúmina (0-250  $\mu$ g/ml). Paralelamente preparar las muestras problema con la dilución adecuada. Añadir a todos los tubos (estándares y muestras) 1 ml de reactivo de Bradford diluido 1:5. Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente y leer la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro con lector de microplacas (Bio-Tec PowerWave<sub>x</sub>).

La concentración de proteínas de la muestra problema se obtiene interpolando su valor de absorbancia en la curva patrón obtenida (coeficiente correlación  $0.99 \pm 0.01$ ) y multiplicando posteriormente por el factor de dilución aplicado en cada caso. Los valores de concentración de proteínas se expresan en mg/ml.

## **9 . ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Todos los datos se expresan como valor medio  $\pm$  error estándar de la media (SEM). En cada caso se realizan tres experimentos por duplicado. Se realiza un análisis de varianza de una vía (ANOVA I) seguido de un estudio de la t de Student por el método Neuman-Keuls (específico para varios grupos). El nivel de significación se establece en  $P < 0.05$ .

# RESULTADOS





## 1. VALORACIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL

### 1.1. Viabilidad Celular. Efectos de la melatonina y la CsA sobre la inhibición de la viabilidad celular inducida por la rotenona.

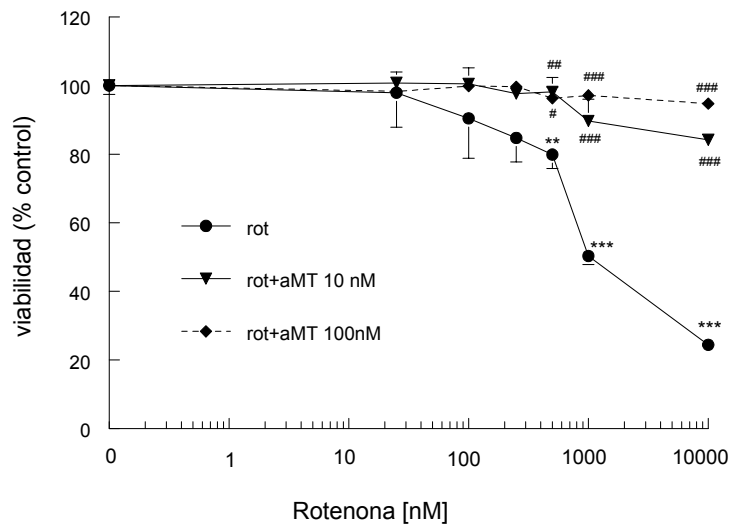
Para iniciar el estudio sobre la citotoxicidad inducida por la rotenona en las células PC12 diferenciadas, realizamos un análisis de la viabilidad en células tratadas con el tóxico a concentraciones comprendidas entre 10 nM y 10  $\mu$ M, cuyos resultados se observan en la **Figura 1.A**.

La rotenona induce muerte celular de una forma dosis-dependiente y a concentraciones de 500 nM de rotenona, el 20% del cultivo ya no es viable ( $P < 0.01$ ), a 1  $\mu$ M hay un 50% de células vivas ( $P < 0.001$ ) y a 10  $\mu$ M desciende la viabilidad hasta un 80% con respecto a las células control tratadas con vehículo ( $P < 0.001$ ) (**Figura 1.A**).

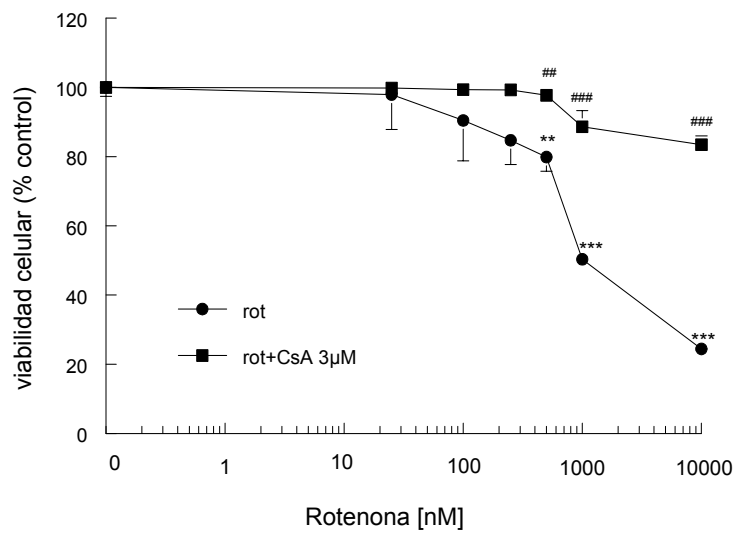
La melatonina (aMT) contrarresta el efecto de la rotenona hasta la dosis de 500 nM de ésta, manteniendo la viabilidad celular al 100% aún a la dosis más baja de 10 nM (**Figura 1.A**). A partir de 500 nM de rotenona, 10 nM de aMT mantienen la viabilidad del cultivo entre un 80-90% ( $P < 0.01$ ), mientras que aMT 100 nM mantiene prácticamente a nivel del control los valores de la viabilidad celular ( $P < 0.001$ ).

En la **Figura 1.B** se representan los resultados con CsA que, a la concentración empleada de 3  $\mu$ M, mantiene la viabilidad del cultivo con una curva similar a la mostrada por aMT10 nM. Vemos, pues, que el tratamiento con aMT 100 nM resulta más eficaz para proteger y mantener la viabilidad celular que una dosis mucho mayor (3  $\mu$ M) de CsA cuando las PC12 se incuban con rotenona.

### 1.A



### 1.B



**Figura 1.** Viabilidad de las células PC12 diferenciadas tratadas con dosis crecientes de rotenona (10-10.000 nM) durante 24 h, en presencia de aMT (10 y 100 nM) (A) o de CsA 3 µM (B). \*\*P < 0.01 y \*\*\*P < 0.001 vs control y # P < 0.05, ##P < 0.01 y ###P < 0.001 vs rotenona.

## 1.2. Catecolaminas. Efectos de la melatonina y la CsA sobre la inhibición de los niveles de catecolaminas inducida por la rotenona.

En nuestro modelo experimental, tratamos células PC12 diferenciadas con rotenona para inducir unos efectos que mimeticen a los que acontecen en la EP. Para comprobar si la rotenona tiene algún efecto en la producción y liberación de dopamina, determinamos por HPLC las concentraciones de DA y sus principales metabolitos (DOPAC, 5HIAA, HVA, 5HT y 3MT) tanto en las células como en el medio extracelular.

### *Niveles de catecolaminas intracelulares.*

En ausencia de rotenona, los niveles de DA no muestran cambios significativos entre las muestras control y aquellas tratadas con melatonina (10 y 100 nM) y CsA (Tabla 1). Lo mismo sucede con los metabolitos intracelulares de DA, DOPAC y HVA.

Sin embargo, cuando las muestras se incuban en presencia de rotenona (500 nM) los niveles tanto de DA como de DOPAC, descienden drásticamente. Incluso el HVA desaparece en la muestra incubada con rotenona (Tabla 1).

Al tratar las muestras incubadas en presencia del neurotóxico con aMT no se observa una recuperación significativa de los niveles de catecolaminas intracelulares; tan sólo podemos destacar un leve aumento de los niveles de DA y DOPAC cuando la muestra se trata con 100 nM de aMT. Un comportamiento similar ocurrió con la CsA, que fue incapaz de recuperar los niveles de catecolaminas inhibidos por la rotenona (Tabla 1).

*Tabla 1. Catecolaminas intracelulares (ng/mg proteína)*

	<i>DA</i>	<i>DOPAc</i>	<i>HVA</i>
Control	1041.25 ± 29.87	143.05 ± 2.95	33.10 ± 3.61
10 nM aMT	1384.50 ± 13.53	165.75 ± 8.67	56.04 ± 6.07
100 nM aMT	950.02 ± 19.30	146.44 ± 7.56	31.27 ± 2.68
3 µM CsA	861.08 ± 7.99	179.78 ± 2.64	37.20 ± 2.70
Rotenona	18.40 ± 1.76***	8.69 ± 2.04***	0.00 ± 0.00***
Rot + 10 nM aMT	24.23 ± 0.91***	11.72 ± 2.63***	0.00 ± 0.00***
Rot + 100 nM aMT	46.90 ± 4.69***	20.79 ± 2.91***	0.00 ± 0.00***
Rot + 3 µM CsA	19.68 ± 4.57***	10.60 ± 1.93***	0.00 ± 0.00***

Valores intracelulares de dopamina (DA), ácido dihidroxifenil acético (DOPAC) y ácido homovanílico (HVA) de células PC12 diferenciadas incubadas en presencia de rotenona (500 nM) y/o aMT (10 y 100 nM) y CsA (3 µM). \*\*\*P < 0.001 vs control.

#### *Niveles de catecolaminas extracelulares*

Los niveles extracelulares de DA son en general muy inferiores a los hallados intracelularmente, mientras que los de DOPAC se encuentra en cantidades elevadas en el medio extracelular. También aparecen otros metabolitos de la dopamina en el medio extracelular ausentes en el interior de las células, como 5HIAA y 3MT (Tabla 2).

Al igual que con las catecolaminas intracelulares, en las exportadas al medio extracelular no se observan diferencias significativas entre los valores control y los de las muestras tratadas con aMT y CsA en ausencia de rotenona. Tan sólo destacar un nivel algo elevado de 5HIAA con 100 nM de aMT con respecto al encontrado en la muestra control (Tabla 2).

Cuando la muestra se trata con rotenona, aumentan significativamente los niveles extracelulares de DA ( $P < 0.001$ ) y disminuyen los de HVA y 3MT ( $P < 0.001$ ) mientras que desaparece el 5HIAA ( $P < 0.001$ ).

El tratamiento de las células incubadas con rotenona con aMT o CsA no modificó significativamente el efecto de la rotenona (Tabla 2).

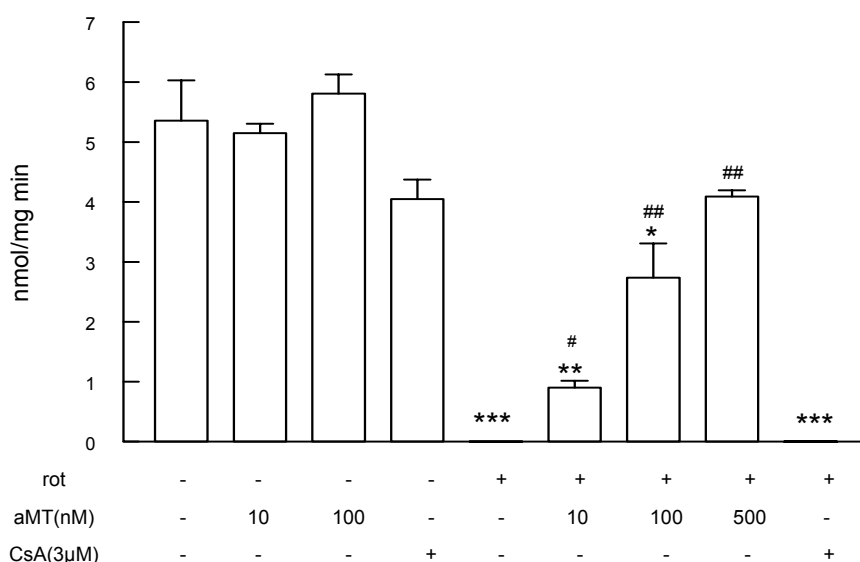
Tabla 2. Catecolaminas extracelulares (ng/mg proteína)

	DA	DOPAc	5HIAA	HVA	3MT
Control	25.59 ± 1.75	227.40 ± 7.55	7.38 ± 0.20	89.42 ± 3.66	63.72 ± 2.42
10 nM aMT	25.92 ± 0.49	205.42 ± 6.36	10.77 ± 3.07	84.13 ± 2.68	50.43 ± 3.34**
100 nM aMT	30.46 ± 1.53	234.93 ± 5.20	20.01 ± 0.35***	88.36 ± 3.12	57.96 ± 3.19
3 μM CsA	34.54 ± 1.68*	227.23 ± 14.45	6.43 ± 1.07	126.53 ± 3.21***	65.52 ± 2.23
Rotenona	87.22 ± 3.31***	195.48 ± 8.91	0.00 ± 0.00***	29.04 ± 1.52***	18.26 ± 2.58***
Rot + 10 nM aMT	99.25 ± 1.85***	227.95 ± 5.66	0.00 ± 0.00***	38.57 ± 5.94***	17.61 ± 0.20***
Rot + 100 nM aMT	77.57 ± 2.72***	190.93 ± 3.73*	0.00 ± 0.00***	26.33 ± 0.93***	19.01 ± 0.70***
Rot + 3 μM CsA	100.35 ± 0.44***	220.64 ± 3.78	0.00 ± 0.00***	29.25 ± 0.35***	21.74 ± 0.86***

Valores de catecolaminas exportadas al medio extracelular. Dopamina (DA), ácido dihidroxifenil acético (DOPAc), ácido 5-hidroxiindolacético (5HIAA), ácido homovanílico (HVA) y 3-metoxitriptamina (3MT) de células PC12 diferenciadas incubadas en presencia de rotenona (500 nM) y/o aMT (10 y 100 nM) y CsA (3 μM). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  y \*\*\* $P < 0.001$  vs control.

### 1.3. Complejo I de la CTE. Efectos de la melatonina y la CsA sobre la inhibición del complejo I inducida por la rotenona.

La inhibición de la actividad del complejo I constituye un pilar fundamental en el desarrollo de nuestro modelo experimental. La **Figura 2** muestra la actividad del complejo I mitocondrial en cultivos de PC12 diferenciadas control y con los dieferentes tratamientos.



**Figura 2.** Actividad del complejo I de la CTE en células PC12 diferenciadas, tratadas durante 24 horas con rotenona (500mM) y/o aMT (10, 100 y 500nM) y CsA (3μM). \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 y \*\*\*P < 0.001 vs control; # P < 0.05, ##P < 0.01 y vs rotenona.

La actividad del complejo I (expresada en nmoles de NADH oxidados por minuto y por miligramo de proteína), no se altera significativamente cuando la muestra se trata con aMT (10 y 100 nM) o con CsA, en ausencia de rotenona.

Cuando incubamos las células con rotenona durante 24 horas, la actividad del complejo I se inhibe completamente ( $P < 0.001$  frente al control). El tratamiento con aMT es capaz recuperar de forma dosis-dependiente dicha actividad: a 10 nM la melatonina recupera un 20% la actividad del complejo I ( $P < 0.05$  frente a rotenona), y a 100 nM la recuperación de la actividad es de un 50% ( $P < 0.01$  frente a rotenona). A la dosis más alta utilizada (500 nM), la aMT prácticamente normaliza la actividad del complejo ( $P < 0.001$  frente a rotenona) (Figura 2).

Cabe destacar que la CsA no tiene ningún efecto significativo en la actividad del complejo I, ni es capaz de recuperarla cuando el cultivo se trata con el tóxico ( $P < 0.001$  frente al control).

## 2. EFECTOS DE LA MELATONINA Y LA CsA SOBRE LA BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL.

### 2.1. Producción de ATP y carga energética.

La disfunción en la cadena de transporte electrónico de la mitocondria lleva consigo una disminución de la producción de ATP.

La Tabla 3 presenta los valores intramitocondriales de los nucleótidos de adenina : el ATP es el más abundante en la organela, seguido de ADP y AMP. Cabe destacar que 100 nM de aMT aumenta significativamente los niveles de ATP en muestras control ( $P < 0.001$ ) y los de AMP, mientras que la dosis menor de aMT no tiene ningún efecto significativo en los niveles de nucleótidos con respecto al control. La CsA no altera significativamente los valores de ninguno de los nucleótidos.

El tratamiento con rotenona disminuye los niveles de los tres nucleótidos de adenina, siendo más significativo el descenso de ATP ( $P < 0.001$ ).



En presencia de rotenona, 100 nM de aMT recupera las concentraciones de ATP, y aunque parece que aumenta considerablemente la cantidad de ADP con respecto al control, no es un efecto significativo estadísticamente. A la dosis de 10 nM, la aMT aumenta los niveles ATP, que disminuyen su diferencia con respecto al control. Las muestras incubadas con CsA en presencia de rotenona, no muestran ninguna variación significativa en los niveles de AMP, ADP y ATP, cuyas concentraciones son muy similares a las obtenidas en la muestra tratada con rotenona (Tabla 3).

*Tabla 3.* **AMP, ADP y ATP intramitocondriales (µg/mg proteína)**

	AMP	ADP	ATP	AMP+ADP+ATP
Control	0.22 ± 0.06	0.34 ± 0.15	0.97 ± 0.17	1.53 ± 0.15
10 nM aMT	0.27 ± 0.15	0.41 ± 0.10	0.89 ± 0.12	1.57 ± 0.15
100 nM aMT	0.46 ± 0.10	0.63 ± 0.39	1.87 ± 0.15 <sup>***</sup>	2.95 ± 0.20 <sup>***</sup>
3 µM CsA	0.24 ± 0.15	0.77 ± 0.21	0.66 ± 0.31	1.66 ± 0.20
Rotenona	0.11 ± 0.06	0.15 ± 0.12	0.14 ± 0.06 <sup>***</sup>	0.39 ± 0.07 <sup>**</sup>
Rot + 10 nM aMT	0.27 ± 0.22	0.21 ± 0.13	0.24 ± 0.13 <sup>*</sup>	0.71 ± 0.20
Rot + 100 nM aMT	0.23 ± 0.18	0.72 ± 0.15	0.93 ± 0.10 <sup>##</sup>	1.87 ± 0.07 <sup>###</sup>
Rot + 3 µM CsA	0.09 ± 0.01	0.22 ± 0.08	0.15 ± 0.15 <sup>**</sup>	0.46 ± 0.30

Valores de AMP, ADP y ATP determinados por HPLC-UV en mitocondrias purificadas de células PC12 diferenciadas incubadas en presencia de rotenona (500 nM) y/o aMT (10 y 100 nM) y CsA (3 µM). \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 y \*\*\*P < 0.001 vs control; ##P < 0.01 vs rotenona.

En la tabla 3 también se representa la suma del total de nucleótidos de adenina presentes en la mitocondria, destacando el aumento del total de nucleótidos al tratar la muestra con aMT a 100 nM con respecto al control (P < 0.001), un marcado descenso de los mismos tras la incubación con rotenona (P < 0.01) y una recuperación del total de nucleótidos cuando se trata la muestra con 100 nM de aMT en presencia de rotenona, incluso por encima del valor del control.

Las concentraciones citosólicas de AMP, ADP y ATP siguen un orden inverso a las mitocondriales (**tabla 4**). En este caso, el es AMP el más abundante, seguido por ADP y ATP, cuya concentración en el citosol es muy reducida. La melatonina aumenta significativamente los valores de ATP citosólicos con respecto al control ( $P < 0.05$  y  $P < 0.01$  para 100 y 10 nM de aMT, respectivamente), mientras que los de AMP y ADP no sufren cambios considerables con respecto al control. El tratamiento con CsA aumenta significativamente las concentraciones citosólicas de los tres derivados de adenina: AMP ( $P < 0.001$ ), ADP ( $P < 0.05$ ) y ATP ( $P < 0.001$ ).

La presencia de rotenona en las muestras hace disminuir drásticamente los niveles de AMP, ADP y ATP con respecto a las muestras control ( $P < 0.001$ ); el tratamiento con aMT 10 nM no recupera estos valores, que siguen siendo muy bajos con respecto al control ( $P < 0.001$ ). Sin embargo, la dosis de 100 nM de aMT consigue incrementar levemente la concentración de los tres nucleótidos de adenina, aunque tan sólo aparecen diferencias significativas con respecto a tratamiento con rotenona en el caso de ADP y ATP ( $P < 0.05$ ). El tratamiento con CsA no da lugar a ningún cambio significativo en los niveles citosólicos de AMP, ADP y ATP con respecto a la muestra incubada sólo con rotenona (**Tabla 4**).

Al calcular la suma de nucleótidos de adenina en el citosol, puede observarse como se mantiene la misma tendencia en los resultados; el tratamiento con CsA aumenta de manera muy significativa el total de los nucleótidos con respecto al control ( $P < 0.001$ ), mientras que la incubación con rotenona los disminuye drásticamente ( $P < 0.001$ ), siendo solamente considerable la recuperación de los mismos ocasionada por el tratamiento con aMT 100 nM en presencia del tóxico ( $P < 0.05$ ), aunque aún muy por debajo del valor del control (**Tabla 4**).

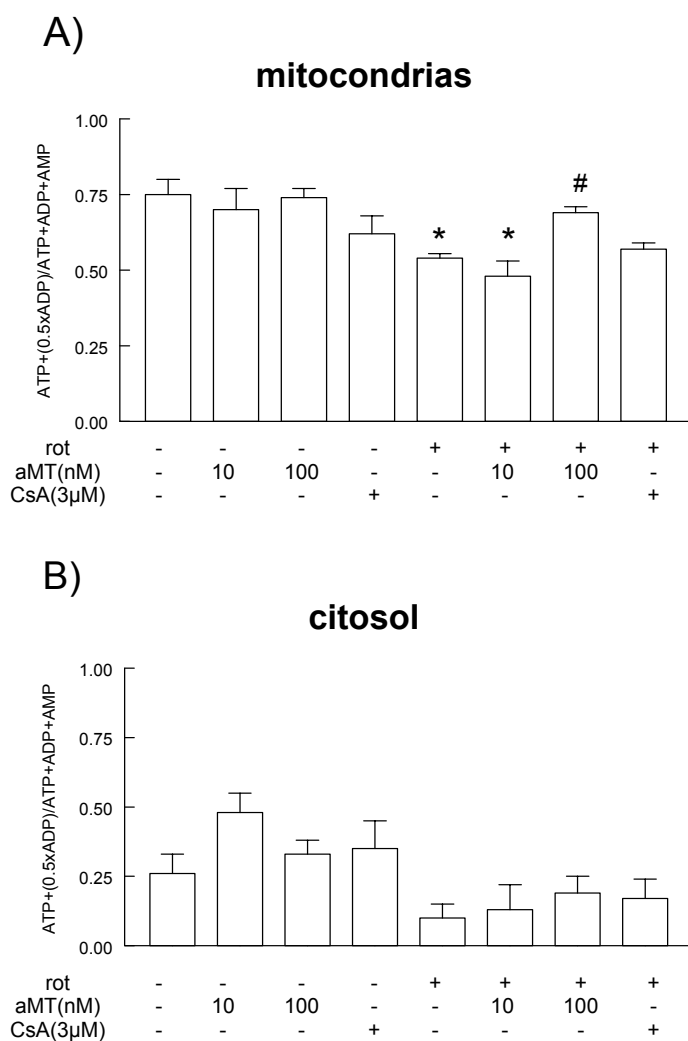
Tabla 4.

AMP, ADP y ATP citosólicos ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  proteína)

	AMP	ADP	ATP	AMP+ADP+ATP
Control	4.28 $\pm$ 0.26	3.24 $\pm$ 0.24	0.49 $\pm$ 0.13	8.01 $\pm$ 0.36
10 nM aMT	4.13 $\pm$ 0.17	3.02 $\pm$ 0.12	1.82 $\pm$ 0.22 <sup>***</sup>	8.97 $\pm$ 0.17
100 nM aMT	4.01 $\pm$ 0.27	3.43 $\pm$ 0.14	1.16 $\pm$ 0.11 <sup>**</sup>	8.60 $\pm$ 0.31
3 $\mu\text{M}$ CsA	6.42 $\pm$ 0.65 <sup>***</sup>	5.62 $\pm$ 0.35 <sup>***</sup>	2.10 $\pm$ 0.14 <sup>***</sup>	14.13 $\pm$ 0.74 <sup>***</sup>
Rotenona	1.31 $\pm$ 0.18 <sup>***</sup>	0.25 $\pm$ 0.12 <sup>***</sup>	0.04 $\pm$ 0.04 <sup>**</sup>	1.60 $\pm$ 0.22 <sup>***</sup>
Rot + 10 nM aMT	1.43 $\pm$ 0.07 <sup>***</sup>	0.36 $\pm$ 0.16 <sup>***</sup>	0.06 $\pm$ 0.08 <sup>**</sup>	1.85 $\pm$ 0.18 <sup>***</sup>
Rot + 100 nM aMT	2.47 $\pm$ 0.15 <sup>***</sup>	0.92 $\pm$ 0.14 <sup>***#</sup>	0.23 $\pm$ 0.08 <sup>*#</sup>	3.62 $\pm$ 0.24 <sup>***#</sup>
Rot + 3 $\mu\text{M}$ CsA	1.69 $\pm$ 0.30 <sup>***</sup>	0.58 $\pm$ 0.07 <sup>***</sup>	0.12 $\pm$ 0.06 <sup>*</sup>	2.39 $\pm$ 0.31 <sup>***</sup>

Valores de AMP, ADP y ATP determinados por HPLC-UV en citosol purificado de células PC12 diferenciadas incubadas en presencia de rotenona (500 nM) y/o aMT (10 y 100 nM) y CsA (3  $\mu\text{M}$ ). \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 y \*\*\*P < 0.001 vs control; # P < 0.05, ##P < 0.01 y ###P < 0.001 vs rotenona.

En la **Figura 3** se representa el valor de la carga energética mitocondrial y citosólica. La carga energética mitocondrial (**Figura 3.A**) no se altera en presencia de aMT, pero desciende ligeramente y de manera no significativa cuando se emplea CsA que, como hemos visto en la **Tabla 3**, induce un aumento de ADP y un ligero descenso de ATP. Cuando las mitocondrias se incuban con rotenona, se observa claramente un significativo descenso en la carga energética mitocondrial (P < 0.05 frente al control). Al tratar las muestras incubadas con rotenona con aMT 10 nM los niveles de AMP, ADP y ATP no se alteran significativamente, por lo que el índice de la carga energética es muy similar al de la muestra con rotenona únicamente; cuando se emplea la dosis de 100 nM de aMT en el cultivo con rotenona, tiene lugar un aumento de ATP, pero también de ADP (**Tabla 3**), por lo que la carga energética mitocondrial se recupera significativamente (P < 0.05), y alcanza un valor muy próximo al de la muestra control. El tratamiento con CsA no induce ningún cambio significativo en la carga energética de la mitocondria.



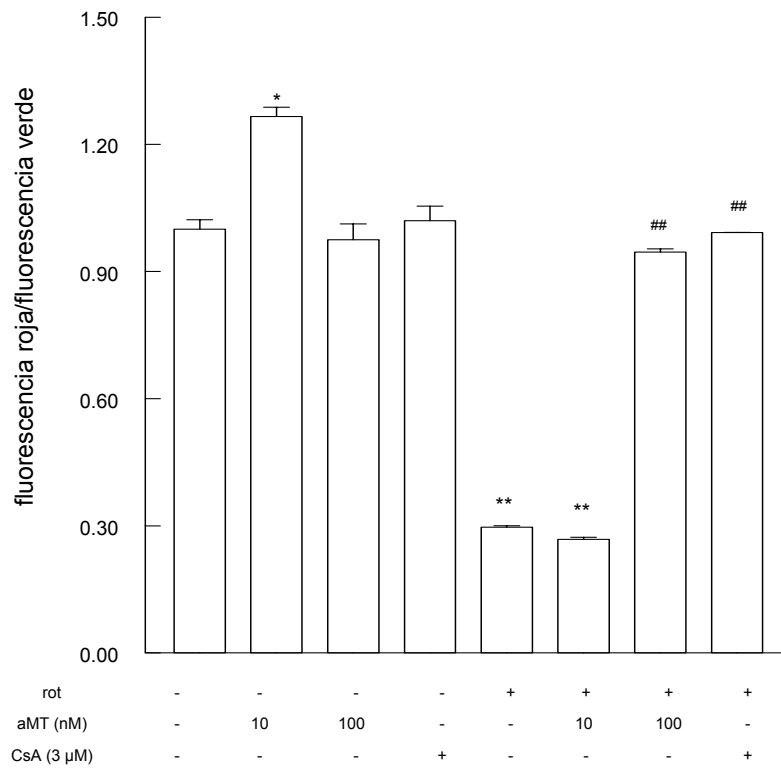
**Figura 3.** carga energética de mitocondrias (A) y citosol (B) de células PC12 diferenciadas incubadas en presencia de rotenona (500 nM) y/o aMT (10 y 100 nM y CsA (3 μM). \*P < 0.05 vs control y #P < 0.05 vs rotenona.

En cuanto a la carga energética del citosol, no se aprecian diferencias significativas (**Figura 3.B**) entre los distintos tratamientos; se observa un ligero aumento de la misma al tratar la muestra con aMT y un claro descenso en los casos en que el cultivo se incubaba en presencia de rotenona, pero estos cambios no llegan a ser estadísticamente significativos.

## 2.2. Potencial de membrana.

El potencial de la membrana de la mitocondria ( $\Delta\Psi_m$ ) aumenta levemente con respecto al control cuando las células se incuban con 10 nM de aMT ( $P < 0.05$ ) (**Figura 4**), sin embargo, a la concentración de 100 nM de aMT, el  $\Delta\Psi_m$  permanece en un estado similar al que presenta la muestra control. El tratamiento con CsA no altera el  $\Delta\Psi_m$  con respecto al control.

La rotenona causa un descenso significativo del  $\Delta\Psi_m$  ( $P < 0.001$ ) frente al mostrado por la muestra control. Esta caída en el  $\Delta\Psi_m$  no se restablece con el tratamiento de aMT 10 nM, que presenta un estado similar al de la muestra incubada solo con rotenona, con un descenso muy significativo con respecto al control ( $P < 0.001$ ). Por contra, el tratamiento con 100 nM de aMT en presencia de rotenona, consigue restablecer por completo el estado del  $\Delta\Psi_m$ , presentando un nivel semejante al del control ( $P < 0.001$  frente a rotenona). La CsA también restaura el nivel normal de  $\Delta\Psi_m$  cuando se incuban las células en presencia de rotenona ( $P < 0.001$ ).



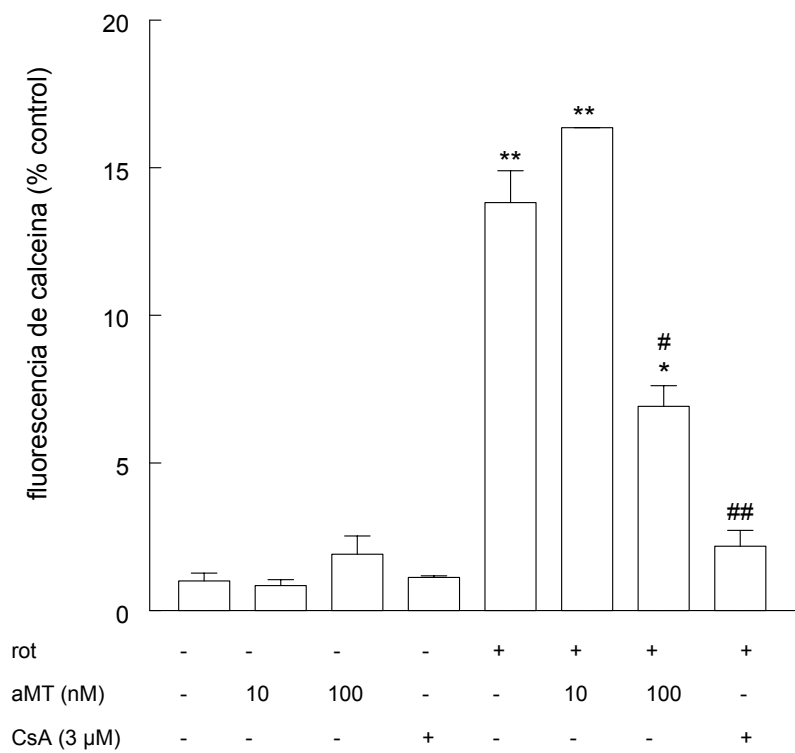
**Figura 4.** Potencial de membrana mitocondrial representado como cociente entre fluorescencia roja y fluorescencia verde emitidas por JC-1 en muestras de células PC12 diferenciadas, tratadas durante 24 horas con rotenona (500mM) y/o aMT (10, 100 nM) y CsA (3μM). \*P < 0.05, \*\*P < 0.001 vs control; ##P < 0.001 y ###P < 0.0001 vs rotenona.

### 2.3. Poro de transición.

La **Figura 5** representa la cinética del poro de transición de la mitocondria. Se puede observar cómo en este caso ni la melatonina (10 nM y 100nM) ni la CsA alteran de manera significativa la cinética del poro de transición en condiciones nomales, con respecto al control.

El tratamiento con rotenona aumenta drásticamente la fluorescencia emitida por la calceína, que refleja la apertura del poro, con respecto al control y a las tratadas con aMT y CsA en ausencia del tóxico ( $P < 0.001$ ).

Al igual que sucedía con el potencial de la membrana mitocondrial, 10 nM de aMT no impide la apertura del PTM inducida por rotenona ( $P < 0.001$  frente al control), mientras que la dosis de 100 nM de aMT disminuye parcialmente la cinética del PTM inducida por el tóxico ( $P < 0.05$ ). Este efecto es algo menos significativo que el que se aprecia en presencia de CsA, que inhibe con claridad la apertura del PTM ( $P < 0.01$ ).



**Figura 5.** Medida de la actividad del poro de transición mitocondrial por emisión de fluorescencia de la calceína en células PC12 diferenciadas, tratadas durante 24 horas con rotenona (500mM) y/o aMT (10, 100 nM) y CsA (3μM). Se representa la diferencia de fluorescencia emitida por la calceína en presencia de cloruro de cobalto sin y con ionomicina \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 vs control; # P < 0.05, ##P < 0.01 vs rotenona.

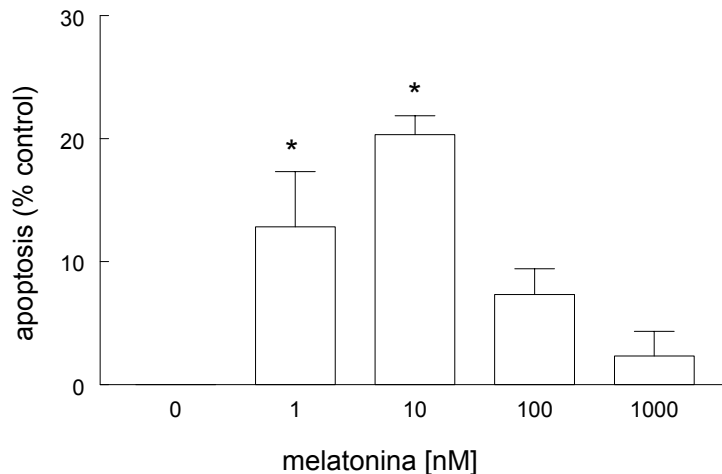


### 3. EFECTOS DE LA MELATONINA Y LA CsA SOBRE LA MUERTE CELULAR

#### 3.1. Apoptosis en células PC12 diferenciadas

El efecto de aMT sobre la apoptosis celular se determinó mediante citometría de flujo en células PC12 diferenciadas incubadas durante 24 horas con distintas concentraciones de aMT (1 nM, 10 nM, 100 nM y 1 mM).

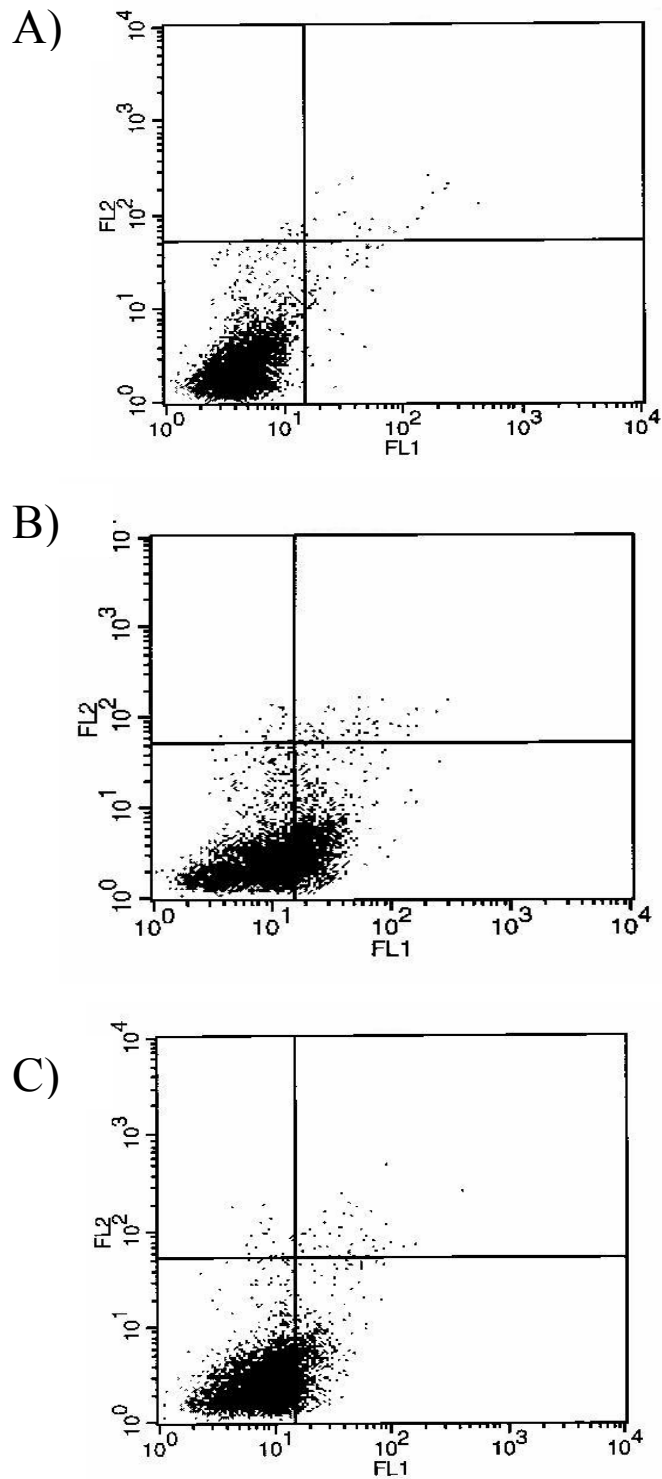
En la **Figura 6** se aprecia como existe un efecto diferente de aMT en la inducción de apoptosis según la concentración empleada; así a dosis muy bajas como 1 y 10 nM se observa un aumento significativo del porcentaje de células apoptóticas con respecto al control ( $P < 0.05$ ). Sin embargo al aumentar la concentración de la indolamina, el porcentaje de células apoptóticas disminuye a menos de un 10% con 100 nM de aMT, y es prácticamente inapreciable a concentraciones considerablemente elevadas como 1  $\mu\text{M}$ .



**Figura 6.** Porcentaje de células apoptóticas determinado por citometría de flujo en muestras de PC12 diferenciadas incubadas durante 24 horas con aMT (1-1000 nM) y tratadas con anexina V-FITC y PI. \* $P < 0.05$  vs control.

En la **Figura 7** se representan distintos diagramas de citometría de flujo obtenidos de muestras celulares de PC12 preparadas con anexina V-FITC y PI: **(A)** control, **(B)** incubadas con 500 nM de rotenona durante 24 horas y **(C)** pretratadas con 100 nM de aMT durante 3 horas e incubadas en presencia de rotenona y aMT 100 nM durante 24 horas.

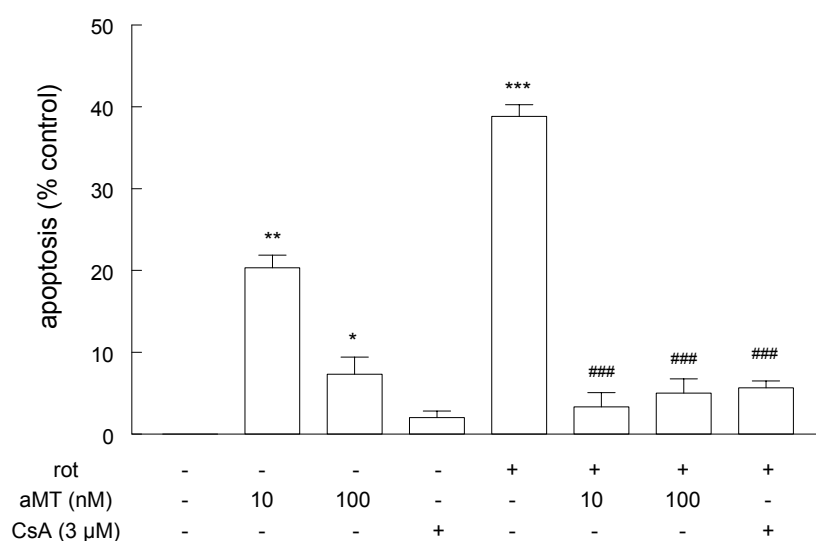
Se observan diferencias sustanciales entre los diagramas **(A)**, donde la gran mayoría de la población celular se concentra en el cuadrante inferior derecho (células viables) y **(B)**, donde parte de la población celular migra hacia el cuadrante inferior izquierdo representativo de las células que sufren apoptosis. En diagrama **(C)**, representa la citometría de una muestra incubada con rotenona y tratada con melatonina (100 nM); se observa cómo el desplazamiento de la población celular hacia el cuadrante apoptótico se ve reducido considerablemente.



**Figura 7.** Diagramas de citometría de flujo de células PC12 diferenciadas tratadas con anexina V-FITC y PI. (A) muestra control, (B) muestra incubada con rotenona 500 nM durante 24 horas y (C) muestra tratada con 100 nM de aMT e incubada en presencia de rotenona durante 24 horas,

La **Figura 8** representa el porcentaje de población apoptótica con respecto al control. Los resultados obtenidos indican que la aMT (en ausencia de rotenona) tiene un efecto proapoptótico considerable e inverso a la dosis de indolamina empleada ( $P < 0.001$  y  $P < 0.05$  frente al control para 10 y 100 nM de aMT, respectivamente). La CsA no presenta ninguna variación en cuanto a inducción de la apoptosis con respecto a al control.

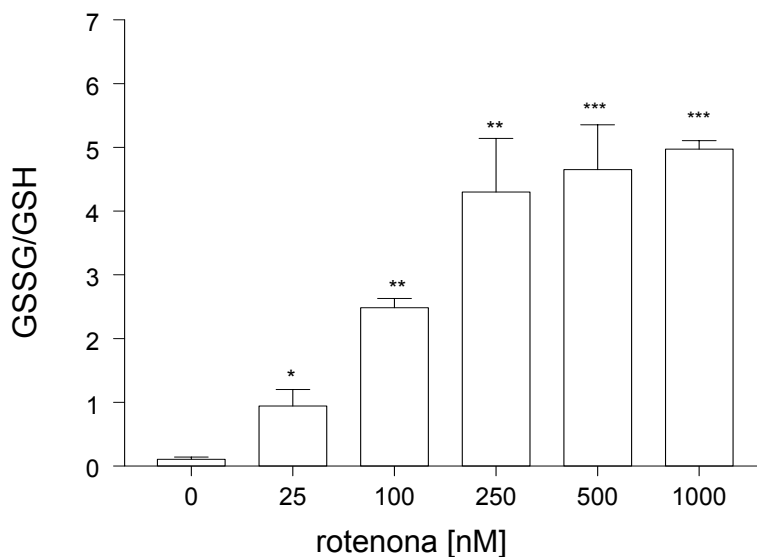
La rotenona induce aproximadamente un 40% de apoptosis en las células (38.83 %,  $P < 0.0001$  frente al control). La melatonina previene la muerte por apoptosis hasta dejar sus niveles muy próximos al valor control ( $3.33\% \pm 1.73$  y  $5.00\% \pm 1.75$  con respecto al control para 10 nM y 100 nM de aMT respectivamente en muestras incubadas en presencia de rotenona ( $P < 0.001$ ). Lo mismo sucede con CsA, que previene la apoptosis de forma muy significativa ( $P < 0.001$ ).



**Figura 8.** Porcentaje de células apoptóticas determinado por citometría de flujo en muestras de PC12 diferenciadas incubadas durante 24 horas con rotenona (500 nM) y/o aMT (10, 100 y 500 nM) y CsA (3 μM) y tratadas con anexina V-FITC y PI. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  y \*\*\* $P < 0.001$  vs control; ### $P < 0.001$  vs rotenona.

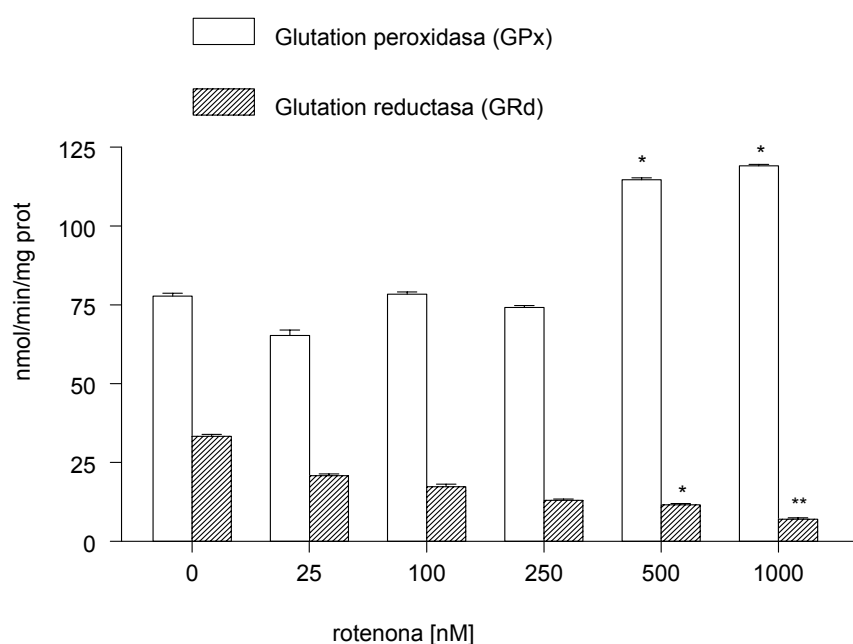
#### 4. EFECTOS DE LA MELATONINA Y LA CsA SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN LAS CÉLULAS PC12.

La Figura 9 muestra una curva dosis-respuesta del índice GSSG/GSH en células PC12 diferenciadas cuando se incuban durante 24 horas con concentraciones crecientes de rotenona (0, 25, 100, 250, 500 y 1000 nM). En ausencia de rotenona (muestra control), el nivel de GSSG es prácticamente inexistente, estando la mayoría del glutatión en su forma reducida, por lo que el índice GSSG/GSH es muy bajo. Se observa un efecto dosis-dependiente de la rotenona sobre la relación GSSG/GSH, donde a medida aumenta la concentración del neurotóxico, el nivel de GSSG va aumentando en detrimento del GSH. Con 25 nM de rotenona, ya es significativo el aumento del índice GSSG/GSH ( $P < 0.05$ ), siendo mayor a medida que aumenta la concentración de rotenona ( $P < 0.0001$  para 500 y 1000 nM de rotenona).



**Figura 9.** Representación del índice GSSG/GSH de células PC12 diferenciadas incubadas durante 24 horas con rotenona (25, 100, 250, 500, 1000 nM). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  y \*\*\* $P < 0.001$  vs control.

Para evaluar el comportamiento del sistema del glutatión en presencia de rotenona, se determinó, además del índice GSSG/GSH, la actividad de los enzimas implicados en la oxido-reducción del glutatión, la glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GRd). En la **Figura 10** observamos la actividad de ambas enzimas en las células PC12 diferenciadas en función de la concentración de rotenona empleada, tras 24 horas de incubación. A concentraciones de rotenona inferiores a 500 nM, la actividad de la GPx no sufre modificaciones importantes con respecto al control, por encima de 500 nM, la actividad de la GPx aumenta significativamente (500 nM y 1  $\mu$ M,  $P < 0.05$ ). La Figura 10 muestra asimismo cómo la actividad de la GRd disminuye de manera dosis-dependiente con la rotenona. La actividad de la GRd desciende a más de la mitad cuando se incuban las células con 500 nM de rotenona ( $P < 0.05$ ) y se reduce drásticamente con 1  $\mu$ M de rotenona ( $P < 0.01$ ).



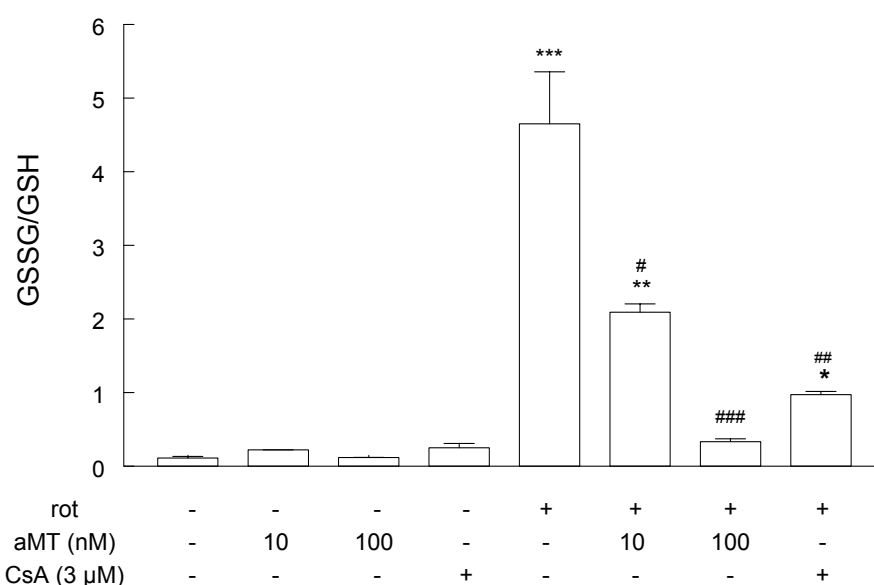
**Figura 10.** Actividad de los enzimas glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GRd) de cultivos de células PC12 diferenciadas incubadas durante 24 horas con rotenona (25, 100, 250, 500, 1000 nM). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control.

La **figura 11** muestra el cociente GSSG/GSH de las células PC12 incubadas en presencia de aMT, CsA, rotenona y el efecto de aMT y CsA en cultivos tratados con 500 nM de rotenona.

En ausencia de rotenona, ni aMT, ni CsA tienen ningún efecto aparente en los niveles de glutatión celulares, y el índice GSSG/GSH permanece en un estado similar al del control.

Al incubar las células con 500 nM de rotenona durante 24 horas, el índice GSSG/GSH aumenta drásticamente ( $P < 0.001$ ) como resultado de un aumento de la forma oxidada del glutatión con respecto a la reducida.

El tratamiento con aMT de las células incubadas con 500 nM de rotenona recupera el índice GSSG/GSH (**Figura 11**); A dosis de 10 nM de aMT cociente GSSG/GSH disminuye a más de la mitad con respecto a la muestra incubada solo con rotenona ( $P < 0.05$ ). El índice GSSG/GSH se recupera por completo al tratar la muestra con aMT 100 nM ( $P < 0.001$  frente a rotenona) y muestra un nivel similar al presentado por el control. El tratamiento con CsA también resulta efectivo para recuperar el índice de GSSG/GSH de las células incubadas con rotenona ( $P < 0.01$ ), aunque su efecto es menor que el indicado anteriormente por la aMT.



**Figura 11.** Representación del índice GSSG/GSH de células PC12 diferenciadas, tratadas durante 24 horas con rotenona (500 nM) y/o aMT (10, 100 nM) y CsA (3 μM). \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 y \*\*\*P < 0.001 vs control; # P < 0.05, y ###P < 0.001 vs rotenona.

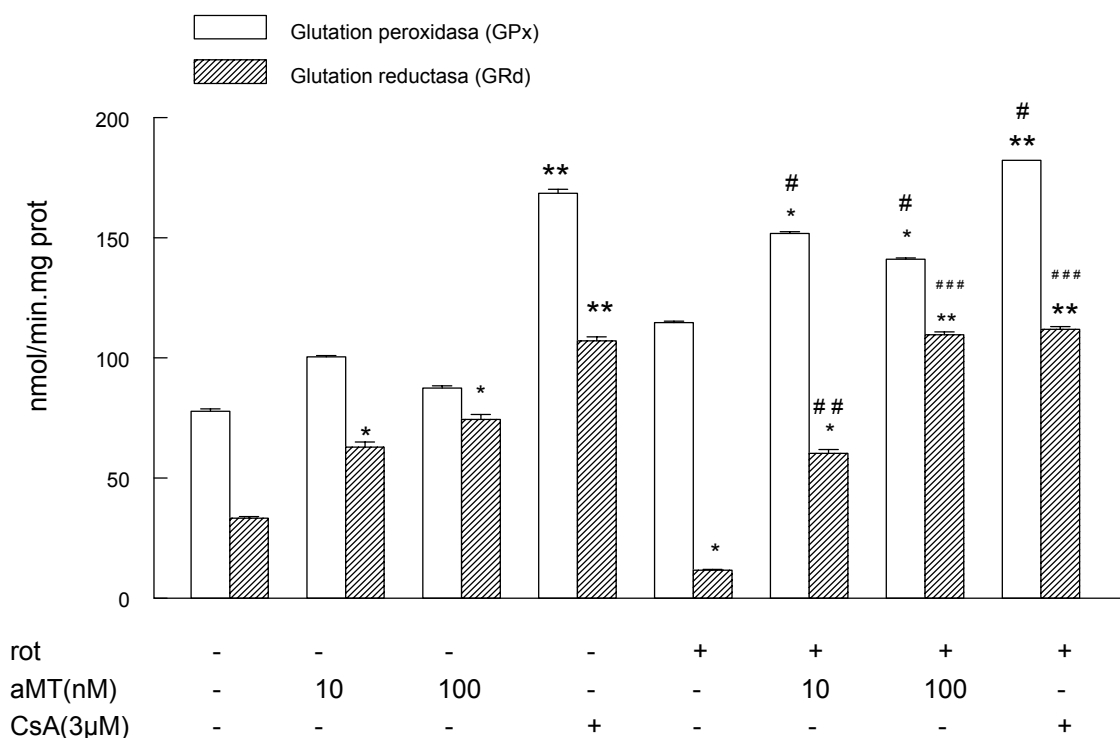
En cuanto a la actividad de los enzimas implicados en el ciclo del glutatión la **figura 12** muestra como el tratamiento con aMT hace aumentar claramente la actividad de la GRd con respecto al control (P < 0.05), tanto con aMT a 10 nM como a 100 nM. En cuanto a la GPx, su actividad no se ve significativamente alterada cuando se trata el cultivo con aMT. Un efecto más remarcado se observa cuando se incuban las células con CsA, que induce una activación considerable de ambas enzimas (P < 0.01) con respecto al control.

A la dosis empleada de rotenona (500 nM), la actividad de la GPx no se ve alterada de manera significativa con respecto al control, mientras que la actividad de la GRd desciende considerablemente tras la incubación con el tóxico (P < 0.05).



Tras el tratamiento con 10 nM de aMT, las células incubadas con rotenona aumentan claramente la actividad de ambas enzimas ( $P < 0.05$  con respecto a la rotenona para la GPx;  $P < 0.001$  con respecto a la rotenona para la GRd). Al aumentar la dosis de aMT a 100 nM, la actividad de la GPx se mantiene elevada ( $P < 0.05$  frente a la rotenona), mientras que se observa un incremento muy significativo en la actividad de la GRd ( $P < 0.001$  frente a rotenona) en estas condiciones.

El tratamiento con CsA muestra un efecto similar al de 100 nM de aMT para la GRd ( $P < 0.0001$  frente a rotenona) y ligeramente mayor para la GPx, cuya actividad es algo mayor de la presentada tras el tratamiento con la indolamina ( $P < 0.05$  frente a la rotenona;  $P < 0.01$  frente al control).



**Figura 12.** Actividad de los enzimas glutathione peroxidasa (GPx) y glutathione reductasa (GRd) de cultivos de células PC12 diferenciadas incubadas durante 24 horas con rotenona (500 mM) y/o aMT (10, 100 nM) y CsA (3 μM). \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 y \*\*\*P < 0.001 vs control; # P < 0.05, ###P < 0.01 y ####P < 0.001 vs rotenona.

# DISCUSIÓN



## 1. MODELO EXPERIMENTAL.

En este trabajo se ha utilizado un modelo experimental de EP, que ha consistido en células PC12 diferenciadas con NGF y tratadas con rotenona, que reproduce algunas de las características bioquímicas y fisopatológicas más importantes encontradas en pacientes que desarrollan la enfermedad (Parker, 1989; Shapira 1989; Menegon 1998; Greenamyre, 2003).

El sustrato patológico de las anomalías clínicas y farmacológicas que caracterizan la EP es la muerte de las células dopaminérgicas de la sustancia negra *pars compacta* (Greenfield y Bosanquet, 1953), aunque los síntomas de esta enfermedad no comienzan a ser aparentes hasta que se encuentra dañada más del 50% de esta población neuronal (Heinz, 1993). Las células PC12 son catecolaminérgicas que en respuesta al NGF adoptan morfología neuronal, lo que hace que se trate de un modelo muy útil para nuestro estudio. El tratamiento con NGF no afecta a la liberación, almacenamiento o recaptación de catecolaminas, aunque aumenta la excitabilidad eléctrica y la sensibilidad a acetilcolina, provocando que las células diferenciadas sean más susceptibles al daño inducido por rotenona que las no diferenciadas (Wang y cols, 2005).

En nuestro caso, los resultados obtenidos al incubar células PC12 diferenciadas con NGF con rotenona durante 24 horas, indican que la viabilidad celular desciende al aumentar la dosis del neurotóxico. A partir de una dosis de 10 nM, ya comienza a apreciarse una tendencia descendente en la viabilidad celular. A dosis más altas, 1  $\mu$ M, la rotenona induce una pérdida de la viabilidad celular del 50% del cultivo, y casi del 80% con 10  $\mu$ M. En general, los resultados de otros autores son similares, y encuentran efectos sobre la viabilidad celular a concentraciones de rotenona entre 50 nM-5 $\mu$ M cuando las células se tratan durante 24 horas (Wang y cols, 2005). En otros casos, sin embargo son necesarios tratamientos crónicos con dosis elevadas

para poder conseguir un efecto claro sobre la muerte de las células PC12, debido a que se trata de células PC12 no diferenciadas (Tai y Troung, 2002; Tai y cols 2003; Liu y cols, 2005).

La muerte de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra pars compacta, induce un descenso considerable de los niveles de DA estriatales, responsable como hemos dicho de las anomalías típicas de la EP. Además, todo esto va acompañado de un aumento de la DA extracelular debido a un descenso en la funcionalidad del transportador de DA, lo que impide su recaptación. Esta DA extracelular sufre lo que se conoce como autooxidación, dando lugar a un aumento en la producción de ROS y, por tanto, a una aceleración en el proceso de muerte neuronal (Schwarz, 2003). Nuestros resultados indican una drástica reducción de DA intracelular en cultivos de PC12 diferenciadas incubados con rotenona y de su principal metabolito, el DOPAC, así como un ligero aumento en la DA extracelular. Estos resultados confirman otros datos publicados con anterioridad, en los que se comprueba que la rotenona favorece la liberación de catecolaminas en cultivos de PC12 (Taylor y cols, 2000). En este mismo estudio se demostró que la acumulación de DA extracelular tras el tratamiento con rotenona se debe a un aumento de la secreción de DA por exocitosis, dependiente de calcio (Taylor y cols, 2000), aunque otros estudios posteriores llegaron a la conclusión de que además tiene lugar un descenso en la actividad del transportador de DA debido a una inhibición no competitiva del mismo (Marangos y cols., 2002). Por otro lado, el aumento en la producción de radicales libres inducido por la autooxidación de la DA puede dañar la proteína del transportador de DA, dando lugar a un círculo vicioso que implica un mayor aumento de DA extracelular y producción de radicales libres (Marangos y cols., 2002).

Las células PC12 diferenciadas son grandes productoras y almacenadoras de DA, sus vesículas son fácilmente visibles al microscopio y contienen la mayor parte de la DA producida. De modo que la concentración de DA encontrada en el interior celular es muy elevada en comparación con la de sus metabolitos,

DOPAC y HVA. El DOPAC procede de la acción directa de la MAO (localizada en la membrana externa de la mitocondria) sobre la DA y posterior deshidrogenación del metabolito intermedio. Vía COMT, el DOPAC se transforma directamente en HVA dentro de la célula (Webber y McDonald, 1993; Landsberg y Young, 1994). La presencia de DA en las neuronas nigroestriatales puede constituir un factor de riesgo que aumente su vulnerabilidad a determinados tóxicos. Este hecho se ha demostrado en este modelo de células PC12 diferenciadas con NGF, en el que la inhibición de la producción endógena de DA reduce considerablemente muerte celular inducida por la rotenona (Liu HQ y cols, 2005).

La toxicidad de la rotenona se debe a su interacción directa con el complejo I de la CTE (Betarbet y cols, 2000; Sherer y cols, 2003; Greenamyre y cols, 2003). La rotenona se une al enzima en el punto de mayor potencial de los centros Fe-S, antes del sitio del coenzima Q, evitando la transferencia de electrones del centro Fe-S al coenzima Q (Ramsay y cols, 1991). Dicha interacción induce la pérdida de los electrones que debían ser transportados desde el NADH a la ubiquinona, en su lugar de reducción (Hensley y cols, 1998; Kushnareva y cols, 2002). Una inhibición parcial del complejo I por rotenona, favorece la transferencia de electrones al complejo II y, como consecuencia, un incremento en la producción de anión superóxido (de hasta cuatro veces superior que si los electrones se canalizan vía complejo I) (Prior, 1982; Barrientos y Moraes, 1999). Otro agente tóxico, el MPP<sup>+</sup> (forma activo del MPTP) compite por el mismo sitio de inhibición del complejo I que la rotenona (Cassarino y cols, 1999), aunque depende de los mecanismos de recaptación de la DA para entrar en la célula y actuar sobre la mitocondria (Betarbet y cols, 2000; Jenner, 2001; di Monte, 2003). A diferencia del MPP<sup>+</sup>, la rotenona causa una inhibición ubicua del complejo I, pero sólo provoca la degeneración en la sustancia negra (y en algún grado en el locus coeruleus) (Jenner, 2001). Ambas toxinas inducen la muerte de neuronas dopaminérgicas adyacentes al área tegmental ventral, de modo que parece que las neuronas de la sustancia negra podrían ser especialmente vulnerables a la inhibición del complejo I (Betarbet y cols, 2002; Jenner, 2002). El paraquat, pesticida de

similar estructura química que el MPP<sup>+</sup>, genera, por su parte, un aumento de ROS en la mitocondria a través de dos caminos, (i) reacciones cíclicas de oxidación-reducción entre el paraquat y oxígeno molecular y (ii) formación de aniones superóxidos de manera NADH-dependiente (McCormak y cols, 2002).

En nuestro caso, una dosis de rotenona de 500 nM produce una inhibición total de la actividad complejo I de la CTE. La interrupción en el normal funcionamiento de la CTE induce una producción elevada de ROS originada por los electrones que se escapan del complejo I al reaccionar con el oxígeno molecular presente, afectando al funcionamiento del resto de la cadena respiratoria y al proceso de fosforilación oxidativa. La reducción parcial del oxígeno molecular da lugar a anión radical superóxido, el cual pasa a peróxido de hidrógeno y posteriormente a radical hidroxilo cuando capta dos electrones consecutivamente, siendo este último el principal responsable del daño oxidativo posterior. Este argumento queda respaldado con los resultados publicados en los últimos años, donde el tratamiento con rotenona induce la generación de ROS y la consecuente disfunción en el resto de los componentes de la CTE, tanto en mitocondrias aisladas de tejido neuronal (Kushnareva, 2002), como en cultivos celulares (Barrientos y Moraes, 1999; Shamoto-Nagai, 2003).

En este trabajo, para ver el efecto de la rotenona sobre el estrés oxidativo, realizamos estudios dosis-respuesta de rotenona evaluando los niveles de GSH y GSSG celular y las actividades de los enzimas GPx y GRd. Aunque el GSH no es la única molécula antioxidante que se ve alterada en la EP, la magnitud del descenso de los niveles de GSH parece ir paralela a la severidad de la enfermedad y está considerado como el primer marcador de estrés oxidativo en la EP presintomática (Jha y cols, 2000). El GSH es el principal componente celular encargado de mantener los grupos sulfidrilos de las proteínas en su estado reducido y de regular la actividad de enzimas tiol-dependientes, entre ellas la NADH-deshidrogenasa del complejo I (Balijepalli y cols, 1999; Jha y

cols, 2000). Para proteger a las proteínas de la oxidación, este tripéptido forma aductos de la forma '*proteína-SS-GSH*', los cuales pueden ser re-reducidos a proteínas por acción de la GRd (Ravindranath y Reed, 1990; Jung y thomas, 1996). Nuestros resultados revelan que la rotenona induce un aumento en la relación GSSG/GSH, y un descenso en la actividad de la GRd a dosis en las que la viabilidad celular se mantiene cercana a un 80% con respecto al control (500 nM). A concentraciones mayores de rotenona, el índice GSSG/GSH se mantiene elevado, mientras que la inhibición de la GRd se hace aún más patente. Esta disminución en la actividad de la GRd va acompañada, sin embargo, de un aumento en la actividad del otro enzima del ciclo del GSH, la GPx. Este hecho se explica fácilmente teniendo en cuenta la función del enzima y las condiciones de estrés oxidativo presentes en la célula; la GRd cataliza la reducción de GSSG a GSH, para asegurar el mantenimiento del almacén celular de GSH y para lo cual necesita la presencia de NADPH. En condiciones normales, la célula no tiene problema para aportar este coenzima y permitir que el ciclo siga su curso, pero en una situación en la que la presencia de radicales libres está incrementada, aumenta la generación de GSSG a costa del GSH, que intenta reducir a los peróxidos formados por acción de la GPx. De esta manera se desequilibra la relación entre GSSG/GSH aumentando progresivamente la concentración de GSSG con respecto a GSH. La presencia de radicales libres afecta directamente a la GRd, que es muy vulnerable al estrés oxidativo y se daña irreversiblemente por las ROS generadas en estas condiciones, donde existen grandes dificultades para reciclar el GSH.

En el sistema nervioso el GSH desempeña un importante papel, tanto como antioxidante, como modulador del estados redox, y su disminución como consecuencia de la inhibición del complejo I, está íntimamente relacionada con la subsecuente disfunción mitocondrial que conduce en última estancia a la muerte de las neuronas dopaminérgicas asociadas a la EP (Jha y cols, 2000; Bharath y Andersen, 2005). El descenso en los niveles de GSH se ha correlacionado también con un aumento en los niveles de calcio intracelular y



muerte celular mediada por una inhibición de la Na/K-ATPasa (Octavian y cols., 1997). En células PC12 en las que se ha inducido una inhibición de los niveles de GSH tras la inhibición de la glutamil-cisteina sintetasa, se observa un aumento de los niveles de ROS, que da lugar a una inhibición selectiva del complejo I de la CTE. Según esto, se puede concluir que tanto la inhibición del complejo I de la cadena de transporte electrónico como la reducción de los niveles de GSH pueden dar lugar a la inducción de ROS que conducen a un ciclo que trae como consecuencia la muerte de la célula dopaminérgica (Jha y cols., 2000).

Nuestros resultados muestran como, tras la inhibición del complejo I, la concentración de ATP mitocondrial desciende considerablemente, comprometiendo el estado bioenergético de la célula. Sin embargo, la concentración de ADP intramitocondrial no cambia de forma significativa con respecto al control después del tratamiento con rotenona. Esto hace que la carga energética baje dentro de la mitocondria, mientras que en el citosol, aunque baja, el cambio que se produce no es significativo con respecto al control. Algo similar ocurre en líneas de neuroblastoma SH-SY5Y, donde se observa un descenso en los niveles de ATP celular en función del tiempo de exposición a la rotenona (Shamoto-Nagai y cols, 2003) y en cultivos primarios de mesencéfalo, donde además desciende la función proteosomal de la ubiquitina (proceso dependiente de ATP) tras exposiciones crónicas y agudas a rotenona (Zeevalk y Bernard, 2005). Por otro lado y, como ya hemos señalado con anterioridad, se ha sugerido que el estrés oxidativo daña los transportadores de DA celulares, que además disminuyen su función cuando hay una carencia significativa en la producción de ATP, ya que la recaptación de DA por parte de la célula es un proceso dependiente de energía (Fonck y Baudry, 2003). Esto explica que, tras incubar el cultivo con rotenona, la concentración de DA en el medio extracelular aumente con respecto a la muestra control no tratada. En concordancia con estos resultados, se ha observado que en situaciones de hipoxia intermitente, donde la producción de

ROS es importante, también aumenta la liberación o presencia de DA en el medio extracelular (Kim y cols, 2004).

Otro cambio crucial que tiene lugar en la mitocondria de células sometidas a estrés oxidativo es el descenso en el  $\Delta\Psi_m$  (Zamzami y cols., 1996; Zamzami y Kroemer, 2001), que a su vez puede inducir la formación de más radicales libres (Zamzami y Kroemer, 2001). La medida de respiración celular, realizada con poblaciones de células enteras, ha mostrado que un descenso en el  $\Delta\Psi_m$  puede correlacionarse, tal y como era de esperar, con desacoplamiento de la CTE y descenso en la producción de ATP mitocondrial (Leist y cols, 1997). Parece ser que cambios importantes en el balance energético (ausencia de oxígeno, descenso de los niveles de ATP, descenso de los niveles de NADH y descenso en el  $\Delta\Psi_m$ ) o cambios en el equilibrio redox (oxidación/reducción de los niveles de GSH, aumento de RNS/ROS) de la célula, pueden dar lugar a permeabilización de la membrana mitocondrial y apertura del PTM (Zamzami y Kroemer, 2001). Si el PTM permanece abierto, los niveles de ATP pueden caer totalmente, conduciendo a la muerte de la célula por necrosis. Sin embargo, la apertura transitoria del poro puede conducir a la muerte por apoptosis a través de la vía intrínseca o mitocondrial, con la consiguiente liberación de moléculas de pequeño tamaño (<1500 Da) al citosol de la célula (Zamzami y Kroemer, 2001; León y cols, 2005). Por lo tanto, las fases iniciales de ambos modos de muerte celular pueden implicar la apertura del PTM aunque las cascadas de señalización posteriores son diferentes. Además, necrosis y apoptosis pueden suceder simultáneamente en tejidos o cultivos celulares expuestos al mismo estímulo y la prevalencia de una u otra depende de la concentración del tóxico utilizado, aunque puede variar de un experimento a otro (Bonfoco y cols, 1995).

A la dosis utilizada para nuestros experimentos (500 nM), la rotenona induce descenso del  $\Delta\Psi_m$  que conduce a apertura del PTM y muerte celular por apoptosis. En modelos experimentales similares, se sugiere que la apoptosis inducida por la rotenona en células PC12 se debe a la generación de radicales

libres y que además está potenciada por la propia auto-oxidación de la DA, puesto que al tratar el cultivo con reserpina (inhibidor de la síntesis de DA), la producción de ROS y la apoptosis inducida por la rotenona se reducen (Liu y cols, 2005).

## **2. PAPEL PROTECTOR DE LA MELATONINA EN EL MODELO DE PARKINSON INDUCIDO POR ROTENONA EN CÉLULAS PC12.**

Como objetivo principal de este trabajo, nos planteamos demostrar el papel protector de la melatonina en el modelo de EP descrito. Para ello se han empleado dos dosis de melatonina (10 nM y 100 nM), superiores a los niveles fisiológicos de la indolamina en plasma (1 nM en el pico nocturno de melatonina), aunque menores que los niveles encontrados para la indolamina en los tejidos estudiados hasta el momento (rango  $\mu\text{M}$ ) (Reiter y Tan, 2003b). También se ha realizado un estudio comparativo con CsA, un inhibidor selectivo de la apertura del PTM a una concentración (3  $\mu\text{M}$ ) a la que no causa efecto tóxico en los cultivos (Seaton y cols, 1998) y que impide la liberación de citocromo *c* y la activación de caspasa 3 en condiciones de estrés oxidativo (Bal-Price y Brown, 2000).

Según nuestros resultados, la melatonina recupera, tanto a 10 como a 100 nM, la viabilidad de las células tratadas de forma significativa (con respecto a la rotenona) y a todas las dosis de rotenona estudiadas. Sin embargo, tan sólo la melatonina a 100 nM fue capaz de recuperar totalmente la viabilidad hasta los niveles del control a la dosis más alta de rotenona (10  $\mu\text{M}$ ). En el caso de la CsA, los resultados son comparables a los obtenidos con melatonina 10 nM.

Aunque se produce una recuperación de la viabilidad en las células tratadas con 500 nM de rotenona tras el tratamiento con melatonina 10 ó 100 nM, no se produce recuperación de los niveles de catecolaminas intracelulares. Tan sólo se observa un ligero aumento de DA y DOPAC tras el tratamiento con

melatonina 100 nM, pero no existen diferencias significativas con respecto al tratamiento con el neurotóxico sólo. El cotratamiento con CsA tampoco tiene ningún efecto significativo sobre los niveles de catecolaminas intracelulares. Con respecto a los resultados obtenidos con los niveles de catecolaminas extracelulares, ni la melatonina (a ninguna de las dos dosis utilizadas) ni la CsA recupera sus niveles hasta los del el control. Estos resultados obtenidos para la melatonina en este modelo son parecidos a los encontrados en otro modelo de EP en ratones de la cepa C57Bl/6 tratados con MPP<sup>+</sup>, en el que la melatonina recupera la viabilidad de las neuronas tiroxina hidroxilasa positivas (Acuña-Castroviejo y cols, 1996) pero es incapaz de restablecer los niveles de catecolaminas estriatales (Khaldy y cols, 2003).

Cabe destacar el efecto que melatonina o CsA inducen sobre los niveles de catecolaminas intracelulares cuando se utilizan sin rotenona y a las mismas dosis y durante el mismo tiempo antes descritos. Como puede observarse, la melatonina ejerce efectos diferentes dependiendo de la dosis: 10 nM induce un aumento de los niveles de DA intracelulares, mientras que 100 nM de melatonina produce todo lo contrario. Trabajos publicados con anterioridad han demostrado que la melatonina actúa en el SNC y periférico modulando la liberación de DA, encontrándose altos niveles del neurotransmisor durante el día y bajos durante la noche (Zisapel, 2001; Khaldy y cols, 2003). En estriado de rata, la indolamina tiene efectos antidopaminérgicos y el uso de sulpiride (antagonista D<sub>2</sub>) bloquea la inhibición de la respuesta excitadora de las neuronas estriatales a la estimulación cortical (Escames y cols, 1996, 2001). En cuanto a la CsA, Tavares y colaboradores han demostrado que induce la liberación de DA y sus metabolitos de las terminales nerviosas simpáticas actuando directamente sobre el transportador de catecolaminas (Tavares y cols, 2003), lo que explicaría el descenso que produce sobre las catecolaminas intracelulares y el consecuente aumento de las liberadas al medio extracelular.

Nuestros resultados muestran cómo la melatonina recupera la actividad del complejo I mitocondrial inhibido por la rotenona. El restablecimiento de la actividad del complejo I es mayor cuanto más alta es la dosis de melatonina empleada. Así, con melatonina 10 nM se observa una leve recuperación, mientras que dosis mayores de la indolamina (100 nM y 500 nM) revierten el efecto inhibitorio de la rotenona en un 50 y 80% respectivamente. Otros resultados publicados con anterioridad muestran que la melatonina recupera los niveles de complejo I mitocondrial tanto en mitocondrias aisladas de hígado y tratadas con MPP<sup>+</sup> (Absi y cols, 2000) como en roedores (Dabeni-Sala y cols., 2001; Khaldy y cols, 2003). En los experimentos realizados con ratas tratadas con 6-hidroxidopamina, también se recupera la actividad motora normal tras el tratamiento con melatonina, lo que indica que, en este modelo, esta disfunción está asociada a la inhibición del complejo I de la CTE (León y cols, 2004; Dabeni-Sala y cols., 2001; Khaldy y cols, 2003). La CsA no presenta ningún efecto sobre el complejo I cuando se utiliza sola o con rotenona.

Un gran número de estudios previos, realizados en éste y otros laboratorios, demuestran un papel protector y estimulante de la melatonina sobre la CTE mitocondrial en concordancia con nuestros resultados. Estos datos sugieren, que la melatonina ejerce un papel protector, no sólo como depurador de radicales libres causados por agentes prooxidantes (Martín y cols, 2000b; Tan y cols, 2000; Acuña-Castroviejo y cols, 2003; Escames y cols, 2003), sino también por una acción directa sobre los complejos de la CTE (Acuña-Castroviejo y cols, 2001; Martín y cols, 2002; León y cols, 2004). En nuestro caso, las dosis utilizadas de melatonina no han sido suficientes para estimular por sí solas la actividad del complejo I, tal y como se ha demostrado en tales modelos. El mecanismo mediante el cual la melatonina aumenta la actividad del complejo I no es del todo conocido. El elevado potencial redox de la melatonina (0.74 V) (Tan y cols, 2000), sugiere que ésta puede actuar como donante y aceptor de electrones entre los distintos complejos, aumentando así el flujo electrónico de la cadena, efecto que no poseen otros

antioxidantes (Martín y cols, 2002). Recientemente se ha demostrado que la melatonina aumenta la actividad del complejo I gracias a que es capaz de recuperar los niveles de NADH, precisamente a través de la cesión de electrones, aunque no al complejo I directamente, sino al NAD<sup>+</sup> (Tan y cols, 2005).

La pérdida en la actividad de la CTE, se traduce a nivel bioenergético en un descenso en la síntesis de ATP. La inhibición del complejo I conlleva un escape de electrones que reducen parcialmente al oxígeno molecular presente formando ROS, que a su vez van a dañar a los otros complejos de la cadena, en especial al complejo IV, muy vulnerable al estrés oxidativo. En condiciones fisiológicas el complejo IV se regula por el NO, que compite por el oxígeno en su sitio de unión a este complejo (Bóveris y cols, 2000; Brown, 2001). Así, la producción basal de ROS en la mitocondria se encuentra regulada por el NO endógeno, que modula el consumo de oxígeno a nivel de la citocromo *c* oxidasa (Sarkela y cols, 2001). Sin embargo, en condiciones patológicas con presencia de elevadas concentraciones de ROS, el NO reacciona para formar ONOO<sup>-</sup>, un radical de nitrógeno que daña irreversiblemente todos los complejos de la CTE (Brown, 1999; Brown, 2001).

En estas condiciones, con los complejos de la CTE dañados, el acoplamiento entre el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa está alterado. El complejo V se sirve de la fuerza protón motriz asociada al gradiente de protones bombeados desde los complejos mitocondriales, para sintetizar ATP a partir de ADP y Pi (Mitchell y Moyle, 1967). Además, el gradiente de protones a través de la membrana permite el establecimiento de una diferencia de potencial a ambos lados de las membranas mitocondriales ( $\Delta\Psi_m$ ) esencial para mantener su integridad y funcionalidad del orgánulo. De modo que la inhibición del complejo I lleva asociada tanto un descenso en la bioenergética mitocondrial, como una alteración en el potencial de su membrana, lo que además implica cambios en su estructura y, por tanto, en su función (Greenamyre y cols, 2003).

Nuestros resultados siguen esta sucesión de acontecimientos, ya que tras el daño en la CTE inducido por la incubación con rotenona, descienden drásticamente tanto la concentración de ATP como el  $\Delta\Psi_m$ . La melatonina a la dosis 100 nM, a pesar de recuperar sólo el 50 % de la actividad del complejo I inhibido por la rotenona, es capaz de normalizar la concentración de ATP, así como la carga energética dentro de la mitocondria, confirmando su acción directa sobre los distintos complejos de la cadena respiratoria, no únicamente sobre el complejo I (Martín y cols, 2002) y sugiriendo que en estas condiciones se pone en marcha un mecanismo compensatorio que asegura el transporte electrónico a través del resto de complejos de la cadena. Además, la melatonina tiene un doble efecto protector sobre el complejo IV, eliminando directamente los  $\text{ONOO}^-$  e inhibiendo la síntesis de NO por la mtNOS (Crespo y cols, 1999; Escames y cols, 2003), así como estimulando la actividad de su parte “no inhibida” (Martín y cols, 2002). A dosis de 10 nM, la melatonina recupera levemente la actividad del complejo I y, consecuentemente, induce un ligero aumento de la concentración de ATP en presencia de rotenona.

Además, nuestros resultados sugieren que la melatonina potencia la síntesis de ATP y la internalización en la mitocondria de AMP y ADP, ya sus niveles están considerablemente aumentados al incubar las células con melatonina 100 nM en ausencia de rotenona. Ello sugiere una posible acción directa sobre el complejo V estimulando su actividad y sobre los mecanismos transportadores de nucleótidos de adenina mitocondriales. Esta idea está avalada por el hecho de que, en presencia de rotenona, la melatonina eleva la concentración de ADP en la mitocondria a casi al doble del valor control. De ahí se explica el valor de la carga energética mitocondria aumente cuando la muestra se trata con melatonina 100 nM en presencia de rotenona hasta valores muy similares a los de la muestra control.

Cuando las PC12 se incuban con CsA, también se observa un aumento de la concentración de ADP con respecto al caso control, aunque parece

compensarse con el nivel algo disminuido de ATP en estas mismas condiciones. En presencia de rotenona, la CsA no presenta ningún efecto protector, manteniéndose los niveles de AMP, ADP y ATP muy bajos. Estos resultados sugieren que la CsA no tiene ningún efecto protector sobre la síntesis de ATP en condiciones de estrés oxidativo inducido por la inhibición del complejo I mitocondrial. La CsA también ejerce un efecto parecido sobre los niveles de nucleótidos de adenina en la línea celular renal LLC-PK1, sobre la que, a concentraciones mayores que las usadas en este trabajo, induce un descenso en la carga energética mitocondrial, disminuyendo los niveles de ATP y aumentando los de AMP y, sobre todo, los de ADP (Massicot y cols, 1996).

La CsA se une a la ciclofilina D, impidiendo que su estructura cambie de conformación para inducir la apertura del poro de transición mitocondrial (Saetón y cols, 1998; Halestrap, 2002; Panovy cols, 2004; Basso y cols, 2005). Esto otorga a la CsA un papel estabilizador en la transición de permeabilidad de la membrana, del que se deriva el papel protector que la CsA ejerce en situaciones donde la permeabilidad de la membrana está comprometida, y la apertura del poro de transición inducida (Chen y cols, 2003; Singh y cols, 2005). En nuestro modelo experimental, la inhibición del complejo I de la CTE por la rotenona provoca un colapso en el potencial de la membrana de la mitocondria. La CsA actúa manteniendo el  $\Delta\Psi_m$  según se espera por su papel estabilizador de la membrana; sin embargo, llama la atención que 100 nM de melatonina restaure por completo el  $\Delta\Psi_m$ , sugiriendo un papel de la indolamina más allá de su efecto antioxidante y más efectivo que el de la CsA a la hora de recuperar el valor del  $\Delta\Psi_m$  cuando se ve dañado como consecuencia de la inhibición del complejo I.

En modelos experimentales donde se induce un estrés oxidativo exógeno, donde la mitocondria es un orgánulo diana de la acción de las ROS (en lugar de ser su origen), la CsA se muestra mucho más efectiva en la protección de la integridad de la organela (Chen y cols, 2002; De Marchi y cols, 2004; Salvi y



cols, 2005), que en nuestro modelo, donde la raíz de la producción de radicales libres se centra en la CTE.

El efecto protector de la melatonina frente a la caída del  $\Delta\Psi_m$ , se explica en su mayor parte por la protección directa que la indolamina ejerce sobre la CTE que, al restablecer el transporte electrónico, recupera también la capacidad de bombear protones al espacio intermembrana, con lo que se restaura el componente eléctrico de la fuerza protón motriz ( $\Delta\Psi_m$ ).

Entre la inducción de la permeabilidad en la membrana de la mitocondria y la apertura del megacanal que constituye el poro de transición, media la intervención de la membrana interna mitocondrial. El aumento en la permeabilidad de la membrana externa conlleva una inducción de la osmolaridad de la misma, permitiendo la entrada masiva de  $Ca^{2+}$  en la mitocondria, el aumento del pH intramitocondrial y la salida del citocromo *c* y otros factores protapotóticos del espacio intermembrana. La membrana interna pierde su estructura y la mitocondria aparece típicamente hinchada, debido a un aumento en el volumen de la matriz ocasionado por el aumento de la permeabilidad (Halestrap, 2002).

Los mecanismos moleculares que conducen a la formación del poro de transición aún no se conocen, pero parece claro que el estrés oxidativo aumenta la unión de la ciclofilina D a la membrana interna (estimulando el cambio conformacional previo a la formación del poro), a la vez que induce la apertura del poro sensible a la concentración de  $Ca^{2+}$  y potencia la pérdida del  $\Delta\Psi_m$  (Connern y Halestrap, 1996; Halestrap, 2002; Kim y cols, 2003). Un aumento en la formación de ROS en la mitocondria produce la oxidación del glutatión intracelular y de otros grupos sulfidrilos presentes en el megacanal induciendo la apertura del poro (Fontaine y Bernardi, 1999; León y cols, 2004).

En relación con estas premisas, nos encontramos que el estrés oxidativo en las células PC12, el descenso en los niveles de GSH celular y la pérdida del  $\Delta\Psi_m$ , se asocian con una significativa actividad del poro de transición mitocondrial. A dosis de melatonina de 10 nM no se impide la apertura del poro, lo que está en concordancia con la escasa efectividad que presentaba en la recuperación del  $\Delta\Psi_m$  a esta misma dosis. Sin embargo con el tratamiento con 100 nM de melatonina, se consigue disminuir la actividad del poro hasta en un 50% cuando su apertura se induce con rotenona. Su efecto es, incluso, algo más positivo que el de la CsA, cuya inhibición de la apertura del poro es sensiblemente menor. Este hecho puede deberse a la concentración empleada, ya que dosis inferiores de CsA (0.1-1  $\mu\text{M}$ ) impiden totalmente la apertura del poro de transición en células PC12 tratadas con inhibidores del complejo I de la CTE (Saetón y cols, 1998; Fontaine y Bernardi, 1999).

Se ha descrito que el propio complejo I ejerce un efecto regulador sobre el poro de transición, puesto que ambos se ven afectados por factores comunes como el pH de la matriz mitocondrial y el potencial transmembrana. Además ambos poseen NADH, ubiquinona y sitios de unión a cationes divalentes, que modulan su función (Fontaine y Bernardi, 1999). De esta forma, se sugiere que manteniendo la integridad y asegurando la actividad del complejo I, se podría controlar la apertura del poro de transición. Parece claro, pues, que el efecto inhibitorio de la melatonina frente a la actividad del poro se debe a la protección que la indolamina ejerce sobre el complejo I de la CTE, recuperando el flujo electrónico y el  $\Delta\Psi_m$ . Además hay que tener en cuenta que la melatonina está interviniendo, en este modelo, en la recuperación de la homeostasis del GSH; al incubar las células en presencia de rotenona, la melatonina previene el aumento del índice GSSG/GSH, asegurando el mantenimiento del almacén de GSH necesario para mantener reducidos, entre otros, los grupos sulfidrilos de la cara interna del poro.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos anteriormente en este laboratorio, que mostraban a la melatonina como un regulador del estado redox del glutathion en mitocondrias de cerebro e hígado cuando se induce estrés oxidativo, estimulando además, la actividad de GRd y GPx en estas condiciones (Martín y cols, 2000a). La melatonina, a dosis fisiológicas y farmacológicas, aumenta la expresión de GRd y GPx (Antolín y cols, 1996) y promueve la síntesis de novo del glutathion, estimulando la actividad del enzima limitante en su síntesis, la  $\gamma$ -glutamyl-cistein sintetasa (Urata y cols, 1999).

Sin embargo, un estudio reciente demuestra que la melatonina puede ejercer un efecto inhibitorio directo sobre el poro de transición (Andrabi, 2004). En este trabajo, se priva a neuronas del estriado de ratón de un aporte de oxígeno y glucosa y se registra la actividad del poro de transición mediante la técnica de patch-clamp. Aquellas muestras tratadas con melatonina inhiben la apertura del poro de una forma dosis dependiente (250 nM-100  $\mu$ M) con una  $IC_{50}$  de 0.8  $\mu$ M. Esta inhibición del poro se corresponde con los resultados obtenidos en este mismo trabajo, donde la melatonina previene la liberación de citocromo c de la mitocondria, la activación de la caspasa 3 y la fragmentación del DNA, característicos de la inducción de la apoptosis tras la apertura del poro de transición (Andrabi, 2004).

Desde este punto de vista, la melatonina ejercería un doble papel protector en la mitocondria; por un lado, actuando como antioxidante y depurador de radicales libres, estimulando la actividad del complejo I y, por extensión, de toda la CTE; y por otro, bloqueando directamente la apertura del poro de transición, manteniendo el  $\Delta\Psi_m$  e inhibiendo el paso previo a la liberación de agentes proapoptóticos de la mitocondria.

En nuestro laboratorio se ha demostrado que la melatonina intensifica la neurotransmisión GABAérgica modulando el receptor de GABA y de benzodiazepinas en el sistema nervioso central (Acuña-Castroviejo y cols,

1986a; Gomar y cols, 1994; Acuña-Castroviejo y cols, 1994). Este efecto confiere a la melatonina propiedades anticonvulsiantes, sugiriendo un papel protector de la indolamina en casos de epilepsia en humanos (Molina-Carballo y cols, 1997) y en modelos experimentales (Bikjaouene y cols, 2003).

El efecto modulador de la melatonina sobre el receptor central de benzodiazepinas, junto con los resultados obtenidos en este trabajo y la evidencia de la participación directa de la melatonina en la inhibición del poro de transición (Andrabi, 2004), sugieren una posible participación de la melatonina sobre el otro receptor de benzodiazepinas, el llamado inicialmente receptor periférico de benzodiazepinas, presente en la macroestructura que conforma el complejo del poro. Esta hipótesis viene avalada, además, por el hecho de que la melatonina desplaza a la unión del 3H-diazepán, un ligando del receptor mitocondrial de benzodiazepinas, de sus sitios de unión al receptor (Marangos y cols, 1981). No se conoce con certeza cuál es la misión del receptor de benzodiazepinas en la estructura del poro de transición, y se sugiere que inhibe su apertura en ciertas circunstancias y que puede actuar como un sensor de la concentración de oxígeno celular para su respuesta adaptativa (Casellas y cols, 2002).

Serán necesarios estudios posteriores de unión de ligando entre melatonina y el receptor periférico de benzodiazepinas, para averiguar si la acción directa de la indolamina sobre el poro de transición mitocondrial se debe a su modulación sobre dicho receptor, como ya sucede con el receptor central de benzodiazepinas.

### 3. APOPTOSIS. PAPEL PROTECTOR DE LA MELATONINA EN LA MUERTE NEURONAL.

En los últimos años, muchos estudios han revelado el papel de la melatonina en la modulación de la apoptosis inducida experimentalmente por diversos agentes en el sistema nervioso central, tanto en modelos *in vivo* como *in vitro* (Saínz y cols, 2003).

Diversos autores apoyan la idea de que el papel antiapoptótico de la melatonina se debe a su efecto antioxidante, puesto que en los modelos experimentales empleados siempre se induce estrés oxidativo a través de un agente externo como rotenona, MPTP ó 6-OHDA. Así, los modelos *in vitro* han permitido clarificar algunos de los hipotéticos mecanismos en los que el estrés oxidativo induce la muerte por apoptosis (Walkinshaw y Waters, 1994; Andersen, 2001).

Se ha demostrado que la melatonina previene la fragmentación del DNA causada por la 6-OHDA en células PC12 (Mayo, 1998) y que es capaz de prevenir no sólo la apoptosis, sino también la necrosis inducida por este tóxico a distintas dosis (Mayo y cols, 1999). El pretratamiento con melatonina previene la activación del factor NF- $\kappa$ B e inhibe los niveles de Bax en un modelo experimental de enfermedad de Alzheimer (Jang y cols, 2005). Resultados similares se muestran en otros trabajos donde la melatonina ejerce un efecto protector frente a la apoptosis inducida por diferentes agentes causantes de estrés oxidativo (Feng y Zhang, 2004; Juknat y cols, 2005).

Nuestros resultados avalan esta teoría y aportan una nueva hipótesis en los mecanismos de acción de la melatonina; al efecto antioxidante ejercido sobre las células incubadas con rotenona, se ha de sumar su posible acción directa sobre el poro de transición, impidiendo su apertura y, con ella, la liberación

al citosol de citocromo *c*, AIF y otras moléculas proapoptóticas que inducirán finalmente la muerte de las células. Este doble efecto hace que la protección de la melatonina frente a la apoptosis se vea reforzada y ejerza un efecto inhibidor superior al que cabría esperar si ambas acciones se tienen en cuenta por separado.

De los resultados obtenidos podemos comentar varios aspectos: en primer lugar, destacar que la ausencia de células necróticas, lo cual corrobora que la dosis empleada de rotenona causa un estrés oxidativo inductor de apoptosis; en segundo lugar, que la melatonina se muestra muy efectiva para impedir la muerte celular a las dos dosis empleadas, inhibiendo la apoptosis casi por completo y de una forma más eficiente que la CsA, como sucede en otros modelos experimentales similares (Mayo y cols, 1998; Mayo y cols, 1999; Feng y Zhang, 2004), y en tercer lugar, el efecto proapoptótico que presenta la indolamina cuando se tratan los cultivos, en ausencia de rotenona, con dosis crecientes de melatonina. Este efecto puede deberse al papel protector de la melatonina como regulador de la proliferación en células cancerosas (Sainz y cols, 2003). En nuestro caso el efecto proapoptótico en las PC12 no es dosis-dependiente, sino que presenta un máximo a bajas concentraciones (10 nM) y desciende cuando la dosis de melatonina es mayor (1 mM). Las células PC12, aunque están diferenciadas y su capacidad proliferativa deprimida, siguen manteniendo un carácter tumoral que explica este efecto proapoptótico de la melatonina sobre ellas.

En los últimos años han surgido multitud de estudios que pretenden descubrir los mecanismos de acción de la melatonina frente a células o tejidos tumorales. Por un lado, parece que su capacidad es meramente antiproliferativa, que no induce directamente a la muerte celular (Karasek y cols, 1998; Cos y cols, 2002), pero se han encontrado evidencias de que la melatonina es capaz, además, de incrementar la apoptosis en ratones con cáncer de colon inducido (Melen-Mucha y cols, 1998). En cuanto al mecanismo o los mecanismos de acción de la melatonina, aún no están esclarecidos. En

cáncer de mama, se ha sugerido que la melatonina actúa a través de sus receptores de membrana, modulando los niveles de cAMP (Lefebvre y cols, 1995; Eck y cols, 1998). En otros trabajos se asegura la participación de bax y bcl-2 en el carácter proapoptótico de la melatonina (Gong y cols, 2003), mientras que en células H22 de hepatocarcinoma se sugiere un alargamiento del ciclo celular como mecanismo antiproliferativo de la melatonina (Qin y cols, 2004).

De todos los resultados mostrados en esta tesis, se puede deducir que la melatonina es un excelente agente neuroprotector en los procesos degenerativos que acompañan al parkinsonismo. Su papel antioxidante y depurador de radicales libres protege a la célula y, sobre todo, a la mitocondria (orgánulo fuente y diana de especies radicales) del daño producido por el estrés oxidativo, causante de la progresión del daño neuronal en la EP. Pero además, la melatonina actúa como un excelente protector frente a la apoptosis, mecanismo de muerte celular que se activa en las neuronas dopaminérgicas dañadas. La melatonina es, pues, un buen candidato para paliar los síntomas que acompañan a la degeneración en la enfermedad de Parkinson.

# **CONCLUSIONES**





De los resultados obtenidos se deducen las siguientes conclusiones:

1. La incubación de células PC12 diferenciadas con rotenona representa un buen modelo experimental de EP *in vitro*.
2. La melatonina protege a la mitocondria del daño ocasionado por la rotenona, recuperando la funcionalidad fisiológica de aquella. Este efecto se realiza a tres niveles:
  - Recuperando la actividad del complejo I
  - Restableciendo la producción de ATP
  - Manteniendo el potencial de membrana
3. La melatonina contrarresta el estrés oxidativo inducido por la rotenona, normalizando el índice GSSG/GSH y aumentando la actividad de GRd y GPx.
4. La melatonina inhibe la apertura del poro de transición mitocondrial inducida por la rotenona.
5. Debido a su efecto antioxidante e inhibidor de la apertura del poro de transición, la melatonina previene la muerte celular por apoptosis inducida por la rotenona.
6. En todos los casos, la melatonina es más eficiente que la CsA para recuperar el estado redox celular y proteger a la mitocondria y a la célula del daño ocasionado por la rotenona.



# **BIBLIOGRAFÍA**



- Absi E, Ayala A, Machado A, Parrado J (2000) Protective effect of melatonin against the 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced inhibition of complex I of the mitochondrial respiratory chain. *J Pineal Res* 29(1): 40-47.
- Adams JM, Cory S (2001) Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem Sc* 26(1):61-6.
- Acuña-Castroviejo D, Romero HR, Cardinali DP (1986a) Changes in gamma-aminobutyric acid high affinity binding to cerebral cortex membranes after pinealectomy or melatonin administration to rats. *Neuroendroc* 43: 24-31.
- Acuña-Castroviejo D, Lowenstein PR, Rosenstein RE, Cardinali DP (1986b) Diurnal variations of benzodiazepine binding in rat cerebral cortex: disruption by pinealectomy. *J Pineal Res* 3: 101-109.
- Acuña-Castroviejo D, Castillo JL, Fernández B, Gomar MD, Del Aguila CM (1992). Modulation by Pineal Gland of Ouabain High Affinity Binding Sites in Rat Cerebral Cortex. *Am J Physiol* 262:R698-R706.
- Acuña-Castroviejo D, Pablos MI, Menendez-Pelaez A, Reiter RJ (1993) Melatonin receptors in purified cell nuclei of liver. *Res Comm Chem Pathol Pharmacol* 82 (2): 523-256.
- Acuña-Castroviejo D, Reiter RJ, Menendez-Pelaez A, Pablos MI, Burgos A (1994) Characterization of high-affinity melatonin binding sites in purified cell nuclei of rat liver. *J Pineal Res* 16 (2): 57-63.
- Acuña-Castroviejo D, Escames G, Macías M, Muñoz-Hoyos, Molina-Carballo A, Arauzo M, Montes R (1995) Cell protective role of melatonin in the brain. *J Pineal Res* 19(2): 57-63.
- Acuña-Castroviedo D, Coto-Montes A, Gaia Monti M, Ortiz GG, Reiter RJ (1997) Melatonin in protective against MPTP-induced striatal and hippocampal lesions. *Life Sci* 60(20): PL23-PL29.
- Acuña-Castroviejo D, Martín M, Macías M, Escames G, León J, Khaldy H, Reiter RJ (2001) Melatonin, mitochondria, and cellular bioenergetics. *J Pineal Res* 30(2): 64-74.
- Acuña-Castroviejo D, Escames G, Carazo A, León J, Khaldy H, Reiter RJ (2002). Melatonin, mitochondrial homeostasis and mitochondrial-related diseases. *Curr Top Med Chem* 2 (2):133-151.
- Acuña-Castroviejo D, Escames G, León J, Carazo A, Khaldy H (2003) Mitochondrial regulation by melatonin and its metabolites. *Advances in experimental Medicin and Biology* 527: 549-557.

- Acuña-Castroviejo D, Escames G, López LC, León J (2005). Melatonin and nitric oxide: Two regulators of mitochondrial homeostasis with opposite manners. *Endocrine*,(en prensa).
- Aderem A (1992) Signal transduction and the actin cytoskeleton: The role of MARCKS and profilin. *TIBS*. 17:438.
- Agid, Y (1995) Aging, disease and nerve cell death. *Bull Acad Natl Med* 179: 1193-1203.
- Aguilar MV, Jimenez-Jimenez FJ, Molina JA, Meseguer I, Mateos-Vega CJ, Gonzalez-Muñoz MJ, de Bustos F, Gomez-Escalonilla C, Ort-Pareja M, Zurdo M, Martinez-Para MC (1998) Cerebrospinal fluid selenium and chromium levels in patients with Parkinson's disease. *J Neural Transm* 105(10-12):1245-1251.
- Aimoto T, Rohde BH, Chiou GC, Lauber JK (1985) N-acetyltransferase activity and melatonin level in the eyes of glaucomatous chickens. *J Ocul Pharmacol* 1(2): 149-160.
- Albin RL, Young AB, Penney LB. (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* 12: 366-375.
- Alexander GE, Crutcher MD, DeLong MR. (1990) Basal ganglia-thalamocortical circuits: parallel substrates for motor, oculomotor, "prefrontal" and "limbic" functions. *Prog Brain Res* 85: 119-146.
- Alexander GE, Crutcher MD. (1990) Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *TMS* 13: 266-271.
- Álvarez E, Álvarez L, Macías R, Pavón N. (2001) *Rev Mex Neuroci* 2 (2): 77-85.
- Alvira DR, Villariba MP. (1988) Radicales libres y especies activadas del oxígeno. Química, biología e implicaciones en patología médica. Sistemas defensivos ante los radicales libres. Sistemas antioxidantes enzimáticos. *An Med Interna* 5: 146-151.
- Ambani LM, Van Woert, MH, Murphy S. (1975) Brain peroxidase and catalase in Parkinson disease. *Arch Neurol* 32: 114-118.
- Andersen JK (2001) Does neuronal loss in Parkinson's disease involve programmed cell death? *Bioessays* 23: 640-646.
- Anderson ME (1985) Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol* 113:548-55.
- Ando S, Tanabe K, Gonda Y, Sato C, Inagaki M (1989) Domain- and sequence-specific phosphorylation of vimentin induces disassembly of the filament structure. *Biochemistry* 28(7): 2974-2979.

- Andrabi SA, Sayeed I, Siemen D, Wolf G, Horn TF (2004) Direct inhibition of the mitochondrial permeability transition pore: a possible mechanism responsible for anti-apoptotic effects of melatonin. *FASEB J* 18(7): 869-871.
- André E, Conquet F, Steinmayr M et al (1998) Disruption of retinoid-related orphan receptor  $\beta$  changes circadian behavior, causes retinal degeneration and leads to vacillans phenotype in mice. *EMBO J*. 17: 3867.
- Antolín I, Rodríguez C, Sainz RM, Mayo LC, Uria H, Kotler ML, Rodríguez-Colunga MJ, Tolivia D, Menéndez-Pelaez A (1996) Neurohormone melatonin prevents cell damage: effect on gene expression for antioxidant enzymes. *FASEB J* 10(8): 882-890.
- Antolín A, Mayo JC, Saínz RM, del Brio ML; Herrera F, Martín V, Rodríguez C (2002) Protective efecto of melatonin in a chronic experimental model of Parkinson's disease. *Brain Res* 943(2): 163-173.
- Antón-Tay F, Huerto-Delgadillo L, Ortega-Corona BG, Benítez-King G (1993) Melatonin antagonism to calmodulin may modulate multiple cellular functions. In: *Melatonin and the Pineal Gland from Basic Science to Clinical Application*. Eds: Toitou Y, Arendt J, Pevet P, pp: 41-46. Amsterdam, *Elsevier*.
- Anton-Tay F, Ramirez G, Martinez I, Benitez-King G (1998) In vitro stimulation of protein kinase C by melatonin. *Neurochem Res* 23(5): 601-606.
- Axelrod J (1974) The pineal gland: a neurochemical transducer. *Science* 184: 1341.
- Axelrod J, Weissbach H (1961) Purification and properties of hydroxyindole-O-methyltransferase. *J Biol Chem* 236: 211.
- Bal-Price A, Brown C (2000) Nitric-oxide-induced necrosis and apoptosis in PC12 cells mediated by mitochondria. *J Neurochem* 75: 1455-1464.
- Barbeau A, Dallair L, Buu NT, Poirier J, Rucinska E. (1985) Comparative behavioral, biochemical and pigmentary effects of MPTP, MPP+ and paraquat in *Rana pipiens*. *Life Sci* 37: 1529.
- Barcia C, Emborg M, Hirsch EC, Herrero MT. (2004) Blood vessels and parkinsonism. *Frontiers in Bioscience* 9: 277-282.
- Barcia-González C, Herrero-Ezquerro MT. (2004) Inflammation and Parkinson's disease *Rev Neurol* 38(6): 545-553.
- Baron MS, Vitek JL, Bakay RAE, Green J, Kaneoke Y, Hashimoto T, Turner RS, Woodard JL, Cole SA,



- McDonald WM, DeLong MR. (1996).
- Barrientos A, Moraes C (1999) Titrating the effects of mitochondrial complex I impairment in the cell physiology. *J Biol Chem* 274 (23): 16188-16197)
- Basso E, Fante L, Fowlkes J, Petronilli V, Forte MA, Bernardi P (2005) Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of cyclophilin d. *J Biol Chem* 13; 280(19):18558-18561.
- Batandier C, Leverve X, Fontaine E (2004) Opening of the mitochondrial permeability transition pore induces reactive oxygen species production at the level of the respiratory chain complex I. *J Biol Chem* 279 (17): 17197-17204.
- Batistatou A, Grenne LA (1991) Aurintricarboxylic acid rescues PC12 cells and sympathetic neurons from cell death caused by nerve growth factor deprivation: correlation with suppression of endonuclease activity. *J Cell Biol* 115: 461-471.
- Beal FM. (1995) Aging, energy and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann Neurol* 38: 357-366.
- Becker-André M, André E, Delamarter JF (1993) Identification of nuclear receptor mRNAs by RT-PCR amplification of conserved zinc-finger motif sequences. *Biochem Biophys Res Commun* 194: 1371.
- Beckman JS, Ischiropoulos H, Zhu L, Van der Waal M, Amith C, Chen J, Harrison J, Martin JC, Tsai M. (1992) Kinetics of superoxide dismutase-an iron catalysed nitration of phenolics by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys* 198: 438.
- Benítez-King G, Huerto-Delgadillo L, Antón-Tay F (1991) Melatonin modifies calmodulin cell levels in MDCK and N1E-115 cell lines and inhibits phosphodiesterase activity in vitro. *Brain Res.* 557: 289.
- Benítez-King G, Huerto-delgadillo L, Antón-Tay F (1993) Binding of 3H-melatonin to calmodulin. *Life Sci.* 53:201.
- Benítez-King G, Antón-Tay F. (1996). Role of melatonin in cytoskeletal remodeling is mediated by calmodulin and protein kinase C. Melatonin: a universal photoperiodic signal with diverse action. (P.L Tang, SF Pang, RJ Reiter, eds) 21:154. Front. Horm. Res. Basel., Karger.
- Benot S, Molinero P, Soutto M, Gobrna R, Guerrero JM (1998) Circadian variations in the rat serum total antioxidant status: Correlation with melatonin levels. *J Pineal Res* 25: 1.

- Benveniste EN. (1997) Role of macrophages/microglia in multiple sclerosis and experimental allergic encephalomyelitis. *J Mol Med* 75: 165-173.
- Benveniste EN, Nguyen VT, O'Keefe GM. (2001) Immunological aspects of microglia: relevance to Alzheimer's disease. *Neurochem Int* 39: 381-391.
- Benveniste EN, Nguyen VT, Wesemann DR. (2004) Molecular regulation of CD40 gene expression in macrophages and microglia. *Brain Behav Immun* 18: 7-12.
- Benza G, Pastoris O. (1989) Age related effect induced by oxidative stress on the cerebral glutathione system. *Neurochem Res* 14: 473-481.
- Benzi G, Moretti A. (1995) Age and prooxidative stress related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and the glutathione system. *Free Radic Biol Med* 19: 77-101.
- Bettahi I, Guerrero JM, Reiter RJ, Osuna C (1998) Physiological concentrations of melatonin inhibit the norepinephrine-induced activation of prostaglandin E2 and cyclic AMP production in rat hypothalamus: a mechanism involving inhibition of nitric oxide synthase. *J Pineal Res* 25(1): 34-40.
- Bergman H, Wichmann T, DeLong MR. (1990) Reversal of experimental parkinsonism by lesions of the subthalamic nucleus. *Science* 249: 1436-1438.
- Bershadsky AD, Vasilev JM. (1988) Cytoskeleton plenum press. Plenum Press, *Nueva York*.
- Besman MJ, Yanagibashi K, Lee TD, Kawamura M, May PF, Shovely JE (1989). Identification of des-(Gly-Ile)-endozepine as an effector of corticotropin-dependent adrenal steroidogenesis: stimulation of cholesterol delivery is mediated by the peripheral benzodiazepine receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 86; 4897-4901.
- Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, García-Osuna M, Panov AV, Greenamyre T. (2000) Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nature Neurosci* 3(12): 1301-1306.
- Bettahi I, Pozo D, Osuna C, Reiter RJ, Acuña-Castroviejo D, Guerrero JM (1996) Physiological concentrations of melatonin inhibit nitric oxide synthase activity in rat hypothalamus. *J Pineal Res*. 20: 205.
- Bharath S, Andersen JK (2005) Glutathione depletion in a midbrain-derived immortalized dopaminergic cell line results

in limited tyrosine nitration of mitochondrial complex I subunits: implications for Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal* (7-8): 900-910.

Bikjdaouene L, Escames G, León J, Ferrer JM, Khaldy H, Vives F, Acuña-Castroviejo (2003) Changes in brain amino acids and nitric oxide after melatonin administration in rats with pentylenetetrazole-induced seizures. *J Pineal Res* 35(1): 54-60.

Birbes H, El Bawab S, Hannun YA, Obeid LM (2001) Selective hydrolysis of a mitochondrial pool of sphingomyelin induces apoptosis. *FASEB J* 15(14): 2669-2679.

Blandini F, Nappi G, Greenamyre JT. (2001) Subthalamic infusion of an NMDA antagonist prevents basal ganglia metabolic changes and nigral degeneration in rodent model of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 49: 525-529.

Blum D, Torch S, Lambeng N, Nissou MF, Benabid AL, Sadpuñ R, Verna JM (2001) Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 65: 135-172.

Bonfoco E, Krainc D, Andarcrona M, Nicotera P, Lipton SA (1995) Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and

intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(16):7162-7166.

Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E, Dekker MC, Squiteri F, Ibañez P, Joesse M, van Dongen JW, Vanacore N, van Swieten JC, Brice A, Meco G, van Dujin CM, Oostra BA, Heutink P. (2003) Mutation on the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* 299: 374-377.

Bono F, Lamarche I, Prabonnaud V, Le Fur G, Herbert JM (1999) Peripheral benzodiazepine receptor agonists exhibits antiapoptotic activities. *Biochem Biophys Res Commun* 265: 457-461.

Bóveris A, Costa LE, Poderoso Jj, Cadenas E (2000) Regulation of mitochondrial respiration by oxygen and nitric oxide. *Ann NY Acad Sci* 899:121.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of protein dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.

Brenner C, Cadiou H, Vieira HL, Zamzami N, Marzo I, Xie Z, Leber B, Andrews D, Duclouhier H, Reed JC, Kroemer G (2000) Bcl-2 and Bax regulate the channel activity of the mitochondrial adenine

- nucleotide translocator.  
*Oncogene* 19(3): 329-336.
- Brown EE, Damsma G, Cumming P, Fibiger HC. (1991) Interstriatal 3-metoxytyramine reflects striatal DA release: an in vivo microdialysis study. *J. Neurochem* 57:701.
- Brown GC (1999) Nitric oxide and mitochondrial respiration. *Biochim Biophys Acta* 1411: 351.
- Brown GC (2001) Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase. *Biochim Biophys Acta* 1658: 44.
- Cagnoli CM, Atabay C, Kharlamova E, Manev H. (1995) Melatonin protects neurons from singlet oxygen-induced apoptosis. *J Pineal Res.* 18:222.
- Cahik GM, Besharse JC (1989) Retinal melatonin is metabolized within the eye of *Xenopus laevis*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 86: 1098.
- Capano M, Crompton M (2002) Biphasic translocation of Bax to mitochondria. *Biochem J* 367: 169-178.
- Cardellach , Marti MJ, Fernandez-Sola J, Marin C, Hoel JB, Tolosa E, Urbano-Marquez A (1993) Mitochondrial respiratory chain activity in skeletal muscle from patients with Parkinson's disease. *Neurology* 43: 2258-2262.
- Cardinali DP (2003) Clinical perspectives for The use of melatonin as a neuroprotective chronobiotic in Alzheimer's disease. *Akualnosci Neurologiczne* 3(3): 188-204.
- Cardinali DP, Nagle CA, Rosner JM (1974) Aromatization of androgens to estrogens by the rat pineal gland. *Experientia* 30(10): 1222-1223.
- Cardinali DP, Nagle CA, Rosner JM (1976) Gonadotrophin- and prolactin-induced increase of rat pineal hydroxyindole-O-methyl transferase: involvement of the sympathetic nervous system. *J Endocrinol* 68(02): 341-342.
- Carlberg C, Hoof van Huijsduijnen R, Staple J, De Lamater JF, Becker-André M (1994) RZR, a novel family of retinoid-related orphan receptors that function as both monomers and homodimers. *Mol Endocrinol* 8: 757.
- Carlberg C, Wiesenberg I (1995) The orphan receptor family RZR/ROR, melatonin and 5-lipoxygenase: An unexpected relationship. *J Pineal* (4):171-178.
- Carlson AJ (1955) Science versus life. *J Am Med Assoc* 157 (16): 1437-1441.
- Carreras MC, Franco MC, Peralta JG, Poderoso JJ. (2004) Nitric

- oxide, complex I and the modulation of mitochondrial reactive species in biology and disease. *Mol. Asp. Med.* 25: 125-139.
- Casciola-Rosen L, Nicholson DW, Chong t, Rowan KR, Thornberry NA (1996) Apopain/ CPP32 cleaves proteins that are essential for cellular repair: a fundamental principle of apoptotic death. *J Exp Med* 183: 1957-1964.
- Casellas P, Galiegue S, Basile AS (2002) Peripheral benzodiazepine receptors and mitochondrial function. *Neurochem Int* 40: 475-486.
- Cecconi F (1999) Apaf1 and the apoptotic machinery. *Cell Death Differ* 6: 1087-1098.
- Charles MP, Adamski D, Kholler B, Peletier L, Berger F, Wion D (2003) Induction of neurite outgrowth in PC12 cells by bacterial nucleoside N<sup>6</sup>-methyldeoxyadenosine is mediated through adenosine A<sub>2a</sub> receptors and via camp and MAPK signalling pathways. *Biochem Biophys Res Communications* 304 795-800.
- Chen Q, Chai YC, Mazumder S, Jiang C, Macklis RM, Chisolm GM, Almasan A (2002) The late increase in intracellular free radical oxygen species during apoptosis is associated with cytochrome c release, caspase activation, and mitochondrial dysfunction. *Cell Death Differ* 10 (3): 323-334.
- Chen Q, Chai YC, Mazumder S, Jiang C, Macklis RM, Chisolm GM, Almasan A (2003) The late increase in intracellular free radical oxygen species during apoptosis is associated with cytochrome c release, caspase activation, and mitochondrial dysfunction. *Cell Death Differ* 10(3): 323-34.
- Cheng EH, Kirsch DG, Clem RJ, Ravi R, Kastan MB, Bedi A, Ueno K, Hardwick JM (1997) Bax-independent inhibition of apoptosis by Bcl-X<sub>L</sub>. *Nature* 379: 554-556.
- Christie DS, Forbes ME, Maxwell GD (1987) Phenotypic properties of catecholamine-positive cells that differentiate in avian neural crest cultures. *J Neurosci* 7: 3749-3763.
- Ciriolo MR, Fiskin K. (1994) Age related changes in Cu/Zn SOD. The dependent and independent glutathione peroxidase and catalase activities in specific areas of rat brain. *Mech Agein Dev* 61: 287-297.
- Cohen M, Roselle D, Chabner B, Schmidt TJ, Lippman M (1978) Evidence for a cytoplasmic melatonin receptor. *Nature* 274(5674): 894-895.
- Connern CP, Halestrap AP (1996) Chaotropic agents and increased matrix volume enhance binding of mitochondrial cyclophilin to the inner mitochondrial membrane and sensitize the mitochondrial permeability

- transition to  $[Ca^{2+}]$  *Biochem* 35: 8172-8180.
- Cortopassi GA, Amheim N. (1990) Detection of a specific mitochondrial DAN deletion in tissues of older humans. *Nuclei Acid Res.* 18: 6927.
- Cos S, Mediavilla MD, Fernández R, González-Lamuno D, Sánchez-Barcelo EJ (2002) Does melatonin induce apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells in vitro? *J Pineal Res* 32: 90-96.
- Costa F. (1972) Monoamine oxidase: new vistas. *New York: Raven.*
- Costa C, Castiñeira MC. (2001) Enfermedad de Parkinson. Guías clínicas en Atención Primaria 1 (42). *Lugo.*
- Coyle JT, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. *Science* 262: 689-694.
- Crespo E, Macías M, Pozo D, Escames G, Martín M, Vives F, Guerrero JM, Acuña-Castroviejo D (1999) 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* 15(1), 164-170.
- Crompton M (2000) Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their role in cell death. *J Physiol* 529 Pt 1:11-21.
- Cryns V, Yuan J (1998) Proteases to die for. *Genes Dev* 12: 1551-1570.
- Dabbeni-Sala F, Floreani M, Franceschini D, Skaper SD, Giusti P (2001) Kainic acid induces selective mitochondrial oxidative phosphorylation enzyme dysfunction in cerebellar granule neurons: protective effects of melatonin and GSH ethyl ester. *FASEB J* 15(10): 1786-1788.
- Damier P, Hirsch EC, Zhang P, Agid Y, Javoy-Agid F. (1993) Glutathione peroxidase, glial cells and Parkinson's disease. *Neuroscience* 52: 1-6
- Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME (1997) Akt phosphorylation of Bad couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91: 231-241.
- Daugas E, Susin SA, Zamzami N, Ferri KF, Ironopoulou T, Larochette N, Prevost MC, Leber B, Andrews D, Penninger J, Kroemer G (2000) Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *FASEB J* 14: 729-739.
- Davey GP, Clark JB (1996) Threshold effects and control of oxidative phosphorylation in nonsynaptic rat brain mitochondria. *J Neurochem* 66: 1617-1624.

- Dawson TM, Dawson VL, Snyder SH. (1992) A novel neuronal messenger molecule in the brain. The free radical nitric oxide. *Ann Neurol* 32:297.
- de Atenor MS, de Romero IR, Brauckmann E, Pisano A; Legname AH (1994) Effects of the pineal gland and melatonin on the metabolism of oocytes in vitro and on ovulation in *Bufo arenarum*. *J Exp Zool* 268(6) 436-441.
- De Marchi U, Mancon M, Battaglia V, Ceccon S, Cardellini P, Toninello A (2004) Influence of reactive oxygen species production by monoamine oxidase activity on aluminum-induced mitochondrial permeability transition. *Cell Mol Life Sci* 61 (19-20): 2664-2671.
- Debatin KM, Poncet D, Kroemer G (2002) Chemotherapy: targeting the mitochondrial cell death pathway. *Oncogene* 21: 8786-8803.
- Denny-Brown D. (1962) The basal ganglia. London, *Oxford university press*.
- Desagher S, Martinou JC (2000) Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol* 10: 369-377.
- Deveraux QL, Reed JC (1999) IAP Family proteins-suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 13: 239-252.
- Dexter DT, Carter CJ, Wells FR, Javoy-Agud F, Agid Y, Lees A, Jenner P, Marsden CD. (1989) Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. *J Neurochem* 55: 16-20.
- Dexter DT, Wells FR, Lees AJ (1989) Increased nigral iron content and alterations in other metal ions occurring in brain in Parkinson's disease. *J Neurochem* 52: 1830-1836.
- Dikens JA. (1994) Isolated cerebral and cerebellar mitochondria produce free radicals when exposed to elevated  $Ca^{2+}$  and  $Na^{+}$ : implications for neurodegeneration. *J Neurochem* 63(2): 584-591.
- Di Lisa F, Blank PS, Colonna R, Gambassi G, Silverman HS, Stern MD, Hansford RG (1995) Mitochondrial membrane potential in single living adult rat cardiac myocytes exposed to anoxia or metabolic inhibition. *J Physiol* 486 ( Pt 1):1-13.
- Di Mauro S. (1993) Mitochondrial involvement in Parkinson's disease: the controversy continues. *Neurology* 43: 2170.
- Di Monte, DA. (2003) The environment and Parkinson's disease: is the nigrostriatal system preferentially targeted by neurotoxins? *The Lancet Neurology* 2: 531-538.
- Dlamini Z, Mbita Z, Zungu M (2004) Genealogy, expression and

- molecular mechanisms in apoptosis. *Pharmacol Therap* 101: 1-15.
- Dubocovich ML, Takahashi, JS (1987) Use of 2-[<sup>125</sup>I]-iodomelatonin to characterize melatonin binding sites in chicken retina. *Proc Natl Acad Sci USA*. 84: 3916.
- Dubocovich ML, Yun K, Al-Ghoul WM, Benloucif S, Masana MI (1998) Selective MT2 melatonin receptor antagonists block melatonin-mediated phase advances of circadian rhythms. *FASEB J* (12): 1211-1220.
- Dudek H, Datta SR, Franke TF, Birnbaum MJ, Yao R, Cooper GM, Segal RA, Kaplan DR, Greenberg ME (1997) Regulation of neuronal survival by serine-threonine protein kinase Akt. *Science* 275: 661-665.
- Dussault I, Giguere V (1995) Differential regulation of the N-myc proto-oncogene by ROR alpha and RVR, two orphan members of the superfamily of nuclear hormone receptors. *Mol Cell Biol* (4):1860-1867.
- Eck KM, Yuan L, Duffy L, Ram PT Ayettey S, Chen I (1998) A sequential treatment regimen with melatonin and all-trans retinic acid induces apoptosis in MCF-7 tumour cells. *British J Cancer* 77: 2129-2137.
- Ekstrom P, Vanecek J (1992) Localization of 2-[<sup>125</sup>I]-iodomelatonin binding sites in the brain of the Atlantic salmon, *Salmo salar* L *Neuroendocrinology* 55: 529
- Ellis RE, Jacobson DM, Horvitz HR (1991) Genes required for the engulfment of cell threonine protein kinase. *Akt Science* 275: 661-665.
- Emerit J, Edeas M, Bricaire F. (2003) Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biom & Pharmacotherapy* 58: 39-46.
- Escames G, León J, Macías M, Khaldy H, Acuña-Castroviejo (2003) Melatonin counteracts lipopolysaccharide-induced expression and activity of mitochondrial nitric oxide synthase in rats. *FASEB J* 17(8): 365-375.
- Escames G, León J, López LC, Acuña-Castroviejo D (2004). Mechanisms of the NMDA receptor inhibition by melatonin in the rat brain striatum. *J.Neuroendocrinol* 16:929-935.
- Escobar A. (2003) Fisiopatología y neuropatología de la enfermedad de Parkinson. *Rev Mex Neuroci* 4 (5): 295-303.
- Evan GL, Vousden KH (2001) Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 411: 342-348.



- Fahn S, Cohen G. (1992) The oxidante stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it. *Ann Neurol* 32: 804-812.
- Fariello RG. (1988) Experimental support for the impilication of oxidative stress in the genesis of parkinsonian syndromes. *Funct Nerol* 3:407-411.
- Feng Z, Zhang JT (2004) Melatonin reduces amyloid beta-induced apoptosis in pheochromocytoma (PC12) cells. *J Pineal Res* 37(4):257-266.
- Fennell DA, Corbo M, Pallaska A, Cotter FE (2001) Bcl-2 resistant mitochondrial toxicity mediated by the isoquinoline carboxamide PK11195 involves de novo generation of reactive oxygen species. *British J Cancer* 84: 1397-1404.
- Floreani \_M, Skaper SD, Facci L, Lipartiti M, Giusti P (1997) Melatonin maintains glutathione homeostasis in kainic acid-exposed rat brain tissues. *FASEB J* 11(14): 1309-1315.
- Fonck C, Baudry M (2003) Rapid reduction of ATP synthesis and lack of free radical formation by MPP+ in rat brain synaptosomes and mitochondria. *Brain Res* 975: 214-221.
- Fontaine, E, Bernardi P (1999) Progress on the mitochondrial permeability tansition pore: regulation by complex I and ubiquinone analogs. *J Bioen Biomem* 31(4): 335-345.
- Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC (1997) PI3K downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell* 88: 435-437.
- Fridovich I. (1978). The biology of oxygen radicals. *Science* 201:875.
- Fujiwara M, Shibata M, Watanabe Y, Nikiwa T, Hirata F, Mizuno N, Hayaishi O (1978) Indoleamine 2,3-dioxigenase. *J Biol Chem* 253: 6081.
- Gaal JC, Smith KR, Pearson CK. (1987) Cellular authanasia mediated by a nuclear enzyme: a central role for nuclear ADP-ribosylation in cellular metabolism. *Trends Biochem Sci.* 12: 129.
- Gao HM, Hong JS, Zhang W, Liu B (2002) Distinct role for microglia in rotenone-induced degeneration of dopaminergic neurons. *J Neuosci* 22: 2549-2557.
- Garber-Goldsman CB, Marshall KC, Bielajew C (1986) 6-Hydroxydopamine treatment enhances excitation of cultured cerebellar neurons by glutamate. *Can J Physiol Pharmacol* 64(10):1335-9.
- García JJ, Reiter RJ, Pie J, Ortiz GG, Cabrera J, Sainz RM, Acuña-Castroviejo D (1999) Role of pinoline and melatonin

- in stabilizing hepatic microsomal membranes against oxidative stress. *Bioenerg Biomembr* 31(6): 609-616.
- Gerfen CR. (1995) Dopamine receptor function in the basal ganglia. *Clin Neuropharmacol* 18: S62-S177.
- Giasson BI, Duda JE, Murray IV, Chen Q, Souza JM, Hurting HI, Ischiropoulos H, Trojanowski JQ, Lee VM. (2000) Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions. *Science* 290:985-989.
- Godson C, Reppert SM (1997) The Mel(1a) melatonin receptor is coupled to parallel signal transduction pathways. *Endocrinology* 138: 397.
- Gogvadze V, Robertson JD, Zhivotovsky B, Orrenius S (2001) Cytochrome c release occurs via Ca<sup>2+</sup>-dependent and Ca<sup>2+</sup>-independent mechanisms that are regulated by Bax. *J Biol Chem* 276(22):19066-71.
- Golbe LI, Di Iorio G, Bonavita V, Miller DC, Duvoisin RC. (1990) A large kindred with autosomal dominant Parkinson's disease. *Ann Neurol* 27: 276-282.
- Gomar MD, Fernández B, Castillo JL, Del Aguila CM, Acuña-Castroviejo D (1993). Melatonin counteracts pinealectomy-dependent decreases in rat brain [3H] flunitrazepam binding through an opioid mechanism. *Neurosci Lett* 164:149-153.
- Gong LH, Ren DH, Xiong M, Lu ZQ, Wang XM (2003) Melatonin in vitro apoptosis of H22 hepatocarcinoma cells. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 25(6):550-554.
- González-Fraguela MD, Castellano-Benítez O, González-Hoyuela M. (1999) Oxidative stress in neurodegeneration. *Rev Neurol* 28 (5): 504-511.
- González-Scarano F, Baltuch G. (1999) Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. *Ann Rev Neurosci* 22: 219-240.
- Good PF, Olanow CW, Perl DP. (1992) Neuromelanin-containing neurons of the substantia nigra accumulate iron and aluminum in Parkinson's disease: a LAMMA study. *Brain Res* 593: 343-346.
- Gorell JM, Johnson CC, Rybicki BA, Peterson EL, Richardson RJ (1998) The risk of Parkinson's disease with exposure to pesticides, farming well water, and rural living. *Neurology* 50: 1346-1350.
- Gorell JM, Johnson CC, Rybicki BA, Peterson EL, Kosrtsha GX, Brown GG. (1999) Occupational exposure to manganese, copper, lead, iron, mercury and zinc and the

- risk of Parkinson's disease. *Neurotoxicology* 20: 239-247.
- Gottlieb R (2000) Mitochondria: execution central. *FEBS Lett* 482: 6-12.
- Gottlieb RA, Granville DJ (2002) Analyzing mitochondrial changes during apoptosis. *Methods* 26: 341-347.
- Graeber MB, Bise KB, Mehraein P. (1994) CR3/43, a marker for activated microglia: application to diagnostic neuropathology. *Neuropathol Appl Neurobiol* 20: 406-408.
- Graybel AM. (1990) Neurotransmitters and neuroduladors in the basal ganglia. *Trends Neurosci* 13: 244.
- Green D, Kroemer G (1998) The central executioners of apoptosis: caspasas o mitochondria? *Trends Cell Biol* 8: 267-271.
- Green L, Tischler AS (1976) Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells wich respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 73: 2424-2428
- Greenamyre JT, Betarbet R, Sherer T, Panov A. (2001) Response: Parkinson's disease, pesticides and mitochondrial dysfunction. *Trends Neurosci* 24: 247.
- Greenamyre JT, Betarbet R, Sherer T (2003) The rotenone model of Parkinson's disease: genes, environment and mitochondria. *Parkinsonism and Related Disorders* 9: S59-S64.
- Greene JG, Greenamyre JT. (1996) Bioenergetics and glutamate excitotoxicity. *Prog Neurobiol* 48: 613-634.
- Greenfield JG, Bosanquet FD. (1953) The brainstem lesions in Parkinson's disease. *J Neurosurg Psychiatr* 16:213.
- Griffith OW (1980) Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem* 106(1): 207-212.
- Gu M, Cooper JM, Taanman JW, Schapira AH (1998) Mitochondrial DNA transmission of the mitochondrial defect in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 44(2):177-186.
- Gwinn-Hardy K, Farrer M. (2002) Parkinson's genetics: An embarrassment of riches. *Ann Neurol* 51: 7-8.
- Haas RH, Nasirian F, Nakano K, Ward D, Pay M, Hill R, Shults CW (1995) Low platelet mitochondrial complex I and complex II/III activity in early untreated arknson's disease. *Ann Neurol* 37: 714-722.
- Halestrap AP, McStay GP, Clarke SJ (2002) The permeability

transition pore complex:  
another view. *Biochem* 84(2-3): 153-166.

substrate reduction site  
upstream from the rotenone  
binding site. *J Neurosci* 71:  
2549-2557.

Halliwell B, Gutteridge JNC. (1989)  
Free radicals in biology and  
medicine. Free Rad Biol Med  
2<sup>nd</sup> Edn. Clarendon. *Oxford*.

Hardeland R, Reiter RJ, Poeggeler  
B, Tan DX (1993) The  
significance of the metabolism  
of the neurohormone  
melatonin: Antioxidative  
protection and formation of  
bioactive substances. *Neurosci  
Biobehav Rev* 17: 347.

Harman D. (1996) Aging: a theory  
based on free radical and  
radiation chemistry 11: 298-  
300.

Hartley A, Stone JM, Heron C,  
Cooper JM, Schapira AH (1994)  
Complex I inhibitors induce  
dose-dependent apoptosis in  
PC12 cells: relevance to  
Parkinson's disease. *J  
Neurochem* 63 (5):1987-1990.

Hengartner MO, Horvitz HR  
(1994) *C elegans* cell survival  
gene *ced-9* encodes a  
functional homolog of the  
mammalian protooncogene  
*bcl-2*. *Cell* 76: 665-676.

Hensley K, Pye QN, Maitt ML,  
Stewart CA, Robinson KA,  
Jaffrey F, Floyd RA (1998)  
Interaction of alpha-phenyl-N-  
tert-butyl nitron and  
alternative electron acceptors  
with complex I indicates a

Herrero MT, Hirsch EC, Kastner A,  
Ruberg M, Luquin MR, Laguna  
J. (1993) Does neuromelanin  
contribute to the vulnerability  
of catecholaminergic neurons  
in monkeys intoxicated with  
MPTP? *Neuroscience* 56: 499-  
511.

Hill CE, Mark GE, Eranko O, Eranko  
L, Burnstock G (1973) Use of  
tissue culture to examine the  
actions of guanethidine and 6-  
hydroxydopamine. *Eur J  
Pharmacol* 23: 162-174.

Hirata F, Hayaishi O, Tokuyama T,  
Senoh S (1974) In vitro and in  
vivo formation of two new  
metabolites of melatonin. *J  
Biol Chem* 249: 1311.

Hirose T, Smith RJ, Jetten AM  
(1994) ROR gamma: the third  
member of ROR/RZR orphan  
receptor subfamily that is  
highly expressed in skeletal  
muscle. *Biochem Biophys Res  
Commun.* 205(3): 1976-1983.

Hirsch E, Graybiel AM, Agid YA.  
(1998) Melanized  
dopaminergic neurons are  
differentially susceptible to  
degeneration in Parkinson's  
disease. *Nature* 334: 345-348.

Hirsch E, Graybiel AM, Agid  
YA.(1989) Selective  
vulnerability of pigmented  
dopaminergic neurons in  
Parkinson's disease. *Acta*

- Neurol Scand Suppl 126: 19-22.
- Hirsch EC, Faucheux B, Damier P, Mouatt-Prigent A, Agid Y. (1997) Neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *J Neural Transm* 50 (suppl), 79-88.
- Hirsch EC, Hunot S. (2000) Nitric oxide, glial cells and neuronal degeneration in parkinsonism. *Trends Pharma Sci* 21 (5): 163-165.
- Hicks AA, Petursson H, Jonsson T, Stefansson H, Johannsdottir HS, Sainz J, Frigge ML, Kong A, Gulcher JR, Stefansson K, Sveinbjornsdottir S. (2002) A susceptibility gene for late-onset idiopathic Parkinson's disease. *Ann Neurol* 52: 549-555.
- Hornykiewicz O (1963) The tropical localization and content of noradrenalin and dopamine (3-hydroxytyramine) in the substantia nigra of normal person and patients with Parkinson's disease. *Wien Klin Wochenschr* 75: 309-312.
- Horowitz JM, Pastor DM, Goyal A, Kar S, Ramdeen N, Hallas BH, Torres G (2003) BAX protein-immunoreactivity in midbrain neurons of Parkinson's disease patients. *Brain Res Bul* 15;62(1):55-61.
- Hu Y, Benedict MA, Wu D, Inohara N, Núñez G (1998) Bcl-X<sub>L</sub> interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase 9 activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 4386-4391.
- Huang Y, Cheung L, Rowe D, Halliday G. (2004) Genetic contributions to Parkinson's disease. *Brain Res Rev* 46: 44-70.
- Huerto-Delgadillo L, Antón-Tay F, Benítez-King G (1994) Effects of melatonin on microtubule assembly depend on hormone concentration: Role of melatonin as a calmodulin antagonist. *J Pineal Res.* 17: 55.
- Hunot S, Boissiere F, Faucheux B, Brugg B, Mouatt-Prigent A, Agid Y, Hirsch EC. (1996) Nitric oxide synthase and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Neuroscience* 72: 355-363.
- Ianas O, Olnescu R, Bedescu I (1991) Melatonin involvement in oxidative stress. *Rom. J. Endocrinol.* 29:147.
- Ikebe S, Tanaka M, Ohno K, Sato W, Httori K, Kondo T, Mizuno Y, Ozawa T. (1990) Increase of deleted mitochondrial DNA in the striatum of Parkinson's disease and senescence. *Biochem Biophys Res Commun* 170: 1044.
- Ikebe SM, Tanaka M, Ozawa T. (1995) Point mutations of mitochondrial genome in Parkinson's disease. *Mol Brain Res* 28: 281.

- Ilnerova N, Backstrom M, Saaf J, Wetterberg L, Vangbo B (1978) Melatonin in rat pineal gland and serum: rapid parallel decline after light exposure at night. *Neurosci Lett* 9: 189.
- Itoh MT, Ishizuka B, Kuribayashi Y, Amemiya A, Sumi Y (1999) Melatonin, its precursors and synthesizing enzyme activities in the human ovary. *Mol Hum Reprod* 5: 402.
- Jellinger K, Kienzl E, Rumpelmair G, Riederer P, Stachelberger H, Ben Shachar D, Youdim MB. (1992) Iron-melanin complex in substantia nigra of parkinsonian brains: an X-ray microanalysis. *J Neurochem* 59: 1168-1171.
- Jellinger K, Paulus W, Grundke-Iqbal I, Riederer P, Youdim MB. (1990) Brain iron and ferritin in Parkinson's and Alzheimer diseases. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect* 2: 327-340.
- Jenner P, dexter DT, Suan J, Schapira AH, Marsden CD. (1992) Oxidative stress as a cause of nigral cell death in Parkinson's disease and incidental Lewy body disease. The Royal Kings and Queens Parkinson's disease Research Group. *Ann Neurol* 32 (suppl): S82-S87.
- Jha N, Jurma O, Lalli G, Liu Y, Pettus EH, Greenamyre JT, Liu RM, Forman HJ, Andersen JK (2000) glutathine depletion in PC12 results in selective inhibition of mitochondrial complex I activity. *J Biol Chem* 275 (34): 26096-26101.
- Jones RA, Smail A, Wilson MR (2002) Detecting mitochondrial permeability transition by confocal imaging of intact cells pinocytically loaded with calcein. *Eur. J. Biochem* 269: 3990-3997.
- Jordán, L (2003) Apoptosis: muerte celular programada. *OFFRAM* 22 (6):100-106.
- Juknat AA, Mendez Mdel V, Quaglino A, Fameli CI, Mena CI, Kotler ML (2005) Melatonin prevents hydrogen peroxide-induced Bax expression in cultured rat astrocytes. *J Pineal Res* 38(2):84-92.
- Karasek M, Winezyk K, Kunert-Radk J, Wiesenberg I Pawlikowski M (1998) Antoproliferative affects of melatonin and CGP52608 on the murine colon 38 adenocarcinoma in vitro and in vivo *Neuroendocrinol Lett* 19: 71-78.
- Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottavino Y, Davidson NE, Poirier GG (1993) Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* 53: 3976-3985.
- Kaventoy I (2002) Extrapineal melatonin in pathology: new perspectives for diagnosis, prognosis and treatment of

- illness. *Neuro Endocrinol Lett* 1: 92.
- Kerr JF, Wylie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257.
- Khaldy H, Escames G, León J, Vives F, Luna JD, Acuña-Castroviejo D (2000) Comparative effects of melatonin, L-deprenyl, Trolox and ascorbate in the suppression of hydroxyl radical formation during dopamine autoxidation in vitro. *J Pineal Res* 29(2): 100-107.
- Khaldy H, León J, Escames G, Martín M, Macías M, Acuña-Castroviejo D (2002). Circadian rhythm of dopamine and their metabolites in mouse striatum: Effects of pinealectomy and melatonin replacement. *Neuroendocrinology* 75:201-208.
- Khaldy H, Escames G, León J, Bikjdaouene L, Acuña-Castroviejo D (2003) Synergistic effects of melatonin and deprenyl against MPTP-induced mitochondrial damage and DA depletion. *Neurobiol Aging* 24(3): 491-500.
- Kilanczyk E, Bryszewska JJ (2003) The effect of melatonin on antioxidant enzymes in human diabetic skin fibroblasts. *Cell Mol Biol Lett* 8(2): 333-336.
- Kim TD, Paik SR, Yang CH, Kim J. (2000) Structural changes in alpha-synuclein affect its chaperone-like activity in vitro. *Protein Sci* 9: 9-18.
- Kim JS, He L, Lemasters JJ (2003) Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 304(3): 463-470.
- Kim DK, Natarajan N, Prabhakar NR, Kumar GK (2004) Facilitation of dopamine and acetylcholine release by intermittent hypoxia in PC12 cells: involvement of calcium and reactive oxygen species *J Appl Physiol* 96: 1206-1215.
- Kimpara T, Takeda A, Watanabe K, Itoyama Y, Ikawa S, Watanabe M, Arai H, Sasaki H, Higuchi S, Okita N, Takase S, Saito H, Takahashi K, Shibahara S. (1997) Microsatellite polymorphism in the human heme oxygenase-1 gene promoter and its application in association studies with Alzheimer and Parkinson's disease. *Hum Genet* 100: 145-147.
- King PA, Anderson VE, Edwards JO, Gustafson G, Plumb RC, Sugus JW. (1992) A stable solid that generates hydroxyl radical upon dissolution in aqueous solution: reaction with proteins and nucleic acids. *J Am Chem Soc* 114: 5430.
- Kirpekar SM, Nobiletti J, Trifaro JM (1983) Effect of 6-hydroxydopamine on bovine

- adrenal chromaffin cells in culture. *Br J Pharmacol* 79: 947-952.
- Kish SJ, Moritto C, Hornykiewicz O. (1985) Glutathione peroxidase activity in Parkinson's disease brain. *Neurosci Lett* 58: 343-346.
- Klein DC (1985) Photoneural regulation of the mammalian pineal gland. *Ciba Found Symp* 117: 38-56.
- Kondo T, Kinouchi H, Kawase M, Yoshimoto T (1996) Differential response in the release of hydrogen peroxide between astroglial cells and endothelial cells following hypoxia/reoxygenation. *Neurosci Lett* 215(2):103-106.
- Kopin IJ, Pare CMB, Axelrod J, Weissbach H (1961) The fate of melatonin in animals. *J Biol Chem* 236: 3072.
- Kosel S, Hofhaus G, Maassen A, Vieregge P, Graeber MB. (1999) Role of mitochondria in Parkinson's disease. *Biol Chem* 380: 865-870.
- Kroemer G (1997) The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat Med* 3(6):614-20.
- Kroemer G, Reed JC (2000) Mitochondrial control of cell death. *Nature Med* 6: 513-519.
- Kruger R, Kuhn W, Muller T, Woitalla D, Graeber M, Kosel S, Przuntek H, Epplen JT, Schols L, Ress O. (1998) Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat. Genet* 18:0106-108.
- Kudla G, Montessuit S, Eskes R, Berrier C, Martinou JC, Ghazi A, Antonsson B (2000) The destabilization of lipid membranes induced by the C-terminal fragment of caspase 8-cleaved bid is inhibited by the N-terminal fragment. *J Biol Chem* 275(30):22713-8.
- Kumagai HE, Nishida E, Kotani S, Sakai H (1986) On the mechanism of calmodulin induced inhibition of microtubule assembly in vitro. *J Biochem.* 99: 521.
- Kushareva Y, Murphy AN, Andreyev A (2002) Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome *c* and NAD(P)<sup>+</sup> oxidation-reduction state. *Biochem J* 46 (12): 545-553.
- Laitinen JT, Saavedra JM (1990) Characterization of melatonin receptors in the rat suprachiasmatic nuclei: modulation of affinity with cations and guanine nucleotides. *Endocrinology* 124: 1585.
- Lamensdorf I, Eisenhofer G, Harey-White J, Nechustan A, Kirk K, Kopin IJ (2000) 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde potentiates the toxic effects



- of metabolic stress in PC12 cells. *Brain Res* 868: 191-201.
- Landsberg L, Young J (1994) Fisiología y farmacología de sistema nervioso autónomo. Edición *Principios de Medicina Interna* 13ª edición España-Internacional-McGraw Hill, vol 1: 481-497.
- Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I. (1983) Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 219: 979-980.
- Le Couteur DG, McLean AJ, Taylor MC, Woodham BL, Board PG. (1999) Pesticides and Parkinson's disease. *Biomed Pharmacother* 53: 122-30.
- Lee PPN, Pang SF (1991) Identification and characterization of melatonin binding and characterization of melatonin binding at same site as the respiratory inhibitor, rotenone. *Biochem Res Comm* 169:1123.
- Lefebvre P, Baub mP, Tahayato A, Rochette-Egly C, Formstcher P (1995) Protein phosphatases 1 and 2 regulate the transcriptional and DNA binding activities of retinoic acid receptors. *J Biol Chem* 270: 10806-10816.
- Leist M, Single B, Castoldi AF, Kuhnle S, Nicotera P (1997) Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med* 185(8):1481-1486.
- Lenaz G. (1998) Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. *Biochem Biophys Acta* 1366:53.
- León J, Vives F, Crespo E, Camacho E, Espinosa A, Gallo MA, Escames G, Acuña-Castroviejo D (1998a) Modification of nitric oxide synthase activity and neuronal response in rat striatum by melatonin and kynurenine derivatives. *J Neuroendocrinol* 10(4) 297-302.
- León J, Vives F, Gomez I, Camacho E, Gallo M.A., Espinosa A, Escames G, Acuña-Castroviejo, D (1998b) Modulation of rat striatal glutamatergic response in search for new neuroprotective agents: evaluation of melatonin and some kynurenine. *Brain Res Bull.* 45(5):525.
- León J, Macías M, escames G, Camacho E, khaldy H, Martín M, Espinosa A, gallo MA, Acuña-Castroviejo (2000) Structure-related inhibition of calmodulin-dependent neuronal nitric-oxide synthase activity by melatonin and synthetic kinurenines. *Mol Pharmacol* 54(5): 957-975.
- León J, Acuña-Castroviejo D, Saínz RM, Mayo JC, Tan DX, Reiter RJ (2004) Melatonin and

- mitochondrial function. *Life Sci* 75: 795-790.
- Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W (1958) Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J Am Chem Soc* 80: 2587-2592.
- Levey G, Bodell WJ. (1993) Detection of dopamine-DNA adducts: potential role in Parkinson's disease. *Carcinogenesis* 14: 1241-1245.
- Leveugle B, Faucheux BA, Bouras C, Nillesse N, Spik G, Hirsch EC, Agid Y, Hof PR. (1996) Cellular distribution of the iron-binding protein lactotransferrin in the mesencephalon of Parkinson's disease cases. *Acta Neuropathol (Berl)* 91: 566-572.
- Li P, Nijhawam D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmab M, Alnemri ES, Wang X (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase 9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91: 479-489.
- Liou HH, Tsai MC, Chen CJ. (1997) Environmental risk factors and Parkinson's disease: a case-control study in Taiwan. *Neurology* 48: 1583-1588.
- Liu C, Weaver DR, Jin X, Shearman LP, Pieschl RL, Gribkoff VK, Reppert SM (1997) Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the suprachiasmatic circadian clock. *Neuron* 19(1): 91-102.
- Liu HQ, Zhu XZ, Weng EQ (2005) Intracellular dopamine oxidation mediates rotenone-induced apoptosis in PC12 cells. *Acta Pharmacol Sin* 26(1):17-26.
- Loeffler M, Kroemer G (2000) The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp Cell Res* 256: 19-26.
- López-Burillo S, Tan DX, Rodríguez-Gallego V, Manchester LC, Mayo JC, Sainz RM, Reiter RJ (2003) Melatonin and its derivatives cyclic 3-hydroxymelatonin, N<sup>1</sup>-acetyl-N<sup>2</sup>-formyl-5-methoxykynuramine and 6-methoxymelatonin reduce oxidative DNA damage induced by Fenton reagents. *J Pineal Res* 34(3): 178-184.
- Lorenzo HK, Susin SA, Penninger J, Kroemer G (1999) Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. *Cell Death Differ* 6: 516-524.
- Macías M, Rodríguez-Cabezas M, Reiter RJ, Osuna A, Acuña-Castroviejo D (1999) Presence and effects of melatonin in trypanosome cruzi. *J Pineal Res* 27 (2):86-94.
- Macias M, Escames G, Leon J, Coto A, Sbihi Y, Osuna A, Acuna-Castroviejo D (2003)

- Calreticulin-melatonin. An unexpected relationship. *Eur J Biochem* 270(5): 832-840.
- Madesh M, Hajnoczky G (2001) VDAC-dependent permeabilization of the outer mitochondrial membrane by superoxide induces rapid and massive cytochrome c release. *J Cell Biol* 155(6):1003-1015.
- Manfredi G, Yang L, Gajewski CD, Mattizzzi M (2002) Measurements of ATP in mammalian cells. *Methods* 26 317-376.
- Mann DM, Yates PO. (1983) Possible role of neuromelanin in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Mech Ageing Dev* 21: 193-203.
- Marangos PJ, Patel J, Hirata F, Sondhein D, Paul SM, Skolnick P, Goodwin FK (1981) Inhibitor of diazepam binding by tryptophan derivatives including melatonin and its metabolite N-acetyl-5-methoxy kynurenamine. *Life Sci* 29: 259-267.
- Martinou JC, Green DR (2001) Breaking the mitochondrial barrier. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(1): 63-67.
- Martín M, Macías M, Escames G, León J, Acuña-Castroviejo D (2000a) Melatonin but not vitamins C and E maintains glutathione homeostasis in t-butyl hydroperoxide-induced mitochondrial oxidative stress. *FASEB J* 14(12): 1677-1679.
- Martín M, Macías M, Escames G, Reiter RJ, Agapito MT, Ortiz GG, Acuña-Castroviejo (2000b) 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* 28(4): 242-248.
- Martín M, Macías M, León J, Escames G, Khaldy H, Acuña-Castroviejo D (2002) 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* 34(4): 348-357.
- Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Jürgensmeier JM, Susin SA, Vieira HL, Prevost MC, Xie Z, Matsuyama S, Reed JC, Kroemer G (1998) Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science* 281(5385): 2027-2031.
- Matsko CM, Hunter OC, Rabinowich H, Lotze MT, Amoscato AA (2001) Mitochondrial lipid alterations during Fas- and radiation-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 287(5): 1112-1120.
- Matthews SA, Evans KL, Morgan WW, Petterborg LJ, Reiter RJ (1982) Pineal indoleamine metabolism in the cotton rat, *Sigmodon hispidus*: studies on norepinephrine, serotonin, N-acetyltransferase activity and

- melatonin. *Prog Clin Biol Res* 92: 35-44.
- Maurizi CP (2001) Alzheimer disease: roles for mitochondrial damage, the hydroxyl radical and cerebrospinal fluid deficiency of melatonin. *Med Hypotheses* 57(2): 156-160.
- Mayo JC, Saínz RM; Uria H, Antolín I, Esteban MM, Rodríguez C (1998) Melatonin prevents apoptosis induced by 6-hydroxydopamine in neuronal cells: implications for Parkinson's disease. *J Pineal Res* 24(3): 179-192.
- Mayo JC, Sainz RM, Antolin I, Rodríguez C (1999) Ultrastructural confirmation of neuronal protection by melatonin against the neurotoxin 6-hydroxydopamine cell damage. *Brain Res* 818: 221-227.
- McCord CO, Allen EP (1917) Evidences associating pineal gland function with alterations in pigmentation. *J Exp Zool* 23: 207.
- McGeer EG, McGeer PL. (1997) The role of the immune system in neurodegenerative disorders. *Mov Disord* 12: 855-858.
- McGeer PL, Itagaki S, Akiyama H, McGeer EG. (1988) Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurochem* 70; 2406-2415.
- Meldrum B, Whiting PJ. (1990) Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends Pharmacol, Sci* 11: 379.
- Melen-Mucha G, Winczyk K, Pawlikowski M (1998) Somatostatin analogue oxtreotide and melatonin inhibit bromodeoxyuridine incorporation into cell nuclei and enhance apoptosis in the transplantable murine colon 38 cancer. *Anti-cancer Res* 18: 3615-3620.
- Menegon A, Board PG, Blackburn AC, Mellick GD, Le Couteur DG (1998) Parkinson's disease, pesticides, and glutathione transferase poly-morphisms. *Lancet* 352: 1344-1346.
- Menéndez-Peláez A, Howes KA, Gonzalez-Brito RJ, Reiter RJ (1987) N-acetyltransferase activity, hydroxyindole-O-methyltransferase activity and melatonin levels in the Harderian glands of the female syrian hamster: changes during the light:dark cycle and the effect of 6-parachlorophenylalanine administration. *Biochem Biophys Res Commun* 145: 1231.
- Menendez-Pelaez A, Reiter RJ. (1993) Distribution of melatonin in mammalian tissues: The relative importance of nuclear versus cytosolic localisation. *J Pineal Res* 15:59.

- Menéndez-Peláez A, Rodríguez C, Domínguez P (1991)  $\delta$ -animolevulinate synthase mRNA levels in the Harderian glands of Syrian hamsters: Correlation with porphyrin concentrations and regulation by androgens and melatonin. *Mol Cell Endocrinol* 80: 177.
- Mennenga K, Ueck M, Reiter RJ (1991) Immunohistological localization of melatonin in the pineal gland and retina of the rat. *J Pineal Res* 10: 159.
- Michel PP, Hefti (1990) Toxicity of 6-hydroxidopamine and dopamine for dopaminergic neurons in culture. *J Neurosci Res* 26: 428-435.
- Michikawa Y, Mazzucchelli F, Brespñom N, Scarlato G, Attardi G. (1999) Aging-dependent large accumulation of point mutations in the human mtDNA control region for replication. *Science*. 286: 774.
- Mitchell P, Moyle J (1967) Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation. *Nature* 313(72): 137-139.
- Mizuno Y, Ohta S, Tanaka M, Takamiya S, Suzuki K, Sato T. (1989) Deficiencies in complex I subunits of the respiratory chain in Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 163: 1450-1455.
- Molina-Carballo A, Muñoz-Hoyos A, Reiter RJ, Sanchez-Fortem M, Moreno-Madrid F, Rufo-Campos M, Molina-Font JA, Acuña-Castroviejo D (1997) Utility of high dose of melatonin as adjunctive anticonvulsant therapy in a child with severe myoclonic epilepsy: two years' experience. *J Pineal Res* 23: 97-105.
- Moore RY, Klein DC (1974) Visual pathways and the central neural control of a circadian rhythm in pineal serotonin N-acyltransferase activity. *Brain Res* 71: 17.
- Moreno JJ, Ptyor WA. (1992) Inactivation of  $\alpha$ -1-proteinase inhibitor by peroxynitrite. *Chem Res Toxicol* 5:425.
- Moreno-Sánchez R, Hogue BA, Bravo C, Newman AH, Basile AS, Chiang PK (1991) Inhibition of substrate oxidation in mitochondria by the peripheral-type benzodiazepine receptor ligand AHN 086. *Biochem Pharmacol* 41: 1479-1484.
- Nagle CA, Neuspiller NR, Cardinali DP, Rosner JM (1972) Uptake and effect of 17  $\beta$ -estradiol on pineal hydroxy-indole-O-methyl transferase (HIOMT) activity. *Life Sci* 11(22): 1109-1116.
- Nakanishi S. (1992) Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain functions. *Science* 258: 597.
- Naoki M, Dostert P, Yoshida M, Nagatsu T (1993) N-methylat

- tetraisoquinoline as dopaminergic neurotoxins. *Adv Neurol* 60: 212.
- Napolitano A, Cesura AM, Da Prada M (1995) The role of monoamine oxidase and catechol O-methyltransferase in dopaminergic neurotransmission. *J Neural Transm Suppl* 45:35-45.
- Nicholls DG, Budd SL. (2000) Mitochondrial and neuronal survival. *Physiol Rev* 80: 315.
- Nicholson DW, Thornberry NA (1997) Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* 22: 299-306.
- Nicklas WJ, Vyas I, Heikkila RE. (1985) Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *Life Sci* 36: 2503-2508.
- Nohl H, Henger, D. (1978) Do mitochondria produce oxygen free radicals in vivo? *Eur J Biochem* 82: 563.
- Núñez G, del Peso L (1998) Linking extracellular survival signals and the apoptotic machinery. *Curr Op Neurobiol* 8: 613-618.
- Obeso JA, Rodríguez-Oroz MC, Zamarrubide I. (2002) Enfermedad de Parkinson. Perspectivas. Enfermedades neurodegenerativas. Cap 6: 71-83. *Navarra*.
- Obeso JA. (2000) Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. *TINS* 23(suppl): S8-S19.
- Olney Jw, Ho OL, Rhee V. (1971) Cytotoxic effects of acidic amino acids on the infant mouse central nervous system. *Exp. Brain. Res.* 14: 61.
- Olcese J, Moller M (1989) Characterization of serotonin N-acetyltransferase activity in the retina of the Mongolian gerbil, *Meriones unguiculatus*. *Neurosci Lett* 102(2-3): 235-240.
- Oltvai, ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ (1993) Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74: 609-619.
- Ortiz GG, Crespo-López ME, morán-Moguel C, García JJ, Reiter RJ, Acuña-Castroviejo D (2001) Protective role of melatonin against MPTP-induced mouse brain cell DNA fragmentation and apoptosis in vivo. *Neuro Endocrinol Lett* 22(2): 101-108.
- Othman AI, El-Missiry MA, Amer MA (2001) The protective action of melatonin on indomethacin-induced gastric and testicular oxidative stress in rats. *Redox Rep* 6(3): 173-177.
- Ouyang H, Voegel HJ. (1998) Melatonin and serotonin interactions with calmoduline: NMR, spectroscopic and

- biochemical studies. *Biochem Biophys Acta* 1383(1):37-47.
- Ozawa T. (1995) Mitochondrial DNA mutations associated with aging and degenerative disease. *Exp Gerontol* 30:269.
- Pablos MI, Riter RJ, Ortiz GG; Guerrero JM, agapito MT, Chuang JI, Sewerynek E (1998) Rhythms of glutathione peroxidase and glutathione reductase in brain of chick and their inhibition by light. *Neurochem Int* 32(1): 69-75.
- Pang SF, Yu HS, Suen HC, Brown GM (1980) Melatonin in the retina of rats: a diurnal rhythm. *J Endocrinol* 87: 89.
- Panov AV, Andreeva L, Greenamyre T (2004) Quantitative evaluation of the effects of mitochondrial permeability pore modifiers on accumulation of calcium phosphate: comparison of rat liver and brain mitochondria. *A Biochem Biophys* 424: 44-52.
- Papadopoulos V, Amri H, Boujrad N, Cascio C, Culty M, Gamier M, Hardwick M, Li H, Vidic B, Brown AS, Reversa JL, Bernassau JM, Drieu K (1997) Peripheral benzodiazepine receptor in cholesterol transport and steroidogenesis. *Steroids* 62: 21-28.
- Pappolla MA, Sos M, Omar RA, Bick RJ, Hickson-Bick DL, Reiter RJ, Efthimiopoulos S, Robakis NK (1997) Melatonin prevents death of neuroblastoma cells exposed to the alzheimer amyloid peptide. *J Neurosci* 17: 1683-1690.
- Pardridge WM, Mietus LJ (1980) Transport of albumin-bound melatonin through the blood-brain barrier. *J Neurochem* 34: 1761.
- Parent A, Parent M, Levesque M. (1999) Basal ganglia and Parkinson's disease: an anatomical perspective. *Neurosci News* 2: 19-26.
- Parker WD Jr, Boyson SJ, Parks JK. (1989) Abnormalities of the electron transport chain in idiopathic Parkinson's disease. *Ann Neurol* 26: 719-723.
- Parrizas M, Saltiel AR, LeRoith D (1997) Insuline-like growth factor 1 inhibits apoptosis using the phosphatidylinositol 3'-kinase and mitogen-activated proteinkinase pathways. *J Biol Chem* 272: 154-161.
- Parsons DF, Williams GR, Chance B. (1965) Characteristics of isolated and purified preparations of the outer and inner membranes of mitochondria. *Ann. New York Acad Sci* 643.
- Pastorino Jg, Tafani M, Rothman RJ, Marcinkeviciute A, Hoek JB, Farber JL (1999) Functional consequences of sustained or transient activation by Bax of the

- mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem* 274: 31734-31739.
- Pastorino JG, Shulga N, Hoel JB (2002) Mitochondrial binding of hexokinase II inhibits Bax-induced cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem* 277: 7610-7618.
- Pautler EL, Hall FL (1987) Movement of melatonin across the retinal pigment epithelium. *Exp Eye Res* 45: 351.
- Pellegrini-Giampietro DE, Cherici G, Alesiani M, Caria V, Moroni F (1990) Excitatory amino acid release and free-radical formation may cooperate in the genesis of ischaemia-induced neuronal damage. *J Neurosci* 10: 1035-1041.
- Pereira CMF, Oliveira CR. (1996) Glutamate toxicity on a PC12 cell line involves glutathione (GSH) depletion and oxidative stress. *Neurosci Lett*. 210:9.
- Persengiev SP (1992) 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonin binding sites in rat adrenals: Pharmacological characteristics and subcellular distribution. *Life Sci*. 51: 647.
- Petrovitch H, Ross GW, Abbott RD. (2002) Planation work and risk of Parkinson's disease in a population-based longitudinal study. *Arch Neurol* 59: 1787-1792.
- Pieri C, Marra M, Moroni F, Pecchioni R, Marcheselli F (1994) Melatonin: A peroxy radicals scavenger more potent than vitamin E. *Life Sci*. 55:PL271.
- Pietz K, Odin P, Funa K, Lindvall O (1996) Protective effect of platelet-derived growth factor against 6-hydroxydopamine-induced lesion of rat dopaminergic neurons in culture. *Neurosci Lett* 204: 101-104.
- Pissarek M, Reinhardt R, Reichelt R, Manaenko A, Krauss GJ, Illes P (1999) Rapid assay for one-run determination of purine and pyrimidine nucleotide contents in neocortical slices and cell cultures. *Brain Res Protocols* 4: 314-321.
- Pittman RN, Wang AJ, Di Benedetto JC, Mills (1993) A system for characterizing cellular and molecular events in programmed neuronal cell death. *J Neurosci* 13: 3669-3680.
- Poeggeler B (1993) Introduction. Melatonin and the light-dark zeitgeber in vertebrates, invertebrates and unicellular organisms. *Experientia* 49(8): 611-613.
- Poeggeler B, Saarela S, Reiter RJ, Tan DX, Chen LD, Manchester LC, Barlow-Walden LR (1994) Melatonin--a highly potent endogenous radical scavenger and electron donor: new aspects of the oxidation



- chemistry of this indole accessed in vitro. *Ann N Y Acad Sci* 738:419-20.
- Poon AM, Pang SF (1992) 2-[<sup>125</sup>I]iodomelatonin binding sites in spleens of quinea pigs. *Life Sci*. 50: 1719.
- Pozo D, Reiter RJ, Calvo JR, Guerrero JM (1994) Physiological concentrations of melatonin inhibit nitric oxide synthase in rat cerebellum. *Life Sci* 55(24): PL455-PL460.
- Pozo D, Reiter RJ, Calvo JR, Guerrero JM. (1997) Inhibition of cerebellar nitric oxide synthase and cyclic GMP production by melatonin via complex formation with synergistically with the chainbreaking antioxidant ascorbate, trolox and glutathione. *Neuroendocrinology Lett* 17:87.
- Pryor WA (1982) Free radical biology: xenobiotics, cancer, and aging. *Ann N Y Acad Sci* 393:1-22.
- Qin L, Wang X, Duan Q, Chen B, He S (2004) Inhibitory effect of melatonin on the growth of H22 hepatocarcinoma cells by inducing apoptosis. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 24(1):19-21, 31.
- Quay WB (1963) Circadian rhythm in rat pineal serotonin and its modifications by estrous cycle and photoperiod. *Gen Comp Endocrino* 14: 473-479.
- Quijano, T. (2001) Demencia de los cuerpos de Lewy. *Alzheimer 2001: teoría y práctica*. Cap 10: 147-157.
- Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA (1991) Peroxynitrite induced membrane lipid peroxidation. The cytotoxic potential of superoxide and nitrite oxide. *Arch Biochem Biophys* 288:481.
- Ramsay RR, Krueger MJ, Youngster SK, Gluck MR, Casida JE, Singer TP (1991) Interaction of 1-methyl-4-phenyl-pyridinium ion (MPP+) and its analogs with the rotenone/piericidin binding site of NADH dehydrogenase. *J Neurochem* 56: 1184-1190.
- Raynal P, Pollard HB (1994) The problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium and phospholipid-binding proteins. *Biochem Biophys Acta*. 1197: 63-93.
- Reed JC (1998) Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 17: 3225-3236.
- Reiter RJ (1991a) Melatonin: that ubiquitously acting pineal hormone. *News Physiol Sci* 6: 223.
- Reiter RJ (1991b) Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and

- of its physiological interactions. *Endocrine Rev* 12: 151.
- Reiter RJ, Tan DX, Poeggeler B, Menendez-Pelaez A, Chen LD, Saarela (1994) Melatonin as a free radical scavenger: implications for aging and age-related diseases. *Ann N Y Acad Sci*. 719:1-12.
- Reiter RJ (1995) The role of the neurohormone melatonin as a buffer against macromolecular oxidative damage. *Neurochem Int* 27(6): 453-460.
- Reiter RJ (1997) Antioxidant actions of melatonin. *Adv. Pharmacol.* 38:103.
- Reiter RJ (1988) Neuroendocrinology of melatonin. En: Miles A, Phibrick DRS, Thomposon C (eds) Melatonin: Clinical Perspectives. Oxford University Press, Oxford UK. pag 1.
- Reiter RJ (1998) Oxidative damage in the central nervous system: Protection by melatonin. *Prog. Neurobiol.* 56: 359.
- Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E (2000) Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. *J Biom Sci* 7(3): 444-458.
- Reiter RJ, Tan DX (2002) Melatonin: an antioxidant in edible plants. *Ann NY Acad Sci* 957(1): 341-344.
- Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Lopez-Burillo S, Sainz RM, and Mayo JC (2003a) Melatonin: detoxification of oxygen and nitrogen-based toxic reactants. *Adv Exp Med Biol* 527: 539-548.
- Reiter RJ, Tan DX. What constitutes a physiological concentration of melatonin? (2003b) *J Pineal Res* 34(1): 79-80.
- Reppert SM, Weaver R, Godson C (1996) Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. *Trends Pharmacol Sci* 17: 100.
- Reppert SM. (1997) Melatonin receptors: Molecular biology of a new family of G protein-coupled receptors. *J Biol Rhythms* 12(6):528.
- Reyes-Toso CF, Ricci CR, de Mignone IR, Reyes P, Linares LM, Albornoz LE, Cardinali DP, Zaninovich A (2003) In vitro effect of melatonin on oxygen consumption in liver mitochondria of rats. *Neuro Endocrinol Lett* 24(5): 341-344.
- Riederer P, Sofic E, Rausch WD, Schimdt B, Reynolds G (1989) Transition metals, ferritin, glutathione and ascorbic acid in Parkinsonian brains. *J Neurochem* 52: 515-20.
- Rivkees SA, Cassone VM, Weaver DR, Reppert SM (1989a) Melatonin receptors in chick

- brain: characterization and localization. *Endocrinology* 125: 363.
- Rivkees SA, Weaver DR, Reppert SM (1989b) Guanine nucleotide-binding protein regulation of melatonin receptors in lizard brain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 86: 3882.
- Rodríguez C, Mayo JC, Saínz RM, Antolín I, Herrera F, Martín V, Reiter RJ (2004) Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res* 36(2): 1-9.
- Rosenstein RE, Cardinali DP (1990). Central GABAergic mechanism as target for melatonin activity in brain. *Neurochem Int* 17: 373-379.
- Rudel T, Bokoch GM (1997) Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. *Science* 276: 1571-1574.
- Rukenstein A, Ryedel RE, Greene LA (1991) Multiple agents rescue PC12 cells from serum-free cell death by translation and transcription independent mechanisms. *J Neurosci* 11: 2552-2563.
- Sack RL, Lewy AJ, Erb DL, Vollmer WM, Singer CM (1986) Human melatonin production decreases with age. *J Pineal Res*. 3: 379.
- Saínz RM, Mayo JC, Rodríguez C, Tan DX, López-Burillo S, Reiter RJ (2003) Melatonin and cell death: differential actions on apoptosis in normal and cancer cells. *Cell Mol Life Sci* 60(7): 1407-1426.
- Saito M, Korsmeyer SJ, Schlesinger PH (2000) BAX-dependent transport of cytochrome c reconstituted in pure liposomes. *Nat Cell Biol* 2(8):553-5.
- Salvi M, Fiore C, Battaglia V, Palermo M, Armanini D, Toninello A (2005) Carbenoxolone induces oxidative stress in liver mitochondria, which is responsible for transition pore opening. *Endocrinology* 146(5): 2306-2312.
- Sanchez-Ramos JR, Övervik E, Ames BN. (1994) A marker of oxyradical-mediated DNA damage (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine) is increased in nigro-striatum of Parkinson's disease brain. *Neurodegeneration* 3: 197-204.
- Sarkela TM, Berthiaume J, Elfering S, Gybina AA, Giullivi C (2001) The modulation of oxygen radical production by nitric oxide in mitochondria. *J Biol Chem* 276 (10): 6945-6949.
- Schräder M, Danielsson C, Wiesenberg I, Carlberg C (1996). Identification of natural monomeric response elements of the nuclear receptor RZR/ROR. They also bind COUP-TF homodimers. *J Biol Chem*. 271: 19732.

- Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Jenner P, Clark JB, Marsden CD. (1989) Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Lancet* 1: 1269.
- Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P, Marsden CD. (1990) Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease.
- Schapira AH, Cooper JM. (1992). Mitochondrial function in neurodegeneration and ageing. *Mutat Res* 275: 133.
- Schapira AH. (1998) Human complex I defects in neurodegenerative diseases. *Biochem Biophys Acta* 1364: 261-270.
- Schwarz J (2003) Rationale for dopamine agonist use as monotherapy in Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol* 16 Suppl 1:S27-33.
- Seaton TA, Cooper JM, Schapira AH (1997) Free radical scavengers protect dopaminergic cell lines from apoptosis induced by complex I inhibitors. *Brain Res* 28;777(1-2):110-118.
- Seaton TA, Cooper JM, Schapira AHV (1998) Cyclosporin inhibition of apoptosis by mitochondrial complex I toxins. *Brain Res* 809: 12-17.
- Semchuk KM, Love EI, Lee RG. (1992) Parkinson's disease and exposure to agricultural work and pesticide chemicals. *Neurology* 42: 1328-1335.
- Shamoto-Nagai M, Maruyama W, Kato Y, Isobe K, Tanaka M, Naoi M, Osawa T (2003) An inhibitor of mitochondrial complex I, rotenone, inactivates proteasome by oxidative modification and induces aggregation of oxidized proteins in SH-SY5Y cells. *J Neurosci Res* 74: 589-597.
- Sherer TB, Trimmer PA, Borland K, Parks JK, Bennet JP Jr, Tuttle JB. (2001) Chronic reduction in complex I function alters calcium signalling in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Brain Res* 891 :94-105.
- Sherer TB, Betarbet R, Greenamyre T. (2002a) Environment, mitochondria and Parkinson's disease. *The Neuroscientist* 1073: 8584.
- Sherer TB, Betarbet R, Stout AK, Lund S, Baptista M, Panov AV, Cookson MR, Greenamyre JT (2002b) An in vitro model of Parkinson's disease: linking mitochondrial impairment to altered alpha-synuclein metabolism and oxidative damage. *J Neurosci* 22: 7006-7015.
- Sherer TB, Betarbet R, Testa CM, Seo BB, Richardson JR, Kim JH, Miller GW, Yagi T, Matsuno-Yagi A (2003) Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease. *J Neurosci* 23 (34); 10756-10764.

- Shimizu S, Konishi A, Kodama T, Tsujimoto Y (2000) BH4 domain of antiapoptotic Bcl-2 family members closes voltage-dependent anion channel and inhibits apoptotic mitochondrial changes and cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(7): 3100-3105.
- Sian J, Dexter DT, Lees AJ, Daniel S, Agid Y, Javoy-Agid F, Jenner P, Marsden CD (1994) Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. *Ann Neurol* 36(3):348-355.
- Singh D, Chander V, Chopra K (2005) Cyclosporine protects against ischemia/reperfusion injury in rat kidneys. *Toxicology* 207(3):3 39-347.
- Skene DJ, Vivien-Roels B, Sparks DL, Hunsaker JC, Pevet P, Ravid D, Swaab DF(1990) Daily variation in the concentration of melatonin and 5-methoxytryptophol in the human pineal gland: effect of age and Alzheimer's disease. *Brain Res* 528(1): 170-174.
- Skulachev VP (1999) Mitochondrial physiology and pathology; concepts of programmed death of organelles, cells and organisms. *Mol Aspects Med* 20(3):139-184.
- Sohal RS. (1993) The free radical hypothesis of aging: an appraisal of the current status. *Aging Clin Exp Res* 5: 3-17.
- Spenger C, Haque NS, Studer L, Evtouchenko L, Wagner B, Buhler B, Lendahl U (1996) Fetal ventral mesencephalon of human and rat origin maintained in vitro and transplanted to 6-hydroxidopamine-lesioned rats gives rise to grafts rich in dopaminergic neurons. *Exp Brain Res* 112: 47-57.
- Spillantini MG, Schmidt ML, Lee WMY, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. (1997) Alfa-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388:839-840.
- Stefulj J, Hortner M, Ghosh M, Schauenstein K, Rinner I, Wolfler A, Semmler J, Liebmann PM. (2001) Gene expression of the key enzymes of melatonin synthesis in extrapineal tissues of the rat. *J Pineal Res* 30(4):243-247.
- Stefulj JM, Hörthner M, Ghosh K,, Schanenstein I, Rinner A, Wölfer J, and Tieman PM. (2001) Gene expression of the key enzymes of melatonin synthesis in extrapineal tissues of the rat. *J Pineal Res* 30:243.
- Steinhilber D, Brungs M, Werz O, Wiesenberg I, Danielsson C, Kahlen JP, Nayeri S, Schrader M, Carlberg C (1995) The nuclear receptor for melatonin represses 5-lipoxygenase gene expression in human B

- lymphocytes. *J Biol Chem.* 270(13):7037-40.
- Steinhilber D, Carlberg C (1999) Melatonin receptor ligands. *Exp Opin Ther Patents* 9: 281.
- Stewart VC, Heales SJR. (2003) Nitric oxide-induced mitochondrial dysfunction: implications for neurodegeneration. *Free Rad Biol & Med* 34 (3): 287-303.
- Stoebner PE, Carayon P, Penarier G, Frechin N, Barneon G, Casellas P, Cano JP, Meynadier J, Meunier L (1999) The expression of peripheral benzodiazepine receptors in human skin: the relationship with epidermal cell differentiation. *British J Dermatol* 140: 1010-1016.
- Sugden D (1979) Circadian change in rat pineal tryptophan content: lack of correlation with serum tryptophan. *J Neurochem* 33(3): 811-813.
- Sugden D, Cena V, Klein DC (1987) Hydroxyindole O-methyltransferase. *Methods Enzymo* 142: 590-596.
- Sugden D, Pichering H, The MH, Garrat PJ. (1997) Melatonin receptors pharmacology toward subtype specificity. *Biol Cell* 89:531.
- Sulzer D, Bogulavsky J, Larsen KE, Behr G, Karatekin E, Kleinman MH. (2000) Neuromelanin biosynthesis is driven by excess cytosolic catecholamines not accumulated by synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 11869-11874.
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marco I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Constantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersol R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer DR (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397: 441-446.
- Sutton VR, Vaux DL, Trapani JA (1997) Bcl-2 prevents apoptosis induced by perforin and granzyme B, but not that mediated by whole cytotoxic lymphocytes. *J Immunol* 158: 5783-5790.
- Swerdlow RH, Parks JK, Miller SW, Tuttle JB, Trimmer PA, Sheehan JP, Bennett JP Jr, Davis RE, Parker WD Jr (1996) Origin and functional consequences of the complex I defect in Parkinson's disease. *Ann Neurol* (4):663-71.
- Szmuskowicz AW; Heinzelman RV (1960) Synthesis of N-acetylmethoxy-tryptamine. *J Org Chem* 25: 287.
- Tai KK, Troung DD (2002) Activation of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels confers protection against rotenone-induced cell death:

- therapeutic implications for Parkinson's disease. *J Neurosci Res* 69(4):559-566.
- Tai KK, McCrossan ZA, Abbott GW (2003) Activation of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels increases cell viability against rotenone-induced cell death. *J Neurochem* 84(5):1193-200.
- Tan DX, Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC, Reiter RJ (1993) Melatonin: a potent endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocrine J* 1: 57.
- Tan S, Wood M, Maher P. (1998) Oxidative stress induces a form of programmed cell death with characteristics of both apoptosis and necrosis in neuronal cells. *J Neurochem* 71: 95.
- Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi WB, Zhang M, Weintraub ST, Cabrera J, Sainz RM, Mayo JC. (1999a) Identification of highly elevated levels of melatonin in bone marrow: its origin and significance. *Biochem Biophys Res Commun* 273 (1): 17-21.
- Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi W, Hanes MA, F NJ. (1999b) High physiological levels of melatonin in the bile of mammals. *Life Sci* 65: 2523.
- Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Plummer, Limson BF, Weintraub ST, Qi W (2000) Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: a potentially new metabolic pathway of melatonin biotransformation. *Free Radic Biol Med* 29(11): 1177-1185.
- Tan DX, Hardeland R, Manchester LC, Poeggeler B, Lopez-Burillo S, Mayo JC, Sainz RM, Reiter RJ (2003) Mechanistic and comparative studies of melatonin and classic antioxidants in terms of their interactions with the ABTS cation radical. *J Pineal Res* 34 (4): 249-259.
- Tan DX, Manchester LC, Sainz RM, Mayo JC, León J, Hardeland R, Poeggeler B, Reiter RJ (2005) Interactions between melatonin and nicotinamide nucleotide: NADH preservation in cells and in cell-free systems by melatonin. *J Pineal Res* 39(2):185-194.
- Taylor SC, Shaw SM, Peers C (2000) Mitochondrial inhibitors evoke catecholamine release from pheochromocytoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 273 (1): 17-21.
- Teismann P, Tieu K, Cohen O, Choi DK, Wu du C, Marks D. (2003) Pathogenic role of glial cells in Parkinson's disease. *Mov Disord* 18: 121-129.
- Thornberry NA, Bull HG, Calycay JR, Champan KT, Howard AD, Kostura MJ, Miller DK, Molomeaux SM, Weidner JR, Aunins J, EllChin J, Ding JF, Egger LA, Gaffney EP, Limjuco G, Palyha OC, Raju SM,

- Rolando AM, Salley JP, Yamin Y, Lee TD, Shively JE, McCross MM, Mumford FA, Schmidt JA, Tocci MJ (1992) A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 $\beta$  processing in monocytes. *Nature* 356: 768-774.
- Thornberry NA, Lazebnik Y (1998) Caspases: enemies within. *Science* 281: 1312-1216.
- Tiffany-Castiglioni E, Pérez-Polo JR (1981) Stimulation of resistance to 6-hydroxydopamine in a human neuroblastoma cell line by nerve growth factor. *Neurosci Lett* 26: 157-161.
- Tilden AR, Becker MA, Amma LL, Arciniega J, McGaw AK (1997) Melatonin production in an aerobic photosynthetic bacterium: an evolutionarily early association with darkness. *J Pineal Res* 22(2):102-106.
- Torreilles F, Salman-Taboheh S, Guerin KC, Torreilles J. (1999) Neurodegenerative disorders: The role of peroxynitrite. *Brain Res. Rev.* 30: 153.
- Tranveer A, Virji S, Andreeva L, Totty NF, Hsuan JJ, Ward JM, Crompton M (1996) Involvement of cyclophilin D in the activation of a mitochondrial pore by Ca<sup>2+</sup> and oxidant stress. *Eur J Biochem* 15: 166-172.
- Trimmer PA, Borland MK, Keeney PM, Bennett JP Jr, Parker WD Jr (2004) Parkinson's disease transgenic mitochondrial cybrids generate Lewy inclusions bodies. *J Neurochem* 88: 800-812.
- Turrens JF (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552:335-344.
- Uhl GR (1998) Hypothesis: the role of dopaminergic transporters in selective vulnerability of cells in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 43: 555-560.
- Unsicker K, Chamley JH, McLean J (1976) Extraneuronal effects of 6-hydroxydopamine. Tissue culture studies on adrenocortical cells of rats. *Cell Tissue Res* 174: 83-97.
- Urata Y, Honma S, Goto S, Todoroki S, Iida T, Cho S, Honma K, Kondo T (1999) Melatonin induces gamma-glutamylcysteine synthetase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells. *Free Rad Biol Med* 27 (7-8): 838-847.
- Ursini F, Maiorino M, Gregolin C (1985) The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biochim Biophys Acta* 839: 62-70.
- Uversky VN, Li J, Fink AL (2001) Metal-triggered structural transformations, aggregation and fibrillation of human  $\alpha$ -synuclein. *J Biol Chem* 276: 44284-44296.



- Vakkuri O, Rintamaki H, Leppaluoto J (1985) Plasma and tissue concentrations of melatonin after midnight light exposure and pinealectomy in the pigeon. *J Endocrinol* 105: 263.
- Valemte AM, Brancati F, Ferraris A, Graham EA, Davis MB, Breteler MM, Gasser T, Bonifati V, Bentivoglio AR, De Michele G, Durr A, Cortelli P, Wassilowsky D, Harhangi BS, Rawal N, Harhangi BS, Caputo V, Filla A, Mecocci G, Oostra A, Brice A, Albanese A, Dallapiccola B, Wood NW. (2002) PARK6-linked parkinsonism occurs in several European families. *Ann Neurol* 51: 14-18.
- van Engeland M, Ramaeders FC, Schutte B, Reutelingsperger CP (1996). A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. *Cytometry* 24: 131-139.
- Vander Heiden MG, Chandel NS, Li XX, Schumacker PT, Colombini M, Thompson CB (2000) Outer mitochondrial membrane permeability can regulate coupled respiration and cell survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(9): 4666-4671.
- Vanecek J, Pavlik A, Illnerova H (1987) Hypothalamic melatonin receptor sites revealed by autoradiography. *Brain Res* 435: 359.
- Vanecek J (1998) Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiological Rev* 78: 687.
- Vermes I, Steur EN, Jirikowski GF, Haanen C (2004) Elevated concentration of cerebrospinal fluid tissue transglutaminase in Parkinson's disease indicating apoptosis. *Mov Disord* 19(10):1252-4.
- Vician M, Zeman M, Herichova I, Jurani M, Blazicek P, Matis P (1999) Melatonin content in plasma and large intestine of patients with colorectal carcinoma before and after surgery. *J Pineal Res* 27:164.
- Hamel C, Haouzi D, Druillenc S, Belzacq AS, Brenner C, Roques B, Kroemer G (2002) Cell permeable BH3-peptides overcome the cytoprotective effect of Bcl-2 and Bcl-X(L). *Oncogene* 21(13):1963-1977.
- Virchow, R (1858) Cellular pathology as based upon physiological and pathological histology (Traducido de la 2ª edición, editado por F. Chance, 1860) Churchill. London.
- Virmani A, Gaetani F, Imam S, Binienda Z, Ali S (2002) The protective role of L-carnitine against neurotoxicity evoked by drug of abuse, methamphetamine, could be related to mitochondrial dysfunction. *Ann N Y Acad Sci* 965(1): 225-232.

- Virmani A, Gaetani F, Imam S, Binienda Z, Ali S (2003) Possible mechanism for the neuroprotective effects of L-carnitine on methamphetamine-evoked neurotoxicity. *Ann N Y Acad Sci* 993(1): 642-647.
- Vyssokikh MY, Brdiczka D (2002) The function of complexes between the outer mitochondrial membrane pore (VDAC) and the adenine nucleotide translocase in regulation of energy metabolism and apoptosis. *Acta Biochim Pol* 50(2):389-404.
- Walkinshaw G, Waters CM (1994) Neurotoxin-induced cell death in neuronal PC12 cells is mediated by induction of apoptosis. *Neurosci* 63: 975-987.
- Wang G, Qi C, Fan GH, Zhou HY, Chen SD (2005) PACAP protects neuronal differentiated PC12 cells against the neurotoxicity induced by a mitochondrial complex I inhibitor, rotenone. *FEBS Lett* 579(18):4005-11.
- Warner HR. (1994) SOD, aging and degenerative diseases. *Free Radoc Biol Med* 17: 249-258.
- Watts C, Moss CX, Mazzeo D, West MA, Matthews SP, Li DN. (2003) Creation versus destruction of T cell epitopes, in the class II MHC pathway. *Ann NY Acad Sci USA* 987: 9-14.
- Weaver DR, Namboodiri MA, Reppert SM (1988) Iodinated melatonin mimics melatonin action and reveals discrete binding sites in fetal brain. *FEBS Lett* 228: 123.
- Webber J, McDonald JA (0993) Metabolic actions of catecholamines in man. *Clin Endocr Metab* 7: 393-413.
- Webley GE, Edwards R (1985) Direct assay for progesterone in saliva: comparison with a direct serum assay. *Ann Clin Biochem* ( Pt 6): 579-585.
- Weissbach H, Redfield BG, Axelrod J (1960) Biosynthesis of melatonin: enzymic conversion of serotonin to N-acetylserotonin. *Biochim Biophys Acta* 43: 352-353.
- Wilms H, Rosenstiel P, Sierers J, Deuschl G, Zecca L, Lucius R (2003) Activation of microglia by human neuromelanin is NF-kappaB dependent and involves p38 mitogen-activated protein kinase: implications for Parkinson's disease. *FASEB J* 17: 500-502.
- Williams LM, Morgan PJ (1988) Demonstration of melatonin-binding sites on the pars tuberalis of the rat. *J Endocrinol* 119: 1.
- Williams SD, Gottlieb RA (2002) Inhibition of mitochondrial calcium-independent

- phospholipase A2 (iPLA2) attenuates mitochondrial phospholipid loss and is cardioprotective. *Biochem J* 362(Pt 1): 23-32.
- Wood PL, Altar CA (1988) DA release in vivo from nigrostriatal, mesolimbic and mesocortical neurons ; utility of 3-metoxytyramine measurement. *Pharmacol. Rev.* 40: 163.
- Wurtman RJ, Anton-Tay F (1969) The mammalian pineal as a neuroendocrine transducer. *Recent Prog Horm Res* 25: 493-522.
- Xue D, Horvitz HR (1995) Inhibition of the *Caenorhabditis elegans* cell-death in CED-3 by a CED-3 cleavage site in baculovirus p53 protein. *Nature* 377: 248-351.
- Yakes FM, Van Houten B. (1997) Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 514.
- Yamamoto HA, Mohanan PV (2002) Melatonin attenuates brain mitochondrial DNA damage induced by potassium cyanide in vivo and in vitro *Toxicol Lett* 179(1-2): 29-36.
- Yamamoto HA, Mohanan PV (2003) Ganglioside GT1B and melatonin inhibit brain mitochondrial DNA damage and seizures induced by kainic acid in mice. *Brain Res* 964(1): 100-106.
- Yang Y, Liu S, Long Y, Wang F, Ding JH, Liu SY, Yao HH, Wang H, Wu J, Hu G (2005) Systematic administration of iptakalim, an ATP-sensitive potassium channel opener, prevents rotenone-induced motor and neurochemical alterations in rats. *80(3): 442-449.*
- Yao R, Cooper GM (1995) Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science* 267: 2003-2006.
- Yie SM, Brown GM, Liu GY, Collins JA, Daya S, Hughes EG, Foster WG, Younglai EV (1995) Melatonin and steroids in human pre-ovulatory follicular fluid: seasonal variations and granulosa cell steroid production. *Hum Reprod* 10(1): 50-55.
- Yoffe JR, Borchardt RT (1982) Characterization of serotonin uptake in cultured pheochromocytoma cells. Comparison with norepinephrine uptake. *Mol Pharmacol* 21: 368-373.
- Youdim MB, Ben-Shachar D, Riederer P. (1989) Is Parkinson's disease a progressive siderosis of substantia nigra resulting in iron and melanin induced neurodegeneration? *Acta Neurol Scand Suppl* 126: 47-54.

- Yu PH. (1994) Pharmacological and clinical implications of MAO-B inhibitors. *Gen Pharmacol* 25: 1527-1539.
- Yuan H, Pang SF (1990) [<sup>125</sup>I]Melatonin binding sites in membrane preparations of quail brain: Characteristics and diurnal variations. *Acta Endocrinol.* 122: 633.
- Zamzami N, Kroemer G (2001) The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(1):67-71.
- Zamzami N, Susin SA, Marchetti P, Hirsch T, Gomez-Monterrey I, Castedo M, Kroemer G (1996) Mitochondrial control of nuclear apoptosis (see comments) *J Exp Med* 183: 1533-1544.
- Zarranz JJ, Alegre J, Gómez-Esteban JC, Lezcano R, Ros R, Ampuero I, Vidal L, Hoenicka J, Rodríguez O, Atares B, Llorens V, Gómez Tortosa E, del Ser T, Muñoz DG, de Yébenes JG. (2004) The new mutation, E46k, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann. Neurol* 55:164-173.
- Zecca L, Zucca FA, Costi P, Tampellini D, Gatti A, Gerlach M (2003) The beyrinakabub if gynab sybstantia nigra: structure, synthesis and molecular behaviour. *J Neural Transm Suppl* 65: 145-55.
- Zeevalk GD, Bernard LP (2005) Energy status, ubiquitin proteasomal function, and oxidative stress during chronic and acute complex I inhibition with rotenone in mesencephalic cultures. *Antioxid Redox Signal* 7(5-6): 662-672.
- Zha J, HaradaH, Yang E, Jokel J, Korsmeyer SJ (1996) Serine phosphorylation of death agonist Bad in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not Bcl-X<sub>L</sub>. *Cell* 87: 619-628.
- Zhang J, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH. (1994) Nitric oxide activation of poly(ADP-ribose) synthase in neurotoxicity. *Science* 263:678.
- Zheng X, Shoffner JM, Voljavec As, Wallace DC (1990) Evaluation for assaing oxidative phosphorylation enzyme activities in mitochondrial myophathy muscle biopsies. *Biochem Biophys Acta* 1019:1.
- Zhou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang XD (1997) Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* Ced-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90: 405-413.
- Zisapel N (2001) Melatonin-dopamine interactions: from basic neurochemistry to a clinical setting. *Cell Mol Neurobiol* (6):605-616.