

Participación de la óxido nítrico sintasa (NOS) en la enfermedad de Parkinson.

Estrategias neuroprotectoras con antagonistas sintéticos de la NOS.



**Grupo de Investigación CTS-101:
Comunicación Intercelular
Instituto de Biotecnología
Centro de Investigación Biomédica
Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud
Departamento de Fisiología
Facultad de Medicina**

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Ana López Ramírez

2011



Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Ana López Ramírez
D.L.: GR 2435-2011
ISBN: 978-84-694-2921-1

D. DARÍO ACUÑA CASTROVIEJO, Catedrático de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada,

CERTIFICA QUE **D^a. Ana López Ramírez**, Licenciada en Biología, ha realizado bajo su dirección y en el Instituto de Biotecnología de la Universidad de Granada, el trabajo titulado: **“Participación de la óxido nítrico sintasa (NOS) en la enfermedad de Parkinson. Estrategias neuroprotectoras con antagonistas sintéticos de la NOS”** reuniendo el mismo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

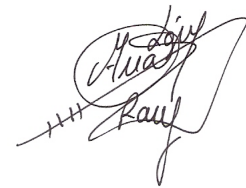
Granada, 2 de Febrero de 2011

Vº Bº Director

Handwritten signature of Darío Acuña Castroviejo, consisting of the initials 'D. ACUÑA' written in a stylized, cursive font.

Darío Acuña Castroviejo

La interesada

Handwritten signature of Ana López Ramírez, featuring a large, stylized initial 'A' followed by the name 'Ana López Ramírez' in a cursive script.

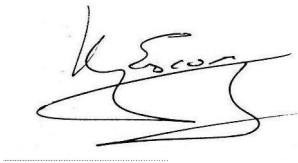
Ana López Ramírez

Dña. GERMAINE ESCAMES, Profesora Titular de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada,

CERTIFICA QUE D^a. **Ana López Ramírez**, Licenciada en Biología, ha realizado bajo su dirección y en el Instituto de Biotecnología de la Universidad de Granada, el trabajo titulado: **“Participación de la óxido nítrico sintasa (NOS) en la enfermedad de Parkinson. Estrategias neuroprotectoras con antagonistas sintéticos de la NOS”** reuniendo el mismo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor.

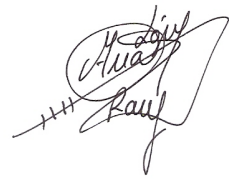
Granada, 2 de Febrero de 2011

Vº Bº Director



Germaine Escames

La interesada



Ana López Ramírez

A mi familia

*"En principio la investigación
necesita más cabezas que medios"*

Severo Ochoa

*"Los grandes conocimientos
engendran las grandes dudas"*

Aristóteles

Agradecimientos

Agradecimientos

Desde que cursé la asignatura de Fisiología durante la carrera, supe que quería dedicarme por entero a la investigación en este campo. La motivación, como en todas las cosas de la vida, depende en gran parte de la gente que te rodea, y en mi caso, puedo decir con toda dicha, que ha sido inmejorable. He de agradecer en primer lugar a mis directores de Tesis, el profesor Darío Acuña Castroviejo y la profesora Germaine Escames, no sólo por haber sido mis guías en la realización de esta Tesis, también por enseñarme que la ciencia es una mezcla de paciencia, disciplina, constancia y diligencia. He aprendido a mirar con distintas perspectivas, cuestionar todo lo que se da por hecho y a valorar el trabajo diario. Ambos son para mí una referencia a seguir y a la que espero parecerme algún día. Es digno de admirar el modo de coordinar y dirigir un grupo tan amplio y, al mismo tiempo unido, de la forma tan cercana en que ellos lo hacen, a pesar de los inconvenientes que se puedan interponer en el camino.

No puedo olvidar en mi lista de agradecimientos a mis compañeros de laboratorio, a los que están y los que estuvieron, haciendo de éste un lugar agradable al que, aún llamado lugar de trabajo, es fácil llegar cada mañana con una sonrisa. Todos habéis ascendido del rango de colegas al de amigos con mención de honor incluida. A mis chicas: Caro, Carmen, Lauri, a las que tengo tanto que agradecer en lo laboral y personal. A Araceli por ser la sargento y, a la par, la figura maternal más entrañable que podríamos tener; y su archienemigo amado Alberto, siempre buen apoyo; a Melqui, la generosidad personalizada; Charles, la curiosidad y meticulosidad hecha humana; a Santos, el caballero oscuro o la guinda cómica del laboratorio según el día, aunque todos querido. A Luis por su nuevo punto de vista sobre todas las cosas. Y a las nuevas adquisiciones, Roberto, Elena y Huayqui, por su buen humor y frescura.

No puedo olvidarme de Francis, mi compañero, mi amigo, ejemplo de nobleza, siempre dispuesto a ayudar. Gracias por hacer mis días cada vez más felices.

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a mi familia, especialmente a mis padres, mi hermano y mi abuela. A mis padres, por haberme inculcado valores que me han hecho ser la persona que soy hoy día, con sus virtudes y defectos, pero siempre con los pies en la tierra. He de agradecer a mi madre el haberme ensañado a ver siempre el lado positivo de las cosas, y a mi padre, la admiración por el saber y la satisfacción de lo bien hecho. A mi hermano, por su valentía y buen corazón. A mi abuela, por ser mi modelo a seguir en tantas actitudes que en ella están "sobreexpresadas".

Muestro mi agradecimiento también al Departamento de Química Farmacéutica y Orgánica, de la Facultad de Farmacia de Granada y al Departamento de Química Orgánica y Bio-Orgánica, de la Facultad de Ciencias, UNED de Madrid, porque sin su colaboración este trabajo no habría sido posible.

Finalmente, agradezco al Instituto de Salud Carlos III, la ayuda predoctoral prestada que ha hecho posible mi aprendizaje y logros científicos en el grupo de investigación durante los últimos años.

Financiación y proyectos

Beca y proyectos de investigación que han financiado este estudio:

A. Beca predoctoral:

AYUDAS PREDOCTORALES DE FORMACIÓN EN INVESTIGACIÓN

Entidad financiadora: Instituto de Salud Carlos III , FONDO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA

Duración: 2007-2011

B. Proyectos de Investigación:

TÍTULO DEL PROYECTO: Participación de la óxido nítrico sintasa mitocondrial (mtNOS) en la enfermedad de Parkinson. Estrategias neuroprotectoras con antagonistas sintéticos de la mtNOS

ENTIDAD FINANCIADORA: Plan Nacional I+D+I (Ministerio de Educación y Ciencia)

Código:SAF2005-07991-C02-01

DURACIÓN DESDE: 1-1-2006 HASTA: 31-12-2008

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Acuña-Castroviejo, D.

TÍTULO DEL PROYECTO: Red temática de investigación cooperativa en envejecimiento y fragilidad (RETICEF)

ENTIDAD FINANCIADORA: ISCIII **Código:** RD06/0013/0008

DURACIÓN DESDE: 1-1-2007 HASTA: 31-12-2010

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Acuña-Castroviejo, D.

TÍTULO DEL PROYECTO: Participación de la óxido nítrico sintasa mitocondrial (mtNOS) en la enfermedad de Parkinson. Estrategias neuroprotectoras con antagonistas sintéticos de la mtNOS

ENTIDAD FINANCIADORA PAI (Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía) (Proyecto de excelencia) **Código:** P06-CTS-01949 (Proyecto de Excelencia)

DURACIÓN DESDE: 11-4-2007 HASTA: 31-3-2010

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Entrena, A.

TÍTULO DEL PROYECTO: Evaluación del daño mitocondrial en el modelo de Parkinson experimental inducido por MPTP en ratones knockout para la melatonina

ENTIDAD FINANCIADORA PAI (Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía) (Proyecto de excelencia) **Código:** P06-CTS-01604 (Proyecto de Excelencia)

DURACIÓN DESDE: 13-4-2007 HASTA: 12-4-2010

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Guerrero, J. M.

Publicaciones y Comunicaciones

Publicaciones científicas

Tapias V, Escames G, López LC, López A, Camacho E, Carrión MD, Entrena A, Gallo MA, Espinosa A, Acuña-Castroviejo D. Melatonin and its brain metabolite N(1)-acetyl-5-methoxykynuramine prevent mitochondrial nitric oxide synthase induction in parkinsonian mice. *J Neurosci Res* 2009; 87:3002-3010.

D. Acuña-Castroviejo, L. C. López, G. Escames, A. López, J. A. García, and R. J. Reiter. Melatonin-mitochondria interplay in health and disease. *Curr Top Med Chem* 2011; 11:221-240.

L. C. López, G. Escames, A. López, J. A. García, C. Doerrier, and D. Acuña-Castroviejo. Melatonin, neurogenesis, and aging brain. *The Open Neuroendocrinol J* 2010; 3:131-133.

G. Escames, A. López, J. A. García, L. García, D. Acuña-Castroviejo, J. J. García, and L. C. López. The role of mitochondria in the aging brain and the effects of melatonin. *Curr. Neuropharmacol* 2010; 8:182-193.

R. M. Claramunt, C. López, A. López, C. Pérez-Medina, M. Pérez-Torralba, I. Alkorta, J. Elguero, G. Escames, and D. Acuña-Castroviejo. Indazoles as inhibitors of inducible nitric oxide synthase (iNOS): potency and selectivity versus neuronal nNOS. *EJMC* 2010, en prensa.

D. Acuña-Castroviejo, G. Escames, L. C. López, F. Ortiz, A. López, and J. A. García. Evidencias de la utilidad de la melatonina frente al envejecimiento y los procesos neurodegenerativos. *Psicogeriatría* 2009; 1:1-19.

López A, García JA, Escames G, Venegas C, Ortiz F, López LC, Acuña-Castroviejo D. Melatonin protects the mitochondria from oxidative damage reducing oxygen consumption, membrane potential and superoxide anion production. *J Pineal Res* 2009; 46:188-198.

COMUNICACIONES EN CONGRESOS RELACIONADAS CON ESTA TESIS

New 4,5-dihydro-1H-pyrazole derivatives as potential nitric oxide synthase inhibitors. E. Camacho, M. D. Carrión, L. C. Lopez-Cara, E. García, M. Chayah, A. Entrena, M. A. Gallo, A. Espinosa, **A. López**, G. Escames, and D. Acuña-Castroviejo. *Drugs Future* 34:62 , 2009.

Synthesis and biological evaluation of 2-phenyl-2,3-dihydro-1,3,5-thiazolines and their oxidation derivatives as neuronal and inducible nitric oxide synthase inhibitors L. C. López-Cara, A. Entrena, E. Camacho, M. J. P De las Infantas, M. D. Carrión, M. A. Gallo, A. Espinosa, G. Escames, **A. López**, and D. Acuña-Castroviejo. *Drugs Future*, 34:63,2009.

Melatonin protects normal mitochondria from oxidative damage reducing superoxide anion production. **A. López**, J. A. García, G. Escames, C. Venegas, F. Ortiz, L. C. López, and D. Acuña-Castroviejo. XXXV Congreso de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas (SECF) 195:149, 2009. (Abstract)

Abreviaturas

ABREVIATURAS

4HDA: 4- hidroxidialquenal.

6-OHDA: 6-hidroxidopamina.

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

AMK: N1-acetil-5-metoxikinuramina.

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

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

aMT: melatonina.

ATP: adenosín trifosfato.

BDNF: factor neurotrófico derivado de cerebro.

BH₄: tetrahidrobiopterina.

Ca²⁺: calcio.

CaM: calmodulina.

CAT: catalasa.

CL: cuerpos de Lewy.

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

COX: citocromo oxidasa.

COX-2: ciclooxigenasa-2 .

CTE: cadena de transporte electrónico.

DA: dopamina.

DAT: transportador de dopamina.

DNA: ácido desoxirribonucleico.

eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial.

EP: enfermedad de Parkinson.

FAD: flavina adenina dinucleótido.

FADH₂: flavina adenina dinucleótido .

G6PD: glucosa-6-fosfato deshidrogenada.

GABA: ácido gamma amino butírico.

GDNF: factor neurotrófico derivado de la glía.

GPe: globo pálido externo.

GPI: globo pálido interno.

GPx: glutathion peroxidasa.

GRd: glutathion reductasa.

GSH: glutathion reducido.

GSSG: glutathion oxidado.

H₂O₂: peróxido de hidrógeno.

HIOMT: hidroxindol-O-metiltransferasa.

HO[•]: radical hidroxilo.

IL: interleuquina.

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

INF-γ: interferón gamma.

iNOS: óxido nítrico sintasa inducible.

L-DOPA: L-dihidroxifenilalanina.

LPO: peroxidación lipídica.

MAO: monoamina oxidasa.

MDA: malondialdehído.

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad.

MPP⁺: ión 1-metil-4-fenilpiridina.

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

mRNA: ácido ribonucleico mensajero.

mtDNA: ácido desoxirribonucleico mitocondrial.

mtNOS: óxido nítrico sintasa mitocondrial.

NADH: nicotinamida adenín dinucleótido reducida.

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido.

NAT: N-acetiltransferasa.

nDNA: ácido desoxirribonucleico nuclear.

NF- κ B: factor de transcripción KAPPA B.

NMDA: N-metil D-aspartato.

nNOS: óxido nítrico sintasa neuronal .

NO $^{\circ}$: óxido nítrico.

NOS: óxido nítrico sintasa.

NST: núcleo subtalámico de Luys.

O $_2^{\bullet-}$: anión superóxido.

OH $^{\circ}$: radical hidroxilo.

ONOO $^-$: peroxinitritos.

PARS: poli ADP-ribosa sintetasa.

Pi: fósforo inorgánico.

PKC: proteína kinasa C.

RNA: ácidos ribonucleicos.

RNS: especies reactivas de nitrógeno.

ROS: especies reactivas de oxígeno.

Serotonina: 5-hidroxitriptamina.

SN: sustancia negra.

SNC: sistema nervioso central.

SNpc: sustancia negra pars compacta.

SNpr: sustancia negra pars reticulata.

SOD: superóxido dismutasa.

SQ $^{\circ}$: semiquinona.

ST: estriado.

TH: tirosina hidroxilasa.

TNF- α : factor de necrosis tumoral.

Índice

Introducción.

1.- ENFERMEDAD DE PARKINSON.....3

 1.1.- Historia de la Enfermedad de Parkinson.....3

 1.2.- Epidemiología.3

 1.3.- Sintomatología y formas de la EP.....4

 1.3.1 Parkinson idiopático.....5

 1.3.2 Parkinson hereditario6

 1.4 .- Ganglios basales y enfermedad de Parkinson.....6

 1.4.1 Fisiología y bioquímica de los ganglios basales.....6

 1.4.2 Fisiopatología de los ganglios basales en la EP.....8

 1.5-. Etiología de la enfermedad de Parkinson.....10

 1.5.1 Estrés oxidativo en la enfermedad de Parkinson.....10

 1.5.2 Defectos mitocondriales.....14

 1.5.3 Catabolismo de la dopamina e interacción con el hierro.....16

 1.5.4 Excitotoxicidad.....17

 1.5.5 Procesos inflamatorios.....18

 1.5.6 Factores ambientales.....20

 1.6.- Mecanismos de muerte neuronal en EP: Apoptosis.....21

 1.7.- Tratamiento de la enfermedad de Parkinson.....22

 1.8.- Modelos de enfermedad de Parkinson.....23

 1.8.1 Modelo del tratamiento con MPTP.....23

2- MELATONINA.....25

 2.1.- Qué es la melatonina y dónde se produce.....25

 2.2.- Biosíntesis y metabolismo de la melatonina.....26

 2.3.- Mecanismos de acción de la melatonina.....28

 2.3.1 La melatonina como antioxidante29

 2.3.2 Melatonina y mitocondria.....30

 2.3.2 a Acción sobre la mtNOS.....30

2.3.2 b Antioxidante de acción directa.....	31
2.3.2 c Antioxidante de acción indirecta.....	32
2.3.2 d Potenciación de la CTE.....	33
2.4 Melatonina y neurodegeneración.....	34
Hipótesis.	
Hipótesis	41
Objetivos.	
Objetivos	45
Material y Métodos.	
MATERIAL y MÉTODOS.....	49
1.- Animales, procedimiento quirúrgico y tratamiento.....	49
2.- Obtención de la fracción mitocondrial.....	50
3.- Métodos analíticos.....	51
3.1 Determinación de la concentración de proteínas.....	51
3.2 Determinación de la actividad óxido nítrico sintasa.....	51
3.2.1 “in vivo” (citosólica y mitocondrial).....	51
3.2.2 “in vitro” (ensayos con los compuestos sintéticos).....	53
3.3 Determinación de la actividad específica de la NADH-ubiquinona (CoQ) óxidoreductasa (Complejo I de la CTE).....	53
3.4 Determinación de la peroxidación lipídica	54
3.5 Western Blot de complejos respiratorios	54
3.6 RT-PCR de DNA mitocondrial y DNA nuclear.....	55
4.- Análisis estadístico.....	55

Resultados.

1.- "IN VITRO"	59
1.1 SERIE DE INDAZOLES	59
1.2 SERIE DE TIADIAZOLINAS	62
1.3 SERIE DE PIRROLES	64
1.4 SERIE DE LOS DERIVADOS ÁCIDO Y ÉSTER DE PIRROLES.....	65
1.5 SERIE DE PIRROLES SIN AMINO.....	66
1.6 SERIE DE LAS OXIDIAZOLINAS.....	68
1.7 SERIE DE LAS QUINAZOLONAS	70
1.8 SERIE DE LAS PIRAZOLINAS	72
1.9 SERIE DE LOS DERIVADO BICÍCLICOS.....	74
1.10 SERIE DE LOS DERIVADOS TRICÍCLICOS	75
1.11 SERIE DE LAS TIADIAZOLINAS OXIDADAS	76
1.12 SERIE DE LAS KINURENAMINAS CON RESTOS DE UREA.....	78
1.13 CLASIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS POR MAYOR GRADO DE INHIBICIÓN DE LA iNOS.....	80
1.14 CLASIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS POR MAYOR GRADO DE INHIBICIÓN DE LA nNOS.....	82
1.15 COMPUESTOS CON INHIBICIÓN SELECTIVA	82
2.- "IN VIVO"	85
2.1 Actividad del complejo I de la CTE.....	85
2.2 Actividad de la NOS en citosol y mitocondria de SN y ST.....	86
2.2.1 Sustancia negra.....	86
2.2.2 Estriado.....	88
2.2.3 CLASIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS POR MAYOR GRADO DE INHIBICIÓN DE LA iNOS en CITOSOL DE SN.....	89
2.2.4 CLASIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS POR MAYOR GRADO DE INHIBICIÓN DE LA i-mtNOS en CITOSOL DE SN.....	89
2.3 Oxidación de los lípidos de membrana (LPO) en citosol y mitocondria de ST y ST..	89
3.- ESTUDIO COMPARATIVO DEL EFECTO DE LA MELATONINA EN LA EP EN RATONES CONTROLES, DEFICIENTES EN iNOS y DEFICIENTES EN nNOS.....	91
3.1 Actividad del complejo I de la CTE.....	91
3.2 Actividad NOS inducible y NOS total.....	94
3.3 Western Blots de complejos de la CTE.....	97

3.4 Daño al DNA mitocondrial.....	100
-----------------------------------	-----

Discusión.

Discusión.....	105
1.- Daños provocados por el MPTP.....	105
2.- Efectos de la melatonina en el modelo de EP con MPTP.....	109
3.- Efecto de los compuestos sintéticos en el modelo de EP con MPTP.....	111

Conclusiones.

Conclusiones.....	117
<i>Conclusions</i>	118

Bibliografía.

Bibliografía.....	121
-------------------	-----

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 en 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.

1.1 Historia de la Enfermedad de Parkinson.

La enfermedad de Parkinson (EP) fue descrita por primera vez por James Parkinson (Figura 1) en 1817, en su “Tratado sobre la parálisis agitante” denominándola “shaking palsy” (“parálisis agitante”) aunque ya en el siglo I, el físico griego Galeno distinguió en sus escritos el temblor en reposo producido durante el movimiento.



Figura 1. J. Parkinson
(1755-1824)

Fue en 1919 cuando Tretiakoff descubre la parte del cerebro implicada en la enfermedad, localizándola en la sustancia negra (SN) (denominada así porque sus neuronas contienen neuromelanina, un pigmento coloreado) situada en el mesencéfalo, que va perdiendo pigmento conforme van muriendo sus neuronas, las cuales producen un neurotransmisor: la dopamina (DA) (Kapp, 1992). En 1955, Arvid Carlsson (Premio Nobel de Medicina, 2000) demostró que el 80% de la DA del cerebro se encuentra en los ganglios basales (CARLSON, 1955). En 1961, Oleh Hornykiewicz desentrañó la clave de la enfermedad: una disminución de la DA en el cuerpo estriado (ST) y putamen (HORNYKIEWICZ, 1963). Finalmente, la implicación de estas estructuras cerebrales en la patogénesis de la EP ha conducido a un exhaustivo estudio de los ganglios basales en las últimas décadas, llegando a la formulación de un modelo de organización de los ganglios basales universalmente aceptado, como resultado, a un mejor entendimiento de la enfermedad (Alexander *et al.*, 1986; Albin *et al.*, 1989; Bergman *et al.*, 1990).

1.2 Epidemiología

En la actualidad, es el trastorno del movimiento más frecuente, afectando a un 1-2% de individuos cuya edad ronda los 65 años (Hubo *et al.*, 2006). Se trata de la segunda enfermedad neurodegenerativa más frecuente después de la Enfermedad de Alzheimer. La edad media de comienzo es de 55 años y la incidencia aumenta significativamente con la edad. En España, unas 65.000 personas están diagnosticadas, aunque se estima que el

número total de afectados podría superar los 100.000 (datos obtenidos de la Federación Española de Parkinson).

Hoy en día, la incidencia estimada se sitúa entre 16-19/100.000 habitantes año. En la mayoría de los estudios, el pico de incidencia se sitúa entre los 70-79 años y la media de edad de inicio de los síntomas entre 60-65 años (Twelves *et al.*, 2003). La prevalencia ajustada por edad se incrementa sustancialmente con la edad, pasando de 60/100.000 habitantes en el rango de 65 a 69 años, a 350/100.000 habitantes entre los 85 y los 89 años. Se estima que el riesgo de padecer la enfermedad es de un 1,3% para las mujeres y 2% para los varones. Además en estos la enfermedad progresa con mayor rapidez que en las mujeres.

Respecto a los factores involucrados en la variabilidad geográfica, son igualmente desconocidos, aunque se encuentra una incidencia más alta de parkinsonismo en las personas que residen en áreas rurales (Brown *et al.*, 2006), aunque también se ha relacionado la EP con la exposición a determinados productos industriales o a metales (cobre, plomo, hierro, mercurio, aluminio, etc.). Las cifras de prevalencia más bajas son para China, Japón y África (Zhang & Roman, 1993). En Europa, la prevalencia es similar en cada uno de los países.

1.3 Sintomatología y formas de la EP

Los síntomas clínicos aparecen como consecuencia de una pérdida progresiva y selectiva de las neuronas dopaminérgicas en el sistema nervioso central. La pérdida neuronal parece tener lugar por apoptosis, aunque también se han descrito otros procesos implicados como inflamación (Olanow, 2007). Se cree que el proceso patológico se produce de forma ascendente e implica al sistema límbico, al visceromotor y al somatomotor.

Desde el punto de vista clínico, la enfermedad de Parkinson se caracteriza por: 1) **rigidez** de la musculatura o aumento del tono muscular, en áreas extensas del cuerpo o en áreas aisladas acompañada de trastornos posturales, 2) **temblor** en reposo en las áreas comprometidas, en la mayoría pero no en todos los casos, con reducción de la energía muscular, en partes del cuerpo inactivas, incluso si están apoyadas, y 3) una seria incapacidad de iniciar el movimiento, denominada **acinesia o bradiquinesia**.

El principal marcador histopatológico de la EP son los cuerpos de Lewy (CL), inclusiones citoplasmáticas eosinofílicas esféricas, constituidas principalmente por neurofilamentos y diversas proteínas, sobre todo α -sinucleína (α -SN) (Spillantini y cols, 1997). Se localizan en neuronas monoaminérgicas de la sustancia negra y otros núcleos del tronco, diencefalo y prosencéfalo. A microscopio electrónico se muestran compuestas de un núcleo denso, rodeado por un halo, que aparecen en las neuronas supervivientes de los cerebros de pacientes con EP (Shults, 2006). El papel de los CL en la viabilidad neuronal se encuentra sometido a un intenso debate. La principal característica de la EP es la pérdida selectiva de neuronas dopaminérgicas y la presencia de CL en las neuronas supervivientes. Dicha asociación lleva a la teoría de que la aparición de inclusiones de α -SN es tóxica para las neuronas aunque existe controversia ya que también se trata un fenómeno no maligno asociado con el envejecimiento (Jellinger, 2004; Parkkinen *et al.*, 2005b; Parkkinen *et al.*, 2005a).

Clínicamente, cualquier enfermedad que curse con una disminución de DA en el estriado, o con daño directo en esta zona, provoca el llamado síndrome parkinsoniano. La EP es la causa más frecuente de este síndrome, representando cerca del 80% de los casos (Dauer & Przedborski, 2003). La enfermedad tiene dos formas básicas, la idiopática y la hereditaria:

1.3.1 Parkinson idiopático.

El 90-95% de los casos de EP son considerados como esporádicos o idiopáticos (Pramstaller *et al.*, 2005) ya que no tienen una relación genética aparente. Se cree que la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo juegan un papel fundamental en su patogénesis (Drechsel & Patel, 2008; Onyango, 2008; Bueler, 2009). Existen dos evidencias principales que implican la **disfunción mitocondrial** y la EP. La primera es la disminución de la actividad del *complejo I* de la cadena de transporte de electrones en las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra de pacientes con EP respecto a controles (Schapira *et al.*, 1990; Parker, Jr. *et al.*, 2008). La segunda es, que el DNA mitocondrial de las neuronas dopaminérgicas de pacientes con EP presenta una *tasa de delección mayor*, lo que podría producir un déficit de las proteínas implicadas en la cadena de transporte.

El análisis de la sustancia negra de pacientes con EP muestra un incremento del **estrés oxidativo**, reflejado en una elevación de los niveles de *hierro* (Good *et al.*, 1992), de *peroxidación lipídica* (Dexter *et al.*, 1989) y de *oxidación de DNA y proteínas* (Alam *et al.*, 1997b; Alam *et al.*, 1997a), así como una disminución en los *niveles de GSH* (Dexter (Dexter *et al.*, 1994a; Dexter *et al.*, 1994b). Además, las neuronas de la sustancia negra están sometidas a un estrés oxidativo crónico (Jenner, 2003), debido a factores como la elevada actividad aeróbica en el cerebro, la *autooxidación de la dopamina* (Graham, 1978) y los niveles de hierro incrementados (Drechsel & Patel, 2008).

Se ha visto que ciertos **factores ambientales** incrementan el riesgo de padecer EP. De esta observación ha surgido la “hipótesis ambiental”, en la cual agentes químicos presentes en el ambiente, podrían dañar de forma selectiva las neuronas dopaminérgicas, contribuyendo así al desarrollo de la enfermedad (Tanner & Langston, 1990). Existe una fuerte asociación entre la exposición prolongada a *pesticidas* y el desarrollo de la EP (Goetz *et al.*, 1988; Tanner *et al.*, 1989; Tanner, 1989). La *rotenona*, un insecticida lipofílico, produce inhibición del complejo I de la cadena de transporte de electrones [46] y despolimerización de microtúbulos (Ren & Feng, 2007). Otra molécula que tiene el mismo mecanismo de acción y que está ampliamente demostrado que produce EP, es *MPP+* (metabolito activo de MPTP) (Langston & Ballard, Jr., 1983; Richardson *et al.*, 2007). *Dieldrina* y *Maneb* son otros dos pesticidas que inhiben de forma selectiva el complejo III de la cadena de transporte de electrones (Bergen, 1971). Se ha visto que la concentración de Dieldrina en el cerebro de pacientes con EP es mayor que en el de controles (Corrigan *et al.*, 2000) y que la exposición crónica a Maneb provoca síndrome parkinsoniano crónico (Costello *et al.*, 2009). La exposición crónica a *Paraquat*, un herbicida, también incrementa el riesgo de padecer EP (Costello *et al.*, 2009), ejerciendo toxicidad mediante la producción de ROS (Richardson *et al.*, 2005; Bus & Gibson, 1984)

1.3.2 - Parkinson hereditario.

Entre un 5-10% de los casos con los síntomas clínicos de EP tienen un historial familiar positivo y compatible con herencia mendeliana (autosómico dominante o autosómico recesivo). Hasta la fecha, se han descrito seis formas monogénicas de la enfermedad (Lesage & Brice, 2009). En resumen, los genes asociados con las formas hereditarias de la EP descritos hasta la fecha están involucrados en la supervivencia celular mediante procesos de fosforilación, control del plegamiento de proteínas, agregación y mantenimiento de la integridad mitocondrial.

Los genes que confieren susceptibilidad o que son causa directa de la EP se les agrupa como genes PARK (PARK1-PARK 10), que codifican a una proteína diferente. El PARK1 es el gen que codifica la proteína denominada α -sinucleína. Estudios post-mortem muestran la presencia de la proteína en los CL, preferentemente en su zona interna. Existen datos que parecen indicar que la α -sinucleína puede regular el pool de DA intracelular bien a través de la regulación de la tirosina hidroxilasa (TH) o bien a través de la expresión del transportador de la captación de DA (DAT) (Fahn & Sulzer, 2004). El PARK5, que codifica la proteína UCH-L1, que también se desarrollan CL (Gasser, 2005). El gen del locus PARK7, además conocido como DJ-1 codifica para una proteína de la superfamilia de receptores nucleares, la NURR, es esencial para la adquisición y mantenimiento del carácter dopaminérgico de la neurona. (Vila & Przedborski, 2004). El gen PARK8 codifica para la proteína LRRK2 o dardarina implicada en los procesos de ensamblaje de las neurofibrillas (Whaley *et al.*, 2006). Otros genes que confieren susceptibilidad están relacionados con enzimas del metabolismo y detoxificación de fármacos, pesticidas y en general xenobióticos, así como factores que afectan el nivel redox de la célula y el funcionamiento mitocondrial.

1.4 Ganglios basales y enfermedad de Parkinson:

1.4.1 Fisiología y Bioquímica de los ganglios basales

Los ganglios basales, junto con el cerebelo, constituyen el más importante bucle subcortical del sistema motor actuando a modo de 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. La diferencia entre ambos estriba en que, si bien el cerebelo regula directamente la ejecución del movimiento, los ganglios basales están implicados en aspectos cognitivos y de orden superior del control motor. Además, debido a las extensas conexiones de la corteza asociativa y estructuras límbicas, los ganglios basales participan en aspectos no relacionados con el movimiento, como las funciones afectiva y cognitiva.

En este circuito motor o vía córtico-estriatal, la señal proveniente de la corteza cerebral se dirige a la porción motora del estriado (ST, concretamente al putamen) que constituye el 'núcleo de entrada' en forma de una vía topográficamente organizada. Se trata de fibras excitatorias que alcanzan el ST estableciéndose de este modo sinapsis glutamatérgicas excitadoras con los receptores ionotrópicos del glutamato (ácido ropiónico alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol (AMPA) y N-metil D-aspartato (NMDA).

La gran mayoría de las neuronas del ST (90-95%) son las denominadas neuronas espinosas de proyección de tamaño medio. Para estas neuronas se distinguen dos subpoblaciones con, aproximadamente, igual número de células que alcanzan la SN a través de vías diferentes (Graybiel, 1990). Se distingue, por un lado, la que proyecta directamente a la sustancia negra pars reticulata (SNr) (en menor medida a la sustancia negra compacta, SNc) y al segmento interno del globo pálido, GPi (vía estriadonigral), y por otro, la que alcanza a la SNr mediante conexiones polisinápticas (vía estriadopalidal), proyectando primero al segmento externo del globo pálido, el cual proyecta por una parte a la SN y, por otra, a los núcleos subtalámicos. Todas estas conexiones son inhibitorias, utilizando GABA como neurotransmisor. Los núcleos subtalámicos, por su parte, envían aferencias excitadoras glutamatergicas a la SNr. En cada uno de los circuitos se distinguen pues dos vías (Figura 2):

1- una vía directa (estriadonigral) GABAérgica, que también contiene dinorfina y sustancia P, que expresa receptores dopaminérgicos D1, proyecta directamente del putamen a las neuronas del GPi y la SNr sobre las cuales ejerce un efecto inhibitorio.

2- una vía indirecta (estriadopalidal). Se trata también de proyecciones GABAérgicas inhibitorias al STN; de éste último se originan fibras glutamatergicas 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 y SNr.

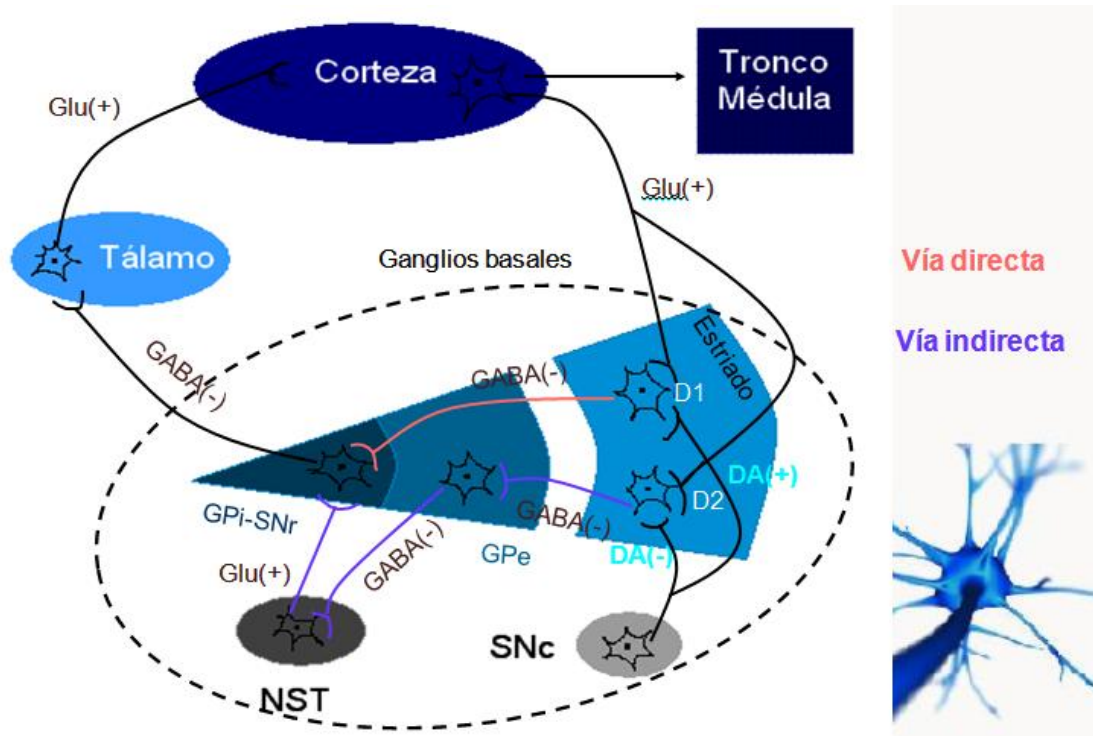


Figura 2. Circuito de los ganglios basales: vía directa e indirecta.

A nivel del estriado, la dopamina (DA) liberada por la SNc aparece como facilitadora de la transmisión sobre la vía directa e inhibidora de la indirecta, y este efecto aparentemente opuesto está mediado por los receptores dopaminérgicos D_1 y D_2 que están situados en diferentes poblaciones neuronales del estriado (Gerfen *et al.*, 1995). Los receptores D_1 (excitadores) fueron localizados en las neuronas del estriado que son el origen de la vía directa y los receptores D_2 (con efecto inhibidor sobre la adenilato ciclasa) en las neuronas que son origen de la vía indirecta (Bertorello & Aperia, 1990; Ariano *et al.*, 1992). De esta manera el equilibrio de la influencia ejercida por estas dos vías sobre el complejo funcional GPi-SNr depende en gran medida de la acción de la dopamina sobre los receptores D_1 y D_2 (Parent *et al.*, 1999; Obeso *et al.*, 2000).

Tanto la vía directa como la indirecta proyectan desde el complejo GPi-SNr hacia los núcleos talámicos mediodorsal y ventromedial (los cuales proyectan a la corteza frontal) e intralaminar (el cual proyecta al estriado), el colículo superior y el núcleo pedúnculo-pontino. Estas neuronas son tónicamente activas y producirán, por tanto, la inhibición de las células talámicas que devuelven la proyección a las zonas de la corteza implicadas en el control motor (Escobar A, 2003). El movimiento, a nivel de los ganglios basales, se origina cuando las neuronas talámicas son liberadas de esta inhibición tónica con la consiguiente actividad motora de la corteza.

1.4.2 Fisiopatología de los ganglios basales en EP

En la enfermedad de Parkinson (EP) se produce una severa patología de los ganglios basales, con especial predilección por la zona ventrolateral de la SNc (Tretiakoff C., 1919). La aparición de ciertos rasgos clínicos, como la ataxia, reflejan degeneración en otras áreas cerebrales. Estas regiones incluyen al núcleo periamigdalóide, al locus ceruleus, al núcleo motor del vago dorsal, a la sustancia innominada, a los núcleos del rafe y al hipotálamo. El síndrome es normalmente asimétrico con patología de los ganglios basales en el hemisferio contralateral.

El término substantia nigra deriva de la presencia del pigmento negro neuromelanina, contenido en las neuronas de la parte compacta. La neuromelanina es un polímero de dihidroxifenilalanina (DOPA), precursor de la dopamina. Como se ha descrito en la enfermedad de Parkinson, las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo se encuentran afectadas, por lo que se reduce notablemente la dopamina estriatal. 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). En la parte compacta de la sustancia negra de estos enfermos no se encuentra presente la neuromelanina. También se encuentran afectadas las neuronas dopaminérgicas de otras partes del sistema nervioso central (SNC). Sin embargo, es la pérdida de dopamina en los ganglios basales la que al parecer produce los signos neurológicos más debilitantes.

Por tanto, la característica neuropatológica fundamental en la EP es el “blanqueo” de la franja de la SN, normalmente gris o negra, debido a la pérdida de las neuronas dopaminérgicas melanizadas. 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). Puesto que la

enfermedad muestra una especial predilección por la zona ventrolateral de la SNc es en este tipo de células donde comienza la lesión para progresar después a la zona dorsal de esta estructura. Se requiere la muerte de al menos el 60-70% de las neuronas de la SN para la manifestación de los síntomas clínicos, lo cual demuestra la alta plasticidad del sistema dopaminérgico nigroestriado.

Aunque inicialmente la pérdida neuronal se localiza en la SN, posteriormente y a medida que la enfermedad progresa, la patología se extiende a otras áreas de los ganglios basales y el tronco cerebral. Sin embargo, otros autores (Braak *et al.*, 1996) han sugerido que la neurodegeneración comienza en la corteza entorrinal, de manera que la cascada de muerte celular se inicia en esta área y continúa con la degeneración de la SN. La velocidad de degeneración en la corteza entorrinal en este caso debería ser más lenta que la de la SN.

Consecuentemente y teniendo en cuenta los importantes cambios patológicos que ocurren en la SN, ésta parece ser la primera región cerebral atacada por este proceso destructivo con las consecuentes alteraciones en el circuito motor.

La pérdida de dopamina produce una enorme desinhibición de las neuronas de cuerpo estriado que expresan los receptores D2 de dopamina en la vía indirecta que, a su vez, produce un aumento de la inhibición en el GPe y desinhibición del STN; 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 *et al.*, 1990; Obeso *et al.*, 2000) (Figura 3).

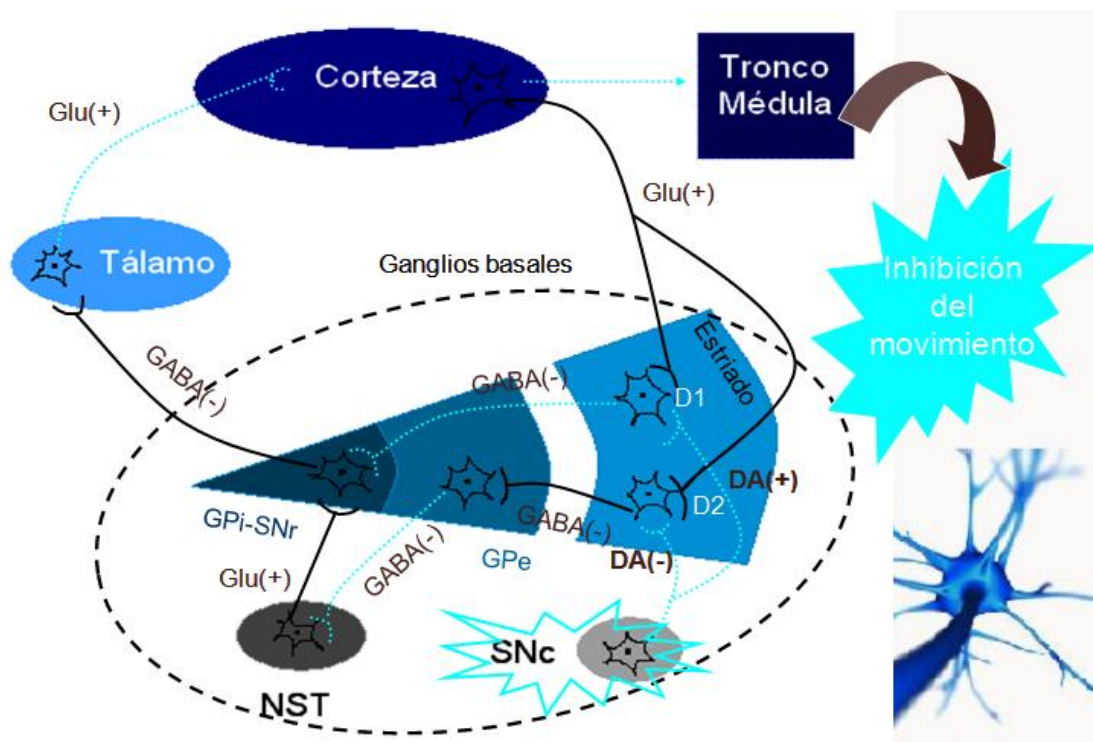


Figura 3. Modificaciones del circuito motor en la EP.

1.5 Etiología de la enfermedad de Parkinson.

La causa o causas de las actividades motoras anormales en la EP son casi desconocidas aunque, como ya se ha comentado, están muy relacionadas con la pérdida de liberación de dopamina en el núcleo caudado y putamen por las terminaciones nerviosas de la vía nigroestriada. La destrucción de la SN hace que las terminales dopaminérgicas degeneren y que ya no esté presente la DA normalmente liberada en el núcleo caudado y putamen. Pero aún existe un gran número de neuronas que liberan Ach, y éstas transmiten señales excitadoras en estos núcleos. En ausencia de la liberación de DA, las vías colinérgicas se tornan excesivamente activas, lo que justificaría muchos de los síntomas motores de la EP.

Existen diversas teorías que tratan de dilucidar los mecanismos implicados en la degeneración del sistema dopaminérgico (Tomas-Camardiel *et al.*, 2004), aunque lo más probable es que sea una combinación de varias de ellas lo que propicie el inicio de la enfermedad.

1.5.1 Estrés oxidativo en la EP

La más importante de las teorías de neurodegeneración se refiere al estrés oxidativo como causa del daño a las neuronas de la SN. Este estrés oxidativo podría estar originado por un incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS) y/o por deficiencia en los mecanismos antioxidantes conduciendo al daño celular (Mastaloudis *et al.*, 2001; Davies, 1995). Está especialmente implicado en las alteraciones de las funciones mitocondriales y es el vehículo principal del daño ocasionado en los procesos excitotóxicos.

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).

Según la revisión de Miquel (1998), "Es sorprendente que los radicales libres derivados del oxígeno, que son la base de la vida aerobia, puedan llevar también a procesos degenerativos como el cáncer y el envejecimiento".

Se define como radical libre a aquella especie química (átomo o molécula) capaz de existir independientemente, y que contiene uno o más electrones desapareados. Los radicales libres son especies dotadas de elevada capacidad de reacción, y por tanto, capaces de intervenir en numerosas reacciones químicas, alterando el funcionamiento de sistemas tanto biológicos como no biológicos (Pryor W., 1976). La producción de radicales libres en las neuronas se considera que es aún más elevada debido a su alto consumo de oxígeno; el cerebro utiliza el 20% del oxígeno basal a pesar de constituir solamente el 2-3% de la masa corporal total.

Los radicales libres pueden ser de distintos tipos, según los átomos integrantes, pero debemos destacar por su importancia en los sistemas biológicos a los radicales libres derivados del oxígeno, ROS, así como a los radicales libres derivados del nitrógeno, especies reactivas de nitrógeno (RNS) (Saran & Bors, 1990; Halliwell, 1997).

RADICAL	NOMBRE	VIDA MEDIA	BLANCO BIOLÓGICO TÍPICO
$O_2^{\cdot-}$	Superóxido	10^{-5} s	Enzimas
H_2O_2	Peróxido de hidrógeno*	Estable	PUFA**
HO^{\cdot}	Radical hidroxil	10^{-9} s	Todas las moléculas
R^{\cdot}	R-ilo	10^{-8} s	Oxígeno
RO^{\cdot}	R-oxilo (alcoxilo)	10^{-6} s	PUFA
ROO_2^{\cdot}	R-dioxilo (peroxilo)	7 s	PUFA
$ROOH^{\cdot}$	Hidroperóxido		PUFA
1O_2	Singlete de oxígeno	10^{-6} s	H^2O
$HOCl$	Ácido hipocloroso	Estable	Varios
NO^{\cdot}	Radical de óxido nítrico	-1s	Varios

Tabla 1: Radicales libres, vida media y blanco biológico típico de los radicales libres y especies reactivas del oxígeno (modificado de Reiter. *Front Neuroendocrinol* 1995; 16:383-415).

1.5.1 a. Estrés oxidativo y mitocondria.

Actualmente, el estudio de los radicales libres de oxígeno y asociado el estrés oxidativo es uno de los temas biomédicos de mayor interés teórico y práctico. Esto se debe a su relación con la fisiopatología de muchas enfermedades crónicas degenerativas como la EP.

Una de las mayores fuentes productoras de radicales libres es la mitocondria, debido a que más del 95% del O_2 es utilizado por ella para realizar la fosforilación oxidativa, que se encuentra acoplada a la cadena de transporte de electrones (CTE) (Figura 4.)

Una consecuencia directa de este proceso es que entre los nutrientes iniciales y la generación de energía al final del proceso, se forman varias moléculas con diferente grado de oxidación. Algunas de ellas pueden entregar 1 ó 2 electrones al oxígeno y

producir intermediarios parcialmente reducidos que son los radicales libres como el $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 y OH^{\cdot} (Cadenas & Davies, 2000; Acuna-Castroviejo *et al.*, 2001). Otras fuentes serían los peroxisomas, leucocitos y xantina deshidrogenasa. Los radicales libres desempeñan un papel fisiológico clave en la homeostasis, como es el caso del NO^{\cdot} sintetizado por la NOS; los radicales derivados de ROS intervienen en la respuesta del estrés oxidativo y mantienen la homeostasis redox. Los radicales libres se clasifican según el grupo funcional presente en la molécula (Morrissey P.A. & O'brien N.M., 1998).

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

El descubrimiento de que la mitocondria podría producir NO^{\cdot} (Bates *et al.*, 1995; Frandsen *et al.*, 1996), ha llevado a la caracterización de dos isoformas de la NOS mitocondrial (mtNOS) (Escames *et al.*, 2006; López *et al.*, 2006). Este hecho, junto con los efectos del NO^{\cdot} tanto en situaciones fisiológicas como fisiopatológicas en la mitocondria, han permitido considerar que la disfunción mitocondrial en la EP puede deberse a una inducción de la mtNOS y el consiguiente aumento de NO^{\cdot} . Esta inducción ocurre tanto a nivel de actividad como de expresión del enzima. El NO^{\cdot} es generado por la oxidación del grupo guanidino del aminoácido L-arginina catalizada por enzimas de la familia de NO^{\cdot} sintasas (NOS), que utilizan oxígeno y nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH) como cosubstratos y generan L-citrulina como coproducto (Moncada *et al.*, 1991) (Ted M.Dawson, 2003) (Figura 4). La reacción oxidativa implica 5 electrones y esta estequiometría impar de la transferencia de electrones permite la generación de un radical libre (Koppenol & Traynham, 1996).

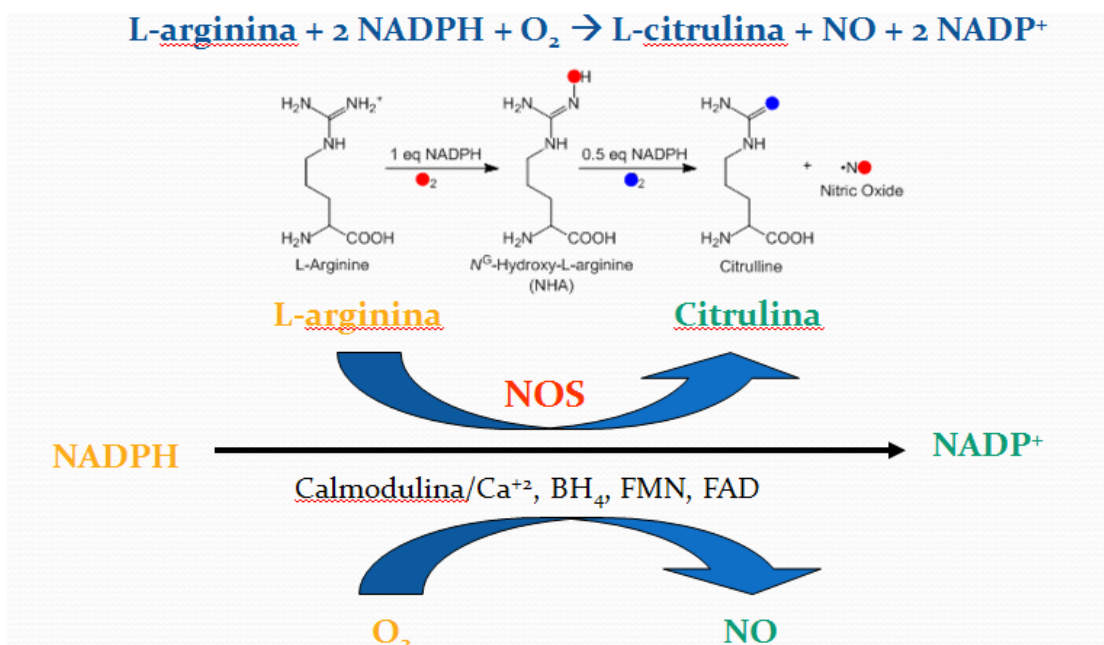


Figura 4. Reacción catalizada por las enzimas NOS.

Parte del NO^\bullet que llega a la mitocondria proviene del producido a partir de varios isoenzimas de la NOS, principalmente de la NOS citosólica neuronal (nNOS), NOS citosólica endotelial (eNOS) e iNOS, siendo esta última la que produce masivas cantidades de NO^\bullet responsables de gran parte del daño oxidativo en muchos procesos incluyendo el envejecimiento mismo y enfermedades degenerativas. Pero la mayoría del NO^\bullet presente en la mitocondria proviene de la mtNOS (Estornell *et al.*, 1993;Haynes *et al.*, 2004), la cual presenta dos isoformas, una constitutiva, Ca^{2+} -dependiente (c-mtNOS), y otra inducible, Ca^{2+} -independiente (i-mtNOS) (Escames *et al.*, 2003;Escames *et al.*, 2006;Lopez *et al.*, 2006). Además, el aumento de la actividad mtNOS, fundamentalmente de su componente inducible, es responsable de un incremento de estrés oxidativo, dañando la CTE.

Durante la EP, tiene lugar una inducción del componente inducible de la NOS como consecuencia de la reacción inflamatoria que se produce, con el consiguiente aumento de NO^\bullet , que en exceso tiene efectos nocivos sobre la función mitocondrial. Así, se inhibe el complejo I de la CTE y se produce una disminución en los niveles de ATP, alterando la función mitocondrial y generando su muerte (por necrosis o apoptosis). Por otra parte, también tiene lugar un incremento de la formación de radicales libres [$\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 y peroxinitritos (ONOO^-)]; se estima que las mitocondrias constituyen la principal fuente subcelular de ROS (Carreras (Carreras *et al.*, 2004;Balaban *et al.*, 2005;Chinopoulos & Adam-Vizi, 2006)

La SOD convierte el $\text{O}_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 mediante la reacción de Fenton; este último en presencia de Fe^{2+} produce OH^\bullet , reacción que es activada por Fe^{2+} y Cu^+ (Ebadi *et al.*, 1996).

De todos los radicales libres, el OH^\bullet resulta el más dañino, dado que su presencia, aunque sea solamente por una fracción de segundo, es capaz de destruir enzimas proteolíticos, de provocar la ruptura de polisacáridos y de causar peroxidación lipídica de la membrana (LPO), alterando su permeabilidad y las funciones asociadas (Halliwell & Gutteridge, 1984;Gotz *et al.*, 1990).

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

Las especies reactivas de nitrógeno (RNS) engloban principalmente al NO^\bullet y el producto de su reacción con el $\text{O}_2^{\bullet-}$, ONOO^- , que presentan un alto poder oxidante y son enormemente citotóxicos ya que inhiben irreversiblemente todos los complejos de la CTE, incluyendo la ATP sintasa, pudiendo ocasionar daño directo a las proteínas y al ácido desoxirribonucleico (DNA).

También constituyen un potente inductor de la LPO que puede llegar a destruir a las neuronas, las cuales son especialmente sensibles a este proceso (Mattson, 1998). El NO^\bullet compite con el oxígeno por su sitio de unión al complejo IV, es decir, a la forma reducida del centro binuclear citocromo a^3 (Fe^{2+})-CuB (Cu^+). Por tanto, el NO^\bullet es un inhibidor de la

citocromo oxidasa; esta inhibición es reversible y se ha sugerido que puede darse por dos reacciones diferentes (Brown, 2001;Brookes *et al.*, 2002)

En conjunto, todas estas especies reactivas que pueden formarse en la mitocondria van a actuar dañando proteínas, el mtDNA y oxidando lípidos, provocando en último caso la disfunción mitocondrial, mitoptosis y apoptosis (Turrens, 2003).

1.5.2. Defectos mitocondriales

De los estudios epidemiológicos se ha deducido que la mitocondria está en el epicentro de la compleja ruta fisiopatogénica de la EP. La primera vez que se plantea su implicación en la génesis de la enfermedad fue en 1989, cuando el defecto en la actividad del Complejo I fue identificado en la substantia nigra de pacientes con EP (Schapira *et al.*, 1990). En la EP, se ha observado que aproximadamente tiene lugar una disminución del 40% en la actividad del complejo I de la CTE en la SNpc, lo cual contribuye a la degeneración celular al disminuir la síntesis de ATP y por tanto, a un defecto en la bioenergética (Greenamyre *et al.*, 2001;Tretter *et al.*, 2004). Se ha sugerido la posibilidad de que mutaciones en el ácido desoxirribonucleico mitocondrial (mtDNA) puedan ser el origen del daño en el complejo I, siendo el estrés oxidativo el causante de los defectos en el mtDNA (Sherer *et al.*, 2002) y la MAO la fuente de radicales libres a este nivel.

La mitocondria es la principal fuente de energía de la célula. En ella tiene lugar la fosforilación oxidativa y el 90-95% de la síntesis de ATP de la célula (Acuña-Castroviejo *et al.*, 2001; León *et al.*, 2004), por tanto, defectos mitocondriales pueden estar implicados en la patogénesis de la EP (Beal, 2003) pudiendo ser una de las causas primarias de la enfermedad y un factor importante en su desarrollo. Cualquier alteración en la capacidad de la mitocondria para producir dicha energía puede tener consecuencias fatales; pero no sólo debido a la falta primaria de ATP, sino también al desequilibrio indirecto que se ocasionaría en las funciones derivadas, como la producción de ROS, el mantenimiento del orgánulo, la regulación de la apoptosis y la homeostasis celular del Ca^{2+} y la glucosa (Duchen, 1999;Leon *et al.*, 2004;Leon *et al.*, 2005). La disfunción de la respiración mitocondrial en la EP (Dabbeni-Sala *et al.*, 2001) afecta a todos los niveles del control motor: movimientos reflejos (rigidez), automáticos hipocinesia, temblor) y voluntarios (bradiquinesia).

Los complejos I y II de la cadena de transporte electrónico 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_2 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 5).

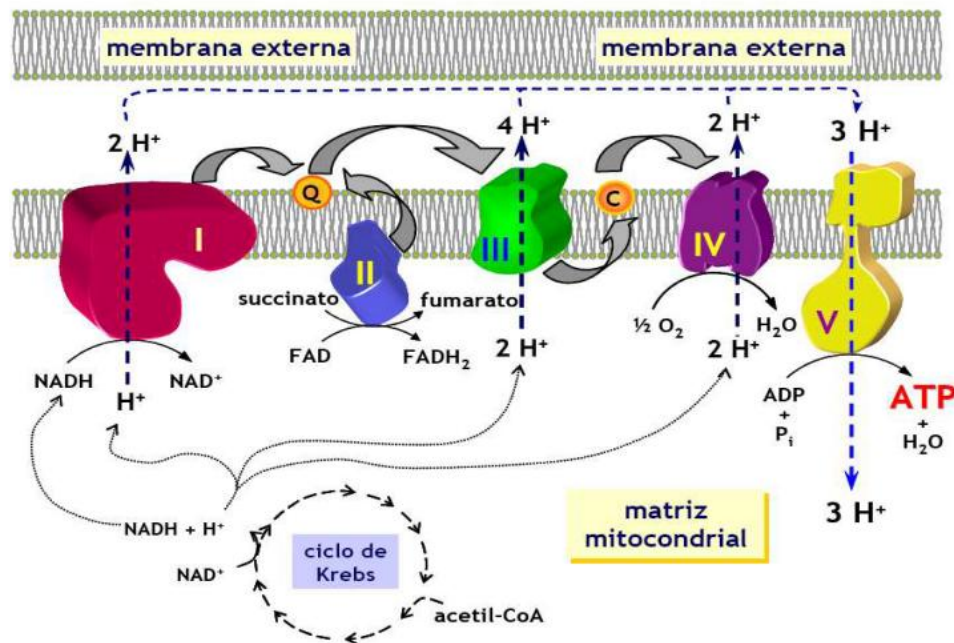


Figura 5. Esquema de la CTE acoplada a la fosforilación oxidativa.

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 *et al.*, 1996; Gu *et al.*, 1998). A su vez, se señala al estrés oxidativo como causante de los daños en el mtDNA (Sherer *et al.*, 2002). 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 *et al.*, 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 & Budd, 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 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 FADH₂, que va directamente al complejo II. Esto hace que el complejo I sea más vulnerable que el resto de complejos de la CTE al estrés oxidativo y que, al mismo tiempo, actúe como fuente de ROS. La lenta y crónica deficiencia del complejo I conlleva una acumulación de α -sinucleína la cual conduce a una disfunción del proteosoma y contribuye a la muerte celular.

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.

1.5.3 Catabolismo de la dopamina e interacción con el hierro.

1.5.3.a Acumulación de hierro en la SN.

Numerosos estudios indican que en la EP existe un funcionamiento anormal en el transporte y almacenamiento de hierro. En las neuronas dopaminérgicas de la SNpc la oxidación del Fe^{3+} (férrico) a el Fe^{2+} (ferroso) conduce a un aumento del estrés oxidativo. La SNpc contiene un mecanismo adicional para el almacenamiento de hierro: la neuromelanina. Al estudiar la expresión de transferrina y lactoferrina en la EP, se observó un aumento en la lactoferrina mientras que en el caso de la transferrina disminuía. Este incremento de lactoferrina podría ser la responsable de la excesiva acumulación de hierro en las neuronas dopaminérgicas de la SNpc. Por otro lado, se lleva a cabo una unión del hierro a la α -sinucleína, de manera que el hierro incrementa enormemente la agregación de α -sinucleína (Wolozin & Golts, 2002).

1.5.3.b Catabolismo de la dopamina.

Las neuronas dopaminérgicas son particularmente sensibles al estrés oxidativo debido al elevado y permanentemente nivel de radicales libres que se generan (Tieu *et al.*, 2003; Przedborski *et al.*, 2004; Przedborski & Ischiropoulos, 2005). La DA puede ser degradada enzimáticamente o no enzimáticamente. Tanto en la síntesis de DA por medio de la TH como en su metabolismo enzimático normal, vía MAO, se genera peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Una vez sintetizada, la DA es captada por un sistema independiente de energía y almacenada en vesículas en forma de complejos proteínicos.

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

Al presentar un grupo catecol inestable, la DA también puede sufrir oxidación espontánea originando radicales anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) y semiquinonas (SQ^{\bullet}), que reaccionan a su vez con más moléculas de DA generando un elevado número de ROS. Hay que remarcar que la pérdida neuronal es preponderante a nivel de la región lateral y ventral de la SNpc; este patrón relativamente selectivo es diferente al observado durante el envejecimiento, donde se aprecia una pérdida preferente de la población de neuronas situadas en la zona medial. También habría que tener en cuenta que tiene lugar un descenso importante de células en SNC que sintetizan glutatión peroxidasa, lo que conlleva a un defecto en la capacidad de destoxicación basal (Damier *et al.*, 1993).

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 (Dexter *et al.*, 1989; Sanchez-Ramos J.R. *et al.*, 1994).

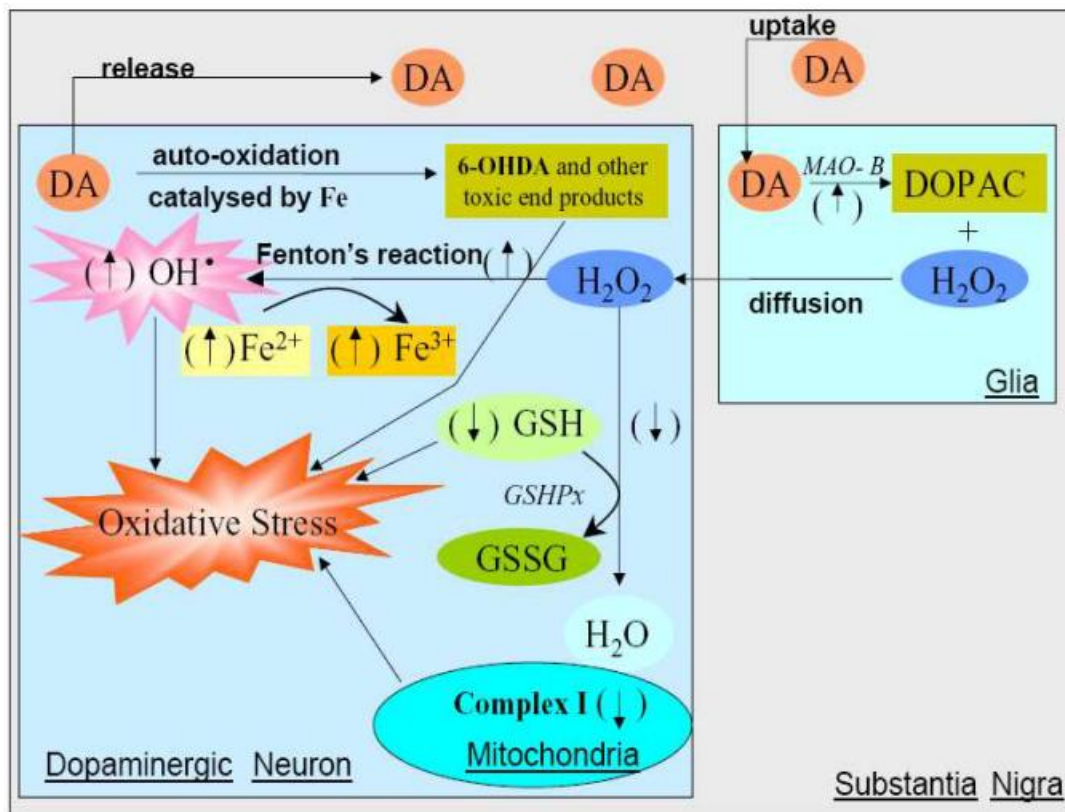


Figura 6. Vulnerabilidad de la SNpc al estrés oxidativo. Las flechas indican el incremento o disminución de los componentes cuyos niveles se alteran en la EP.

1.5.4 Excitotoxicidad.

La excitotoxicidad se podría definir como el proceso en el que hay una activación excesiva de los receptores de glutamato. El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio y su interacción con receptores específicos de la membrana es la responsable de algunas funciones neurológicas: cognición, memoria y sensación. La excitotoxicidad del glutamato fue descrita por primera vez en los años 70 (Olney *et al.*, 1971).

Uno de los efectos de la formación ROS en las células es la liberación de glutamato, un neurotransmisor excitatorio que da lugar a la denominada 'neurotoxicidad glutamatérgica' y que se debe a la unión del glutamato a su receptor NMDA (Atlante *et al.*, 2001). Existen dos tipos de receptores glutamatérgicos: receptores ionotrópicos (NMDA y no-NMDA) y los receptores metabotrópicos. En la EP tiene lugar un excesiva activación de los receptores NMDA debido a la exposición del glutamato, induciendo así un incremento en la concentración

de calcio (Ca^{2+}) intracelular que una vez que pasa al interior de la mitocondria, constituye el llamado complejo calcio-calmodulina (Ca^{2+} -CaM). Consecuentemente, se produce una activación de los enzimas Ca^{2+} -dependientes, entre ellos la óxido nítrico sintasa (NOS) generándose óxido nítrico (NO^{\bullet}) en elevadas concentraciones. Este NO^{\bullet} puede difundir a la célula presináptica, donde aumenta la liberación de glutamato GMPc-dependiente, cerrándose el ciclo y generando excitabilidad neuronal. Se ha sugerido que el descenso de los niveles de Ca^{2+} mitocondrial, seguido de un importante incremento en la concentración de Ca^{2+} citosólico, representa una etapa anterior hacia la excitotoxicidad y la muerte celular (Plaitakis & Shashidharan, 2000; Escames *et al.*, 2004). Por tanto, esta neurotoxicidad mediada por el Ca^{2+} se basa en dos mecanismos: en la producción excesiva de NO^{\bullet} y en una disfunción mitocondrial. La SN es el blanco de las entradas glutamatérgicas desde el córtex y el NST. De esta manera se acentúa el daño sobre las neuronas dopaminérgicas, ya existente per sé.

Por otra parte, el glutamato por sí solo es capaz de inhibir la recaptación de la cisteína, molécula precursora de la síntesis intracelular de glutatión, lo que provoca un descenso de las defensas de la neurona y un aumento en los niveles de radicales libres (Tan *et al.*, 1998).

Además, el estrés oxidativo puede activar la poli ADP-ribosa sintetasa (PARS), enzima nuclear que interviene en los procesos de reparación del DNA (Gaal J.C. *et al.*, 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.

1.5.5 Procesos inflamatorios:

Las células gliales, y fundamentalmente la microglía, son las principales encargadas de llevar a cabo los procesos inflamatorios en el cerebro (Benveniste *et al.*, 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 *et al.*, 2004).

Desde 1988, cuando McGeer mostró la presencia de marcadores de inflamación en el sistema nervioso central de pacientes con EP, se postuló la implicación de los eventos inflamatorios en la patogénesis de esta enfermedad neurodegenerativa. Las células de la microglía en la SNc en degeneración (McGeer *et al.*, 1988) producen NO^{\bullet} y citoquinas, como el $\text{TNF-}\alpha$. Además la expresión de iNOS está elevada en cerebros de pacientes de EP (Hunot *et al.*, 1996). Todo esto conduce a un aumento de los niveles de NO^{\bullet} y a la generación del radical peroxinitrito (ONOO^{\bullet}). 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^{\bullet} intracelulares

Se han descrito diferentes marcadores inflamatorios en cerebros parkinsonianos (Hunot & Hirsch, 2003): (a) En estudios postmortem se han encontrado importantes proliferaciones de macrófagos ameboides y microglía reactivos en la SN de pacientes con EP (McGeer *et al.*,

1988;Hirsch *et al.*, 1988); (b) también aparecen en la SN de este tipo de pacientes células gliales activadas que expresan distintas citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF)- α , la interleukina (IL)-1 β y el interferón (IFN)- γ (Mogi *et al.*, 1998;Hunot *et al.*, 1999), junto con una expresión de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (Hunot y col., 1997; Mogi *et al.*, 1998)(Hunot & Hirsch, 2003); (c) por último, se han encontrado incrementos en la expresión de IL-1 y 6 y TNF- α en el fluido cerebrospinal de pacientes con la EP.

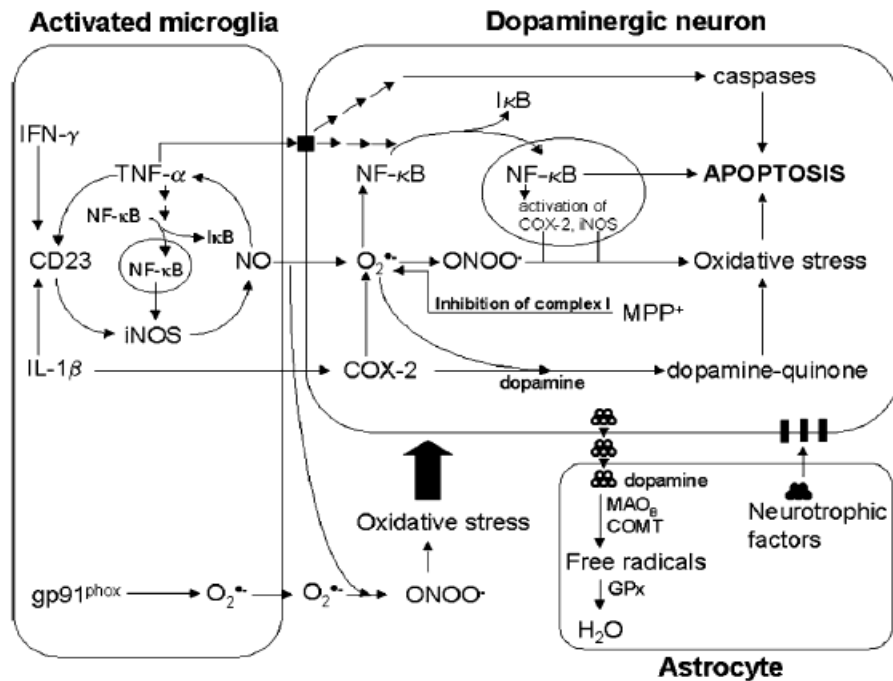


Figura 7. Implicación de las células gliales en la patogénesis de la EP. La activación de las células de la microglía contribuyen a la neurodegeneración dopaminérgica por la liberación de compuestos citotóxicos como las citoquinas (TNF- α , IFN- γ , IL-1 β) que inducen la expresión de la iNOS y por tanto, la liberación de NO \bullet , el cual puede difundir hacia las neuronas dopaminérgicas circundantes donde puede reaccionar con el O₂^{•-} (procedente de la COX-2 o de la inhibición del complejo I) formando ONOO⁻. Todo ello conduce a la muerte de la neurona. Los astrocitos pueden liberar factores neurotróficos, o metabolizar DA por la MAOB o la COMT, eliminando radicales libres a través de la GPx, presentando un efecto neuroprotector.

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 astrogiales, 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 & Herrero Ezquerro, 2004).

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

Existen diversos inductores fisiológicos/patológicos de neuroinflamación que podrían estar implicados en la degeneración del sistema dopaminérgico. Diferentes toxinas, como la 6-OHDA, el MPTP/MPP+ o la rotenona inducen un proceso inflamatorio, además de sus mecanismos tóxicos específicos.

1.5.6 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 & Ballard, Jr., 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). 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 tetrahydroisoquinolina (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 *et al.*, 1985; Naoi *et al.*, 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 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 *et al.*, 1989).

Existen muchos estudios epidemiológicos que defienden que la exposición a ciertos pesticidas se asocia con un mayor riesgo de sufrir EP (Semchuk *et al.*, 1992; Liou *et al.*, 1997; Gorell *et al.*, 1998; Petrovitch *et al.*, 2002). Además del paraquat, se han estudiado otros pesticidas como organoclorina, derivados del carbamato y rotenona (Gorell *et al.*, 1998) que, al igual que los metales, inducen la fibrilación de la α -sinucleína y provocan una degeneración de la vía nigro-estriada (Betarbet *et al.*, 2000).

1.6 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. 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 80% 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 *et al.*, 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 *et al.*, 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.

1.7 Tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

El tratamiento médico de la enfermedad de Parkinson es un tratamiento sintomático dirigido a anticolinérgicos, amantadina y L-DOPA (o levodopa) y otros fármacos dopaminérgicos principalmente, y debe continuarse durante el resto de la vida del paciente, siendo en cada caso variable el grado de mejoría alcanzado con los diversos fármacos empleados. Sin embargo, aunque para la mayoría de los pacientes estas medidas mantienen una buena calidad de vida, cuando la enfermedad progresa o cuando estos medicamentos no mejoran la movilidad o producen efectos adversos significativos, debe considerarse el tratamiento quirúrgico.

El tratamiento con L-DOPA o levodopa es en la actualidad el más eficaz contra la enfermedad corrigiendo el déficit dopamínico que existe en el núcleo estriado. El principal problema del tratamiento con L-DOPA son los frecuentes efectos secundarios que provoca. Los más comunes son los movimientos involuntarios anormales y los trastornos psíquicos en el 15-20% de los pacientes. Otro problema importante que surge con el uso de la L-DOPA es que la mejoría inicial obtenida con este tratamiento se mantiene durante 2 o 3 años, a partir de los cuales 1/3 tiende a empeorar poco a poco y otro 1/3 más rápidamente, de tal modo que a los 6 o 7 años de tratamiento continuado, la incapacidad funcional es igual o mayor que el nivel de incapacidad anterior al tratamiento.

Para hacer posible el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas se requiere un conocimiento mucho más amplio de los mecanismos que van a conducir finalmente a la muerte neuronal que ocurre en la EP, en especial de aquellas formas menos conocidas.

1.8 Modelos de EP

Existen varios modelos animales de EP mediante el uso de distintas drogas. Una de las más utilizadas es la 6-hidroxidopamina (6-OHDA) como una toxina dopaminérgica específica que destruye las neuronas dopaminérgicas mediante un mecanismo mediado por radicales libres. También 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 (Petrovitch *et al.*, 2002). La rotenona se caracteriza por ser un inhibidor altamente selectivo del complejo I de la CTE como el MPTP.

1.8.1 Modelo del tratamiento con MPTP.

El modelo animal de EP por fallo energético mitocondrial más habitual e importante es el basado en el uso del MPTP y su metabolito MPP+, un compuesto cuyo principal efecto tóxico es la inhibición de la actividad del complejo I mitocondrial (Gu *et al.*, 1998).

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 & Ballard, Jr., 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 *et al.*, 1985). Su selectividad sobre las neuronas dopaminérgicas parece ser debido a su recaptación en las terminales nerviosas del sistema dopaminérgico a través del sistema de recaptación de dopamina, el transportador de recaptación de DA (DAT) (Chiba *et al.*, 1985), con su posterior acumulación en la mitocondria.

1.8.1.a Mecanismo de acción:

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

Así, la EP puede producirse experimentalmente mediante la administración de MPTP el cual, tras entrar en la circulación sistémica, se metaboliza a su intermediario MPDP⁺ (ion 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridina), que a su vez se transforma en su metabolito activo, MPP⁺ (ión 1-metil-4-fenilpiridina), en la glía mediante la MAOB, que es un enzima de la membrana mitocondrial externa (Przedborski, 2005; Zang *et al.*, 1998). La mayoría de los datos existentes sugieren que la toxicidad se ejerce a través del MPP⁺, el cual no cruza la barrera hematoencefálica (y sí en cambio el MPTP que es altamente hidrofílico) y posteriormente se acumula en las neuronas dopaminérgicas (Dunigan & Shamo, 1996), donde es introducido a través del DAT (Storch *et al.*, 2004). El MPP⁺ se concentrado en la matriz mitocondrial de SNpc donde se une específicamente al complejo I de la CTE (Greenamyre *et al.*, 2001), inhibiendo su actividad, disminuyendo los niveles de ATP y el potencial de membrana mitocondrial, llevando a la neurona a apoptosis (Tretter *et al.*, 2004; Przedborski, 2005). Además, la inhibición del complejo I desvía el flujo de electrones hacia el complejo II, que genera de 5 a 7 veces más radicales libres que cuando los electrones pasan por el complejo I (Dyken, 1994).

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

Modelo de EP: MPTP-NOS

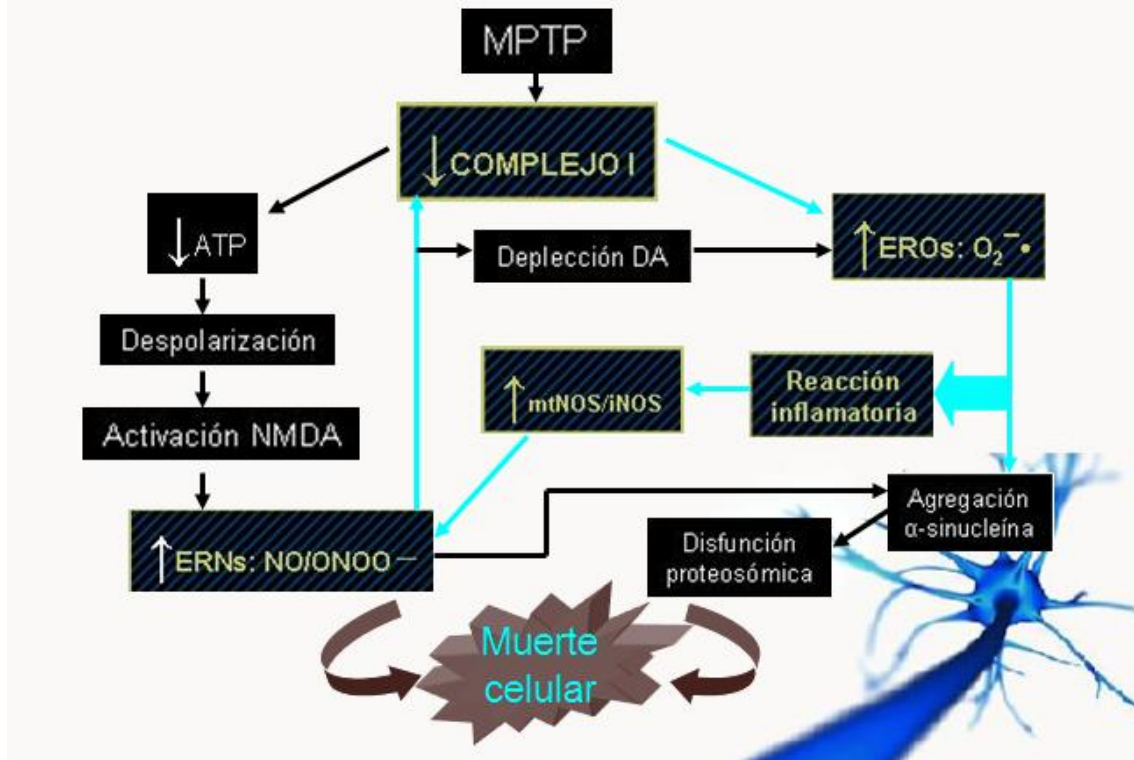


Figura 8. Mecanismo de acción del MPTP.

2. MELATONINA

2.1 Qué es la melatonina y dónde se produce.

La melatonina o N-acetil-5-metoxitriptamina (melatonina) es una indolamina producida por la glándula pineal. McCord y Allen (McCord C.P. & Allen F.B., 1917) fueron los primeros en sugerir la relación entre función de la pineal y pigmentación. La melatonina como tal se aisló por primera vez a partir de extractos de glándula pineal de oveja por Lerner en 1958, que descubrió las hormonas melanocito-estimulante y β -MSH que oscurecían la piel. En búsqueda de una molécula que pudiera aclarar la piel, por derivar de la serotonina y por referencia a la melanina la denominó melatonina. Un año más tarde, en 1959, este mismo grupo dilucidó su estructura química (Figura 9).

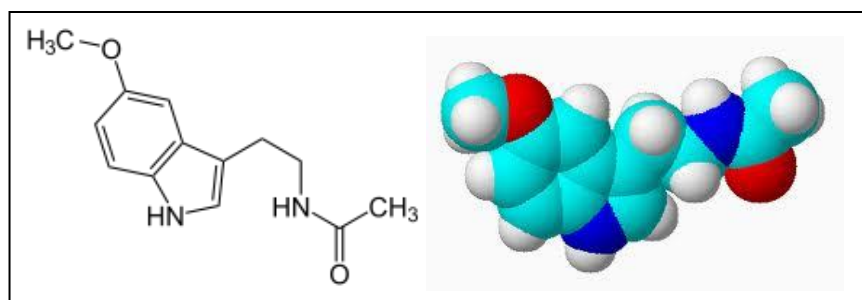


Figura 9. Estructura química de la melatonina.

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 & Heinzelman, 1960).

Su producción muestra variaciones a lo largo del día vinculadas al ciclo circadiano generado por un “reloj” o marcapasos interno situado en el hipotálamo, que es el núcleo supraquiasmático (NSQ), el cual está sincronizado con el ciclo luz-oscuridad durante las 24 h del día (Moore R.Y., 1978). Es un ciclo que influye de forma decisiva en los seres vivos ya que determina sus actividades vitales y comportamiento. A medida que la melatonina se sintetiza es liberada a la circulación, por lo que sus niveles plasmáticos son un buen indicador de su producción, del orden de picomolar/nanomolar (Reiter, 1991).

Actualmente, se ha demostrado la síntesis extrapineal de melatonina por otras células y tejidos, tales como la retina, la glándula harderiana, la mucosa del intestino, el cerebelo, el epitelio respiratorio, el hígado, el riñón, el timo, el tiroides, el páncreas, los ovarios, el cuerpo carotídeo, la placenta y el endometrio, así como en células no endocrinas tales como las células NK, los eosinófilos, las plaquetas y células endoteliales (Kvetnoy *et al.*, 2002).

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 *et al.*, 2001), lo que sugiere que cada tejido puede producir

la melatonina que necesita en cada momento, sin depender de la melatonina circulante. Además, esta melatonina extrapineal se produce en cantidades mucho mayores que la pineal, alcanzando concentraciones del orden micromolar (Reiter & Tan, 2003) a lo que podemos sumar que, en el interior de los orgánulos subcelulares, la concentración de melatonina puede variar, y algunos autores han descrito que los niveles de esta indolamina en núcleo y en mitocondria pueden ser significativamente mayores que en plasma, de 2-3 órdenes de magnitud mayores (Menendez-Pelaez & Reiter, 1993; Acuna-Castroviejo *et al.*, 2003)

2.2 Biosíntesis y metabolismo de la melatonina.

La biosíntesis pineal de melatonina comienza con la captación de su precursor, el aminoácido esencial L-triptófano (L-TRP), que es tomado de la sangre por los pinealocitos, a través de un mecanismo de transporte activo que está bajo control adrenérgico (Alonso R., 1999), y convertido en serotonina mediante una hidroxilación y una descarboxilación. Este proceso de dos pasos implica respectivamente a las enzimas triptófano hidroxilasa (TPH) y L-aminoácido aromático descarboxilasa (AADA). Las concentraciones de serotonina en la glándula pineal, que son de manera general mucho mayores que en el resto del cerebro, son especialmente elevadas durante el día, pero caen marcadamente durante la noche como consecuencia de su conversión a melatonina. Esta conversión nocturna implica un proceso enzimático de dos pasos. Inicialmente, la enzima arilalquilamina N-acetiltransferasa (AA-NAT), que muestra un incremento de actividad de 30 a 70 veces mayor durante la noche, convierte la serotonina en N-acetilserotonina. La N-acetilserotonina incrementa así su concentración a valores entre 10 y 30 veces mayores de los que existen durante el día. Después, la enzima hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT), que también incrementa su actividad durante la noche, metila la N-acetilserotonina para producir N-acetil-5-metoxitriptamina, más comúnmente conocida como melatonina (Figura 10).

Alternativamente a la formación de N-acetilserotonina, en la pineal puede producirse la desaminación de la serotonina por monoamino oxidasas, siendo el producto resultante oxidado a ácido 5-hidroxiindolacético o reducido a 5-hidroxitriptofol, ambos susceptibles de transformación por la HIOMT para dar lugar a ácido 5-metoxindolacético y 5-metoxitriptofol, respectivamente.

La síntesis y liberación pineal de melatonina a la circulación está por tanto bajo la influencia del ciclo luz/oscuridad (Liebmann *et al.*, 1997), ya que la luz deprime rápidamente la actividad de las enzimas pineales. Si se invierten las condiciones de luz exterior se invierten de modo paralelo las actividades enzimáticas y la biosíntesis pineal de indolaminas. Así, el ritmo diario de actividad biosintética pineal está controlado por los cambios naturales diarios en la duración de la iluminación. Este ritmo se pierde en condiciones de iluminación continua mientras que se mantiene, aunque disminuido, si los animales se mantienen en la oscuridad.

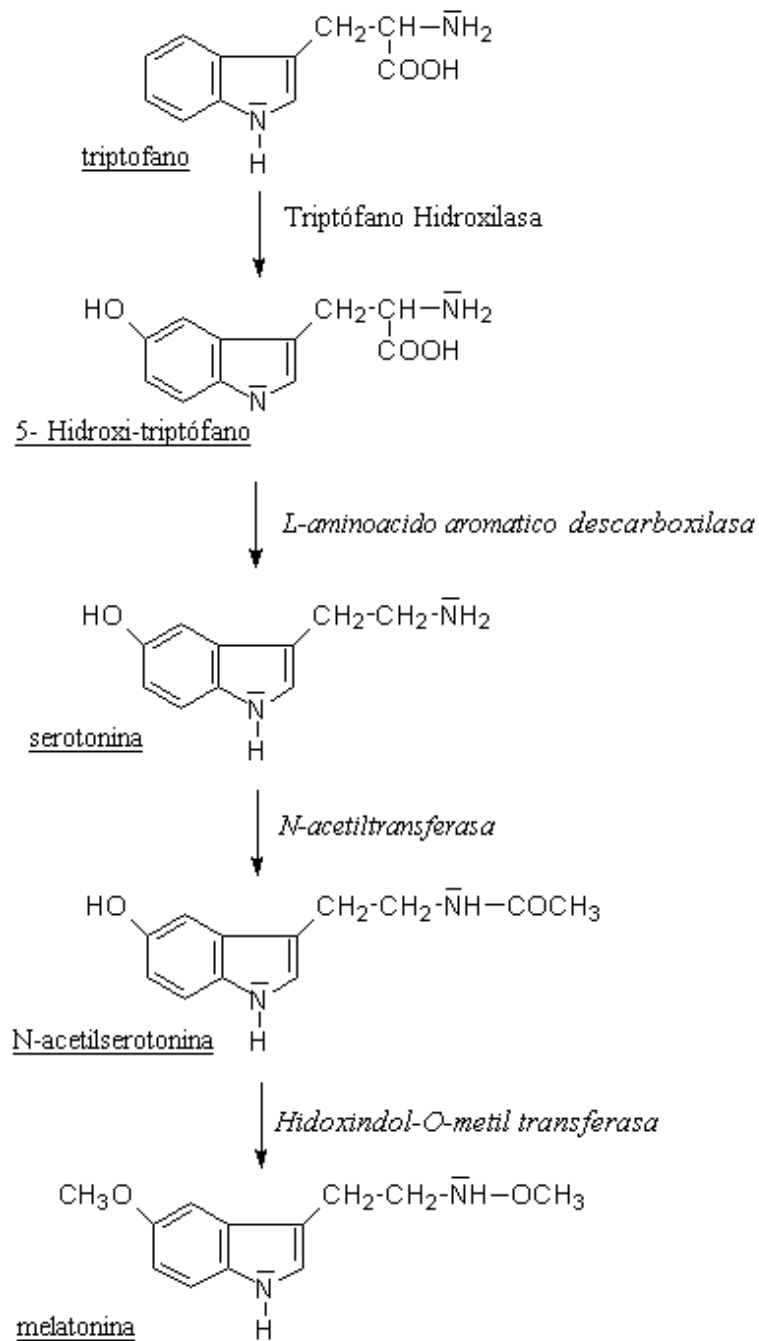


Figura 10. Síntesis de melatonina a partir de la serotonina en la glándula pineal.

La degradación de la melatonina el cerebro tiene lugar en el plexo coroideo y pineal. En este caso, la melatonina se transforma primero en N1-acetil-N2-formil-5-metoxikinurenamina (AFMK) y después en N-acetil-5-metoxikinurenamina (AMK) (Hirata *et al.*, 1974; Josefa León *et al.*, 2006), siendo esta una de las vías más importantes de metabolización de la melatonina en cerebro de mamíferos. La melatonina puede transformarse de forma no

enzimática en AMK, cuando depura en primer lugar un OH[•] y en segundo lugar un radical O₂^{•-} (Fujiwara *et al.*, 1978).

Es interesante el hecho de que los metabolitos cerebrales de la melatonina, el AFMK y su metabolito deformilado, el AMK (Hardeland & Pandi-Perumal, 2005) manifiestan importantes propiedades antioxidantes, mayores que la melatonina (Tan *et al.*, 2001) (Mayo *et al.*, 2005). El AMK es más potente para inhibir 'in vitro' e 'in vivo' la actividad NOS estriatal que la melatonina (Hirata *et al.*, 1974; Josefa León *et al.*, 2006; Josefa León *et al.*, 2006).

2.3 Mecanismos de acción de la melatonina.

En los últimos 25 años un creciente número de estudios describen nuevos mecanismos de acción de la melatonina. Las acciones de la melatonina dependen de mecanismos mediados y no mediados por receptor, estos últimos son la base de las propiedades antioxidantes de la melatonina (Reiter *et al.*, 2007). Los mecanismos de la melatonina mediados por receptor engloban tanto receptores de membrana como nucleares (Conway *et al.*, 2000; Acuna-Castroviejo *et al.*, 1994; Becker-Andre *et al.*, 1994) (Wiesenberg *et al.*, 1995) y se ha propuesto la existencia de un mecanismo de señalización membrana-núcleo (Carlberg & Wiesenberg, 1995).

Hasta la fecha se han clonado tres receptores de membrana de melatonina (MT1, MT2 y Mel1c) asociados a una proteína Gi de los cuales dos se encuentran en mamíferos y se han caracterizado en humanos (Conway *et al.*, 2000). En cuanto al receptor nuclear de melatonina pertenece a la familia de los receptores retinoicos (RZR/ROR) (Acuna-Castroviejo *et al.*, 1993) (Carlberg & Wiesenberg, 1995) identificados y caracterizados en órganos periféricos y células del sistema nervioso central (Becker-Andre *et al.*, 1994; Carlberg *et al.*, 1994) (Giguere *et al.*, 1994).

La naturaleza lipofílica de la melatonina y la existencia de mecanismos activos de captura de la molécula hacen que pueda actuar directamente sobre cascadas de transducción, por lo que determinadas acciones de la misma podrían llevarse a cabo sin la intermediación de sus receptores (Menendez-Pelaez & Reiter, 1993; Finocchiaro & Glikin, 1998).

Además de la implicación de la melatonina en la fisiología circadiana y de reproducción, estudios posteriores permitieron relacionarla con aspectos de la fisiología intracelular independientes de su acción hormonal. Así, se demostró que la melatonina es un potente depurador de radicales libres y con capacidad antiinflamatoria (Cuzzocrea & Reiter, 2002) (Reiter *et al.*, 2000b; Reiter *et al.*, 2000a) (Tan *et al.*, 1993) Además potencia la respuesta del sistema inmune a través de los linfocitos T-helper. Asimismo, se demostró la capacidad de la melatonina para unirse a proteínas citosólicas como la proteína quinasa C (PKC) (Benítez-King (Benitez-King *et al.*, 1996), la CaM (Pozo *et al.*, 1994) (Josefa León *et al.*, 2000) y la calreticulina (Macias *et al.*, 2003), permitiendo esta interacción modular las acciones intracelulares del Ca²⁺.

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

2.3.1 La melatonina como antioxidante.

La melatonina tiene múltiples acciones como un antioxidante actuando como un protector celular. Al ser muy lipofílica, atraviesa todas las membranas celulares, además de las barreras hematoencefálica y placentaria, por lo que su actividad antioxidante se realiza a todos los niveles de la célula (membrana, citosol, mitocondria y núcleo).

Las propiedades antioxidantes de la melatonina se describieron inicialmente por Iltis y colaboradores en 1991 (Iltis *et al.*, 1991). La melatonina actúa como depurador de radicales libres, sobre todo del peligroso radical OH^{\cdot} (Khalid *et al.*, 2000) (Reiter *et al.*, 2002) (Tan *et al.*, 2002), de ROO^{\cdot} (Pieri *et al.*, 1994) y oxígeno singlete (Cagnoli *et al.*, 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 *et al.*, 1998). La melatonina depura también radicales de nitrógeno, principalmente NO y ONOO^{\cdot} (Reiter *et al.*, 2003).

Las funciones de la melatonina como un antioxidante incluyen:

a) Acción directa: atrapa directamente radicales libres tanto de ROS como de RNS (Reiter *et al.*, 2000c; Acuna-Castroviejo *et al.*, 2001). La capacidad de eliminación de radicales hidroxilo se debe a su estructura química; concretamente, estriba en el grupo metilo en posición 5 -OH del anillo indol.

b) Acción indirecta: estimula la actividad de enzimas antioxidantes, mediante la regulación de la expresión génica de determinados enzimas de oxido-reducción como la glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, catalasa y posiblemente superóxido dismutasa, e inhibe la expresión y actividad de enzimas prooxidantes como la NOS (Antolin *et al.*, 2002; Acuna-Castroviejo *et al.*, 2002; Escames *et al.*, 2003; Acuna-Castroviejo *et al.*, 2005).

d) Incrementa la eficiencia de la fosforilación oxidativa mitocondrial y reduce el escape de electrones potenciando la actividad de todos los componentes de la CTE (Lopez *et al.*, 2009).

e) Aumenta la eficiencia de otros antioxidantes: el grupo N-acetil ejerce una acción sinérgica (Tan *et al.*, 1993) con las vitaminas C y E. Se ha evidenciado la acción antioxidante de la melatonina frente a otros radicales, concretamente los radicales eróxido (Pieri *et al.*

al., 1994;Scaiano, 1995) y el singlete de oxígeno (Reiter *et al.*, 1994;Acuna-Castroviejo *et al.*, 1995).

2.3.2 Melatonina y mitocondria.

Como se ha mencionado anteriormente, la disfunción mitocondrial, con una caída en la producción de ATP, puede estar asociada con un incremento en 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 de electrones en la CTE.

Debido a la alta lipofiliidad de la melatonina y consecuente facilidad para atravesar membranas celulares, está puede almacenarse en el interior de la célula e incluso en compartimentos subcelulares, incluyendo la mitocondria, donde puede acumularse a altas concentraciones (Acuna-Castroviejo *et al.*, 2002;Acuna-Castroviejo *et al.*, 2003) (Leon *et al.*, 2004) y también en núcleo (Menéndez-Peláez (Menendez-Pelaez & Reiter, 1993) estabiliza su membrana interna (Garcia *et al.*, 1999) y mejora la actividad de la CTE (Lopez *et al.*, 2009).

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, 1992). Una disfunción así en la mitocondria conduce 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 *et al.*, 2000;Zamzami & Kroemer, 2001)im y (Kim *et al.*, 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 (Leon *et al.*, 2004). De hecho, el efecto antiapoptótico de la melatonina se ha descrito en muchos sistemas y en diferentes situaciones (Sainz *et al.*, 2003).

2.3.2.a Acción sobre la mtNOS:

La melatonina ejerce un importante efecto antioxidante indirecto debido a su capacidad para regular la producción de NO a través de su interacción con enzimas que lo sintetizan (Josefa León *et al.*, 2004). La melatonina inhibe la actividad de la NOS neuronal (nNOS) en cerebelo (Pozo *et al.*, 1994), hipotálamo (Bettahi *et al.*, 1998) y estriado (Leon *et al.*, 1998), mediante su unión al complejo calcio-calmodulina (Leon *et al.*, 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.

Además las acciones antiinflamatorias de la melatonina están relacionadas con su capacidad para reducir la expresión y actividad de la iNOS y de la COX-2 en diferentes modelos de inflamación (Crespo *et al.*, 1999;Acuna-Castroviejo *et al.*, 2005;Mayo *et al.*, 2005). Recientemente se ha demostrado que la melatonina también puede inhibir la expresión y actividad de la i-mtNOS, recuperando así la función mitocondrial (Escames *et al.*, 2006a;Lopez *et al.*, 2006). Además, la melatonina puede inhibir la excitotoxicidad dependiente de la nNOS a través de la inhibición de la actividad de la nNOS y la activación del receptor NMDA (Escames *et al.*, 2004).

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

Por tanto, la melatonina inhibe la producción de NO $^{\bullet}$ que se produce en el Parkinson, restaurando la función mitocondrial y reduciendo el estrés oxidativo.

2.3.2 b Antioxidante de acción directa.

La melatonina y algunos de sus metabolitos poseen la capacidad de depurar por sí mismos algunas especies reactivas de especial interés en la mitocondria (Acuna-Castroviejo *et al.*, 2001) (Russel J.Reiter *et al.*, 2003).

La primera evidencia que mostró esta capacidad de la indolamina fue la neutralización del OH $^{\bullet}$ (Stasica *et al.*, 1998), al depurar dos radicales OH $^{\bullet}$ por cada molécula de melatonina y produciéndose 3-hidroximelatonina cíclica (3-OHmelatonina) que se elimina por la orina y constituye un índice muy fiable para la medición del estrés oxidativo en el organismo (Tan *et al.*, 2002).

Otro mecanismo por el cual la melatonina neutraliza al radical OH $^{\bullet}$ consiste en que la indolamina cede un electrón al radical, transformándose en el denominado catión radical indolilo (Hardeland & Pandi-Perumal, 2005;Poeggeler *et al.*, 1994). Éste interacciona entonces con un anión radical O $2^{\cdot-}$, precursor del OH $^{\bullet}$, para generar AFMK, que se elimina por la orina. En este caso, la melatonina elimina en realidad dos radicales libres a la vez.

Se ha demostrado que la melatonina depura también el H_2O_2 , dando lugar a AFMK, que se transforma en AMK por acción de una formamidasa (Tan *et al.*, 2003). Puesto que el AFMK también puede actuar como depurador de radicales libres, el efecto de la melatonina da lugar a una cascada de reacciones protectoras (López-Burillo *et al.*, 2003). Estos experimentos también han sido comprobados 'in vivo' (Reiter *et al.*, 2003). Tanto la 3-hidroximelatonina cíclica como el AFMK, productos de la reacción de la melatonina con OH^\bullet y H_2O_2 respectivamente, parecen tener funciones depuradoras de agentes tóxicos (Darío Acuña-Castroviejo *et al.*, 2001; Reiter & Tan, 2003; Josefa León *et al.*, 2004).

Diversos autores han indicado la posible capacidad de la indolamina para depurar $O_2^{\bullet-}$ (Marshall *et al.*, 1996; Zang *et al.*, 1998), aunque este hecho aún está por confirmar, especialmente 'in vivo', ya que la reacción por la cual la melatonina ejercería esta acción no se conoce (Darío Acuña-Castroviejo *et al.*, 2001; Reiter & Tan, 2003; Josefa León *et al.*, 2004).

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

Además de las ROS, la melatonina actúa como depuradora de RNS, reaccionando con el NO^\bullet para formar N-nitrosomelatonina, así como con los $ONOO^-$, formando un producto aún no del todo clarificado puesto que diferentes grupos han hallado diferentes productos en la reacción de la melatonina con el $ONOO^-$ (Darío Acuña-Castroviejo *et al.*, 2001; Reiter & Tan, 2003; Josefa León *et al.*, 2004).

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 *et al.*, 1994) (Antolin *et al.*, 1996).

2.3.2.c Antioxidante de acción indirecta.

Junto a la capacidad intrínseca para depurar radicales libres, la melatonina posee la capacidad de estimular la actividad y expresión (Kotler *et al.*, 1998) Antolín (Antolin *et al.*, 2002; Mayo *et al.*, 2005) de otros sistemas antioxidantes, estableciendo así una forma de acción indirecta para la reducción del estrés oxidativo. En primer lugar, la melatonina estimula el ciclo del glutatión, aumentando la actividad de la GPx y de la GRd, disminuyendo los niveles de GSSG regulando así el balance glutatión oxidado (GSSG)/GSH (Pablos *et al.*, 1998; Miguel Martín *et al.*, 2000). Estos resultados concuerdan con otros que muestran que la melatonina mantiene la homeostasis del GSH en cerebro (Floreani *et al.*, 1997) y en la mucosa gástrica (Othman *et al.*, 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 *et al.*, 2004).

Además, la melatonina aumenta la producción de GSH por la estimulación de la γ -glutamilcisteina sintasa, enzima limitante en la ruta de síntesis de glutatión (Urata *et al.*, 1999); y también estimula la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD), la cual genera el NADPH requerido por la GRd (Pierrefiche & Laborit, 1995). En el mismo sentido, se ha descrito que la melatonina estimula otros enzimas antioxidantes como la SOD y la catalasa (Darío Acuña-Castroviejo *et al.*, 2001; Reiter & Tan, 2003; Josefa León *et al.*, 2004). También ejerce una acción sinérgica con otros antioxidantes como la vitamina E y C (Russel J. Reiter *et al.*, 2003).

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

2.3.2.d Potenciación de la CTE.

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

Basado en estos resultados, es razonable pensar que el efecto de la melatonina en la regulación de la actividad de los complejos de la CTE no sólo se basa en el papel antioxidante de la indolamina. En efecto, el alto potencial redox de la melatonina (0.94 V) (Tan *et al.*, 2000) sugiere que ésta puede interactuar con los complejos de la CTE donando y aceptando electrones y de esta manera aumentar el flujo electrónico, un efecto que no poseen otros antioxidantes (Miguel Martín *et al.*, 2002).

En otros modelos experimentales, se demostró asimismo que la administración de melatonina aumenta la actividad de los cuatro complejos respiratorios y del complejo V, dando lugar a un aumento de la capacidad de la mitocondria para producir ATP, junto con un descenso del consumo de oxígeno manteniendo la eficiencia de la fosforilación oxidativa y el RCR, al mismo tiempo que disminuye el potencial de membrana. Todo ello conduce un menor escape de electrones y por tanto a una menor producción de radicales libres (López A., 2008). Estos efectos se han visto en multitud de órganos del animal, incluido hígado, cerebro,

pulmón, corazón, diafragma y músculo esquelético (Escames *et al.*, 2006; López *et al.*, 2006). Es, por tanto, un efecto general de la melatonina y no restringido a un determinado órgano.

2.4 Melatonina y neurodegeneración.

La producción endógena de melatonina disminuye con la edad en todas las especies donde se ha estudiado (Poeggeler *et al.*, 1994). 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 *et al.*, 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 *et al.*, 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 (Khaldy *et al.*, 2000; Khaldy *et al.*, 2003; Absi *et al.*, 2000; Ortiz *et al.*, 2001; Antolin *et al.*, 2002)

Según la fisiopatología de la EP y las propiedades y acciones de la melatonina, parece obvio que la administración farmacológica de la indolamina podría tener efectos beneficiosos sobre dicha enfermedad. Así, con el objetivo de determinar si la melatonina tiene un papel beneficioso en la EP, que cursa con un elevado índice de estrés oxidativo (inhibición del complejo I, descenso de GSH, aumento de LPO, daño en el ADN), se han desarrollado multitud de modelos experimentales de la enfermedad '*in vivo*' e '*in vitro*', en los que se ha visto que la melatonina desempeña un papel protector.

En el modelo de Parkinson inducido por MPTP en ratones C57/Bl6 nuestro grupo ha demostrado que la melatonina previene el desarrollo de la enfermedad y la apoptosis neuronal (Ortiz *et al.*, 2001; Antolin *et al.*, 2002); algo similar ocurre en el modelo de 6-OHDA en células PC12 (Mayo *et al.*, 1999).

La primera evidencia de una relación especial entre melatonina y Parkinson proviene de la observación de una disminución en la actividad pineal y por tanto, de una reducción en las concentraciones de melatonina en pacientes con la EP. Conocidas ya las propiedades depuradoras de radicales libres de la melatonina, numerosos estudios han sido dirigidos en base a testar la habilidad antioxidante de la melatonina en distintos modelos de Parkinson, tanto '*in vitro*' como '*in vivo*'.

De esta manera, se ha observado que la indolamina es capaz de inhibir los efectos prooxidantes de la DA y la L-dihidroxifenilalanina (L-dopa) '*in vitro*' (Miller *et al.*, 1996), datos que fueron confirmados por nuestro grupo (Khaldy *et al.*, 2000) que además demostró que la melatonina era más efectiva que el trolox (análogo de la vitamina E) en la prevención de la autooxidación de la DA.

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 (Acuna-Castroviejo *et al.*, 1997). Sin embargo, la indolamina no recupera la actividad de dicho enzima una vez que se ha perdido (Khaldy *et al.*, 2003).

Jin y cols. (Jin *et al.*, 1998) publicaron que una dosis de 10 mg/kg de melatonina era suficiente para la protección de las neuronas dopaminérgicas, contrarrestando el incremento de los productos de la LPO en la SN de ratas tratadas con MPP+ y además, manteniendo la actividad TH, que normalmente disminuye después del tratamiento con la toxina. Tanto en los tratamientos agudos como en los crónicos, la indolamina es igualmente efectiva en la reducción del daño mediado por MPP+. Por otro lado, la melatonina aumenta el número de neuronas TH positivas (enzima sintetizador de DA); sin embargo, la indolamina no recupera la actividad de dicho enzima una vez que se ha perdido. Así, la melatonina previene la inhibición del complejo I y la autooxidación de la DA, 'in vitro' (Khaldy *et al.*, 2000).

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

Cuando la melatonina era suministrada conjuntamente con MPTP, se observó que la indolamina evitaba la muerte de neuronas dopaminérgicas en la SNpc y reducía enormementela pérdida de inmunoreactividad TH en ST y SN (Antolin *et al.*, 2002).

En otros trabajos se ha demostrado que la melatonina previene la autooxidación de la DA (Khaldy *et al.*, 2003) y presenta propiedades neuroprotectoras en diferentes modelos de neurodegeneración, incluido el modelo de Parkinson inducido por MPTP (Thomas (Thomas & Mohanakumar, 2004; Mayo *et al.*, 2005).

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

La melatonina protege frente a la desfragmentación del ADN inducida por MPTP (Ortiz *et al.*, 2001) y frente a la deficiencia en el complejo I tras la administración de MPTP (Khaldy *et al.*, 2003) y 6-OHDA (Dabbeni-Sala *et al.*, 2001). La mitocondria desempeña un papel clave en la función neuroprotectora de la melatonina en los procesos neurodegenerativos (Acuna-Castroviejo *et al.*, 2002; Leon *et al.*, 2005). Otros trabajos muestran como la melatonina mantiene las concentraciones de GSH en la SN de ratas tratadas con MPTP (Chen *et al.*, 2002). Parece ser que el principal mecanismo por el cual la melatonina protege frente al Parkinson es su capacidad antioxidante/antiinflamatoria. Así, un reciente estudio demuestra que la melatonina reduce la formación 'in vivo' de OH[•] después de la administración de MPTP, sin afectar a la actividad MAOB (Thomas & Mohanakumar, 2004). En el modelo de EP, producido por la administración de rotenona (Ranjita Betarbet *et al.*, 2006), Couloum y Birman (Couloum & Birman, 2004) observaron que la

melatonina presentaba mayor eficacia que la L-dopa para contrarrestar la pérdida selectiva de neuronas dopaminérgicas y daño locomotor en la mosca de la fruta.

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

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

La toxicidad celular inducida por 6-OHDA está mediada por la formación de radicales libres. Por esta razón, las propiedades antioxidantes de la melatonina presumiblemente explicarían su habilidad para suprimir tanto la necrosis como la apoptosis. Existen trabajos que demuestran las acciones antioxidantes directas de la melatonina: la indolamina elimina la producción mitocondrial de ROS durante el daño celular inducido por H₂O₂ en astrocitos de rata (Jou *et al.*, 2004).

Otra prueba que demuestra la acción directa de la melatonina es la reducción en los residuos de nitrotirosina durante la neurotoxicidad dopaminérgica (Imam *et al.*, 2001).

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

Por otro lado, la melatonina puede proteger fisiológicamente a través de la activación de la expresión génica del factor neurotrófico derivado de la célula glial (GDNF) (Armstrong & Niles, 2002). Consecuentemente, se ha pensado que estas acciones antioxidantes tanto directas como indirectas, podrían ser importantes mediadores de las acciones antiparkinsonianas de la melatonina; además, parece ser que también están implicadas las acciones genómicas de la melatonina. La indolamina también desarrolla un papel en la inflamación que aparece en la SN durante la EP. En efecto, se ha observado que la melatonina previene la activación de la iNOS (Escames *et al.*, 2006b) y de la COX-2 (Deng *et al.*, 2006), así como previene la activación microglial por parte de la indolamina (H.Y.CHUNG *et al.*, 2004).

Existen numerosos datos que sugieren o indican que la melatonina interviene en la homeostasis mitocondrial manteniendo, entre otros, los niveles de GSH y la actividad de la cadena respiratoria (Acuna-Castroviejo *et al.*, 2002;Leon *et al.*, 2005). Como se ha descrito,

la mitocondria es la mayor fuente de producción de ROS en la célula. Dado el papel crítico que desempeña la mitocondria en la muerte celular programada y en la EP, es lógico pensar que la acción de la melatonina a nivel mitocondrial podría explicar sus efectos antiapoptóticos (Dabbeni-Sala *et al.*, 2001). También se conoce la capacidad de la melatonina para aumentar la síntesis de ATP mediante la inducción de los complejos mitocondriales (Miguel Martín *et al.*, 2002); ello podría conferir protección en el caso de cambios oxidativos en las células dopaminérgicas. Adicionalmente, la melatonina previene el exceso de Ca²⁺ inducido por las ROS y la despolarización de la membrana mitocondrial (Jou *et al.*, 2004). La indolamina también protege el ADNmt, el cual es particularmente vulnerable al daño oxidativo, por lo que mantiene indirectamente el metabolismo mitocondrial.

El compendio de todos estos resultados, demuestran que la mitocondria es una de las principales dianas de la melatonina, en cuanto a sus acciones neuroprotectoras.

Finalmente, la melatonina presenta un efecto sinérgico con el deprenil para recuperar los niveles de DA perdidos tras la exposición al MPTP, así como la actividad locomotora de los ratones tratados (Khaldy *et al.*, 2003). Estos resultados sugieren que la terapia combinada entre el efecto antioxidante de la melatonina y el efecto del deprenil para inhibir la actividad de la MAOB, es una buena estrategia para el tratamiento de la enfermedad. Hay que tener en cuenta también que el deprenil ejerce un efecto antioxidante importante, que puede participar en cierta medida en sus efectos neuroprotectores.

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

Hipótesis

Summary

A direct relationship between inflammation, iNOS expression and mitochondrial damage exist, and these events occur before dopaminergic degeneration in Parkinson's disease takes place. Thus, our hypothesis is that the iNOS increase in SN after MPTP administration will yield an i-mtNOS induction and NO production, potentiating the MPP+-dependent complex I inhibition. The neuronal death in the ST during the PD, however, seems to depend more directly from the increase in nNOS. Accordingly, the SN of iNOS ko mice and the ST of nNOS ko mice should be more protected, respectively, against MPTP administration. Melatonin, which inhibits the expression and activity of iNOS and nNOS, should display neuroprotective features against MPTP administration to mice.

The development of new neuroprotective drugs is being braking by our relative lack of knowledge regarding the mechanisms involved in neuronal cell death during PD. If melatonin treatment reduces iNOS activity decreasing the mitochondrial damage, the design of synthetic compounds structurally analogues to melatonin may yield new pharmacological tools with selective inhibition against iNOS/i-mtNOS and neuroprotective properties.

Debido a la relación directa entre inflamación, expresión de la iNOS y daño mitocondrial que precede a la degeneración DAérgica en el Parkinson, nuestra hipótesis es que el aumento de iNOS en SN tras la administración de MPTP, va a condicionar un aumento de la i-mtNOS, que dará lugar a un aumento del NO intramitocondrial, lo que a su vez potencia la inhibición del complejo I producida por el MPP+. Sin embargo, la muerte neuronal en la ST durante la EP parece deberse más a un proceso excitotóxico derivado del aumento de la nNOS. En consecuencia, los ratones KO para la iNOS pueden tener su SN más protegida tras la administración de MPTP, mientras que lo KO para la nNOS probablemente sufran menos daño en ST. En esas condiciones, la melatonina, que es un inhibidor de la expresión de la iNOS y reduce la actividad de la nNOS, debe tener un efecto neuroprotector en el modelo de EP inducido por MPTP.

El desarrollo de nuevos fármacos neuroprotectores está frenado por nuestro limitado conocimiento de los mecanismos reales por los cuales mueren las neuronas dopaminérgicas. Si el tratamiento con aMT, y de forma similar su metabolito, va a reducir de forma considerable la actividad de la NOS (tanto citosólica como mitocondrial), principalmente de su componente inducible, disminuyendo el daño oxidativo mitocondrial, el uso de compuestos sintéticos análogos a la aMT puede proporcionarnos nuevas herramientas farmacológicas con selectividad mayor para inhibir la iNOS/i-mtNOS, y susceptibles de ser usadas en la clínica

Objetivos

Partiendo de nuestra hipótesis, este proyecto pretende, en primer lugar, estudiar la participación de la NOS en el daño mitocondrial y degeneración dopaminérgica en SN y ST en el modelo de Parkinson inducido por MPTP en ratones normales, comparándolos con ratones knockout para la iNOS y para la nNOS. Si, como esperamos por el planteamiento de la hipótesis, las isoformas de la NOS participan en dicho proceso, su inhibición selectiva sería una estrategia importante a seguir para el tratamiento del Parkinson. La experiencia con proyectos anteriores nos ha permitido obtener una serie de moléculas sintéticas estructuralmente análogas a la melatonina y sus metabolitos cerebrales, algunas de las cuales se ensayan aquí para valorar su actividad selectiva para la iNOS/nNOS.

Para ello, analizaremos los siguientes objetivos:

- 1.- Estudiar 'in vitro' la potencia y selectividad de una serie de compuestos sintéticos análogos estructurales a la melatonina y sus metabolitos cerebrales, sobre la actividad de las isoenzimas nNOS (Ca²⁺-dependiente) e iNOS (en ausencia de Ca²⁺) recombinantes.
- 2.- Estudiar el efecto 'in vivo' de algunos de los compuestos sintéticos obtenidos del estudio 'in vitro' sobre la actividad NOS, actividad del complejo I y lipoperoxidación (LPO) en SN y ST de ratones controles y tratados con MPTP.
- 3.- Estudiar el efecto de la melatonina sobre la CTE (actividad del complejo I y western-blot de complejos respiratorios); actividad NOS, y daño genómico mitocondrial, en ratones controles y deficientes en iNOS y en nNOS y tratados con MPTP.

Material y Métodos

1. Animales, procedimiento quirúrgico y tratamiento.

1.1. Animales y grupos experimentales.

Para el estudio 'in vivo' de los compuestos sintéticos se han empleado ratones de la cepa de ratón C57/Bl6 que también fue el modelo utilizado en los estudios comparativos con melatonina junto con las cepas B6129SF2/J (control nNOS) así como ratones deficientes en iNOS (B6;129S4-Nos1^{tm1Plh}/J) y nNOS (B6.129P2-Nos2^{tm1Lau}/J). Todas las cepas están estabuladas en el animalario de la Universidad de Granada, en condiciones SPF, bajo un ambiente de fotoperíodo (ciclo de luz-oscuridad de 12:12 horas) y temperatura (22 ± 1 °C) controlados, y con acceso libre al agua y a la comida (dieta estándar de laboratorio). Los ratones utilizados tienen una edad aproximada de tres meses y un peso entre 22-28 g. Todos los experimentos se han realizado acorde a las guías española y europea de cuidado de los animales.

Se establecieron 3 grupos experimentales con entre 8 y 32 ratones cada uno dependiendo de la técnica a realizar:

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

1.2. Tratamiento y procedimiento quirúrgico.

La aMT o el compuesto a analizar se administran en una dosis de 10 mg/kg una hora antes del tratamiento con la neurotoxina, vía intraperitoneal. Entonces, el MPTP se administra subcutáneamente cada dos horas, con un total de cuatro dosis de 15 mg/kg cada una. Al siguiente día y a la misma hora que el día anterior, se administra otra dosis de 10 mg/kg de aMT subcutánea o del compuesto a analizar y a la hora siguiente, procedemos a la administración de la primera dosis de MPTP, que en esta ocasión en lugar de cuatro dosis administramos tres (dosis de recuerdo). Los animales son sacrificados por dislocación cervical dos horas después de la última dosis de recuerdo, es decir, a las 30 h de comenzar el tratamiento (figura 11).

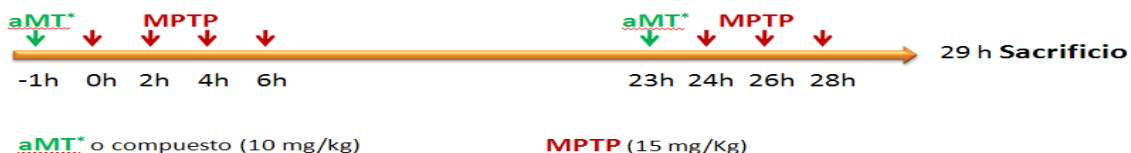


Figura 11. Representación esquemática del tratamiento seguido para ratones C57/Bl6.

Rápidamente y en frío, se extrae el cerebro, de donde se obtienen el ST y la SN, congelados inmediatamente en nitrógeno líquido y conservados a -80° C para su posterior análisis.

2. Obtención de la fracción mitocondrial.

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

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

Protocolo:

Los animales se sacrifican por dislocación cervical y el cerebro se extrae inmediatamente y las fracciones citosólicas y mitocondriales de la SN y ST se aíslan según el método de Rice (Rice J.C. & Lindsay J.G., 1997) pero con algunas modificaciones. Rápidamente se disecan el ST y la SN, se pesan y se lavan en solución salina fría y se homogenizan en tampón 0.32M sacarosa, 1 mM EDTA (K+), 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10% w/v con un homogenizador de teflón (Stuart Scientific, mod. SS2) a 700 rpm. Todas estas manipulaciones se realizan en hielo para mantener una temperatura estable de 4° C. Los homogenados se centrifugan (centrífuga Eppendorf 5810R, rotor de ángulo fijo F45-30-11) dos veces a 1.330 g durante 3 minutos a 4° C; los sobrenadantes obtenidos se mezclan y se centrifugan a 21.200 g (centrífuga Beckman AvantiTM 30, rotor de ángulo fijo F3602) durante 10 minutos a 4° C.

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

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

3. Métodos analíticos.

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

Todos los resultados obtenidos en este trabajo son referidos a concentración de proteínas de la muestras analizadas (tanto citosólicas como mitocondriales). Para calcular esta concentración de proteínas se utiliza el método de Bradford (Bradford, 1976) con algunas modificaciones posteriores. Se trata de un técnica colorimétrica.

Protocolo:

Para medir la concentración de proteínas de cualquier muestra, se ha adaptado el método de Bradford a un micrométodo realizado en microplacas de 96 pocillos. Para hacer la curva patrón se utiliza albúmina sérica bovina como estándar (disuelta en Tris 20 mM) a concentraciones entre 0,1-0,5 mg/ml. En primer lugar, se ponen en los pocillos 10 μ l de blanco, patrones o muestras. A continuación se añaden 200 μ l de reactivo de Bradford 1/5 (v/v) (al entrar en contacto con proteínas se reduce, virando su color del amarillento al azul intenso), se agita (agitador de placas: 1296-001 Delphia Plateshake) y se deja reposar durante 15 minutos. Finalmente, se mide la absorbancia a 595 nm en un espectofotómetro de placa (Bio-Tek Power-Wavex Microplate Scanning Spectrophotometer). Todas las determinaciones se realizan por duplicado.

3.2. Determinación de la actividad de la óxido nítrico sintasa

3.2.1 "In vivo" (citosólica y mitocondrial).

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

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

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

Protocolo:

Distinguimos entre la fracción citosólica y la fracción mitocondrial. En el primer caso, una vez obtenida la región cerebral se resuspende directamente (0,1g/ml) en un tampón compuesto por Tris-HCl 25 mM, DTT 0,5 mM, leupeptina 10 μ g/ml, pepstatina 10 μ g/ml (tomada de un disolución inicial de 1mg/ml en DMSO), aprotinina 10 μ g/ml y PMSF 1 mM (tomado de una disolución inicial 500 mM en etanol), pH 7,6 a 4° C, y se centrifuga a

1.000 g durante 5 min a 4 °C (centrífuga Beckman Avanti™ 30, rotor de ángulo fijo F3602) y se recogen alícuotas del sobrenadante que se usan inmediatamente para medir la actividad de la NOS o se congelan para la posterior determinación de la concentración de proteínas (Bradford, 1976).

En el caso de la fracción mitocondrial, las mitocondrias obtenidas se descongelan, se resuspenden (0,1g/ml) en un tampón Tris-HCl 25 mM, DTT 0,5 mM, leupeptina 10 µg/ml, pepstatina 10 µg/ml (tomada de una disolución inicial de 1mg/ml en DMSO), aprotinina 10 µg/ml y PMSF 1 mM (tomado de una disolución inicial 500 mM en etanol), pH 7,6, a 4° C y se sonicán a 3 ciclos, 20%, 10 segundos (Sonuplus HD-2070) para, de esta manera, romperlas. Parte de la muestra se congela para la posterior determinación de la concentración de proteínas (Bradford, 1976).

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

- 50 µl de un tampón compuesto por Tris-HCl 25 mM, DTT 1 mM, tetrahidrobiopterina (BH₄).
- 30 µM, FAD 10 µM, inosina 0,5 mM, BSA 0,5 mg/ml, cloruro de Ca²⁺ 0,1 mM, L-arginina.
- 10 µM y L-(3H)-arginina 40 nM, pH 7,6 (como concentraciones finales en 100 µl).
- 10 µl de EDTA 10 mM (como concentración final en 100 µl) para medir la isoforma inducible (iNOS).
- Agua, hasta completar el volumen final.

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

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

3.2.2 "In vitro" (ensayos con los compuestos sintéticos).

El protocolo se realizó de la misma manera que en la metodología explicada "in vivo" modificando la adición de la fracción mitocondrial o citosólica por iNOS o nNOS recombinantes (Alexis Biochemical®) (Bredt & Snyder, 1989) y la adición de los compuestos diluidos en etanol 10% a una concentración final de 1mM, (concentración final de etanol en el medio de reacción del 1%).

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

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

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

Las fracciones mitocondriales (previamente descongeladas), se resuspenden en 180 μ l de medio de incubación (sacarosa 250 mM, fosfato potásico 50 mM, PH 7,4) y se sonicán a 3 ciclos, 20%, 10 segundos (Sonuplus HD-2070) para obtener las partículas submitocondriales. Alícuotas de cada muestra se usan tanto para la medida de los complejos como para determinar la concentración de proteínas (Bradford, 1976).

Protocolo:

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

3.4 Determinación de la peroxidación lipídica.

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

Protocolo:

Cada fracción mitocondrial se descongela, se resuspende en 270 µl agua y se sonica a 3 ciclos, 20%, 10 segundos (Sonuplus HD-2070) para romper las membranas mitocondriales. Las alícuotas de estas muestras se guardan a -80 °C para determinar la concentración de proteínas (Bradford., 1976) o se usan para calcular la LPO. En un tubo de vidrio, se colocan 200 µl de muestra y 650 µl de un reactivo compuesto por NMFI 10.3 mM en acetonitrilo, y metanol, en relación 1:3 (v/v). Tras agitar durante 3-4 segundos, se añaden 150 µl de ácido metanosulfónico y cerramos los tubos. Inmediatamente, los introducimos en un baño y se incuban durante 40 minutos a 45° C. Transcurrida la incubación se colocan los tubos en hielo, se añade 100 µl a cada pocillo de la placa y se mide la absorbancia a 586 nm en un espectofotómetro de placa (Bio-Tek Power-Wavex Microplate Scanning Spectrophotometer).

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

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

3.5 Western Blot de complejos respiratorios

Las mitocondrias aisladas de la SN y ST se resuspendieron en 0.5 mM PMSF, 50 mM Tris/HCl (pH 7.6), 2 mM DTT, and 2.5% Glycerol. Se utilizaron 20 µg por cada muestra y se realizó la electroforesis en gel SDS–12% PAGE, y transferida a una membrana PVDF Immun-Blot™ (Biorad), se incubó siguiendo el protocolo y cocktail de anticuerpos suministrados en el *Kit Rodent Total OXPHOS Complexes Detection Kit* (MitoSciences, Eugene, OR, USA). Las interacciones protein-anticuerpo fueron detectadas con el anticuerpo secundario *peroxidase-conjugated mouse anti-mouse IgG* antibody (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), utilizando el

kit de detección de quimioluminiscencia SuperSignal® (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). La cuantificación de las proteínas se llevó a cabo mediante el software NIH ImageJ 1.37V.

3.6 RT-PCR de DNA mitochondrial y nuclear

En primer lugar se estrajo el DNA de las muestras de ST y SN. Para ello se incubaron con Proteinasa-K hasta la completa digestión del tejido y después se trató con RNAsa y una mezcla fenol-cloroformo-alcoholisoamílico (25/24/1). La fracción acuosa resultante se recogió en un eppendorf aparte y se trató con alcohol isoamílico haciéndose visibles el obillo de hebras del DNA que fue cuidadosamente lavado con etanol 70% y resuspendido finalmente en agua libre de RNAsas y DNAsas hasta una concentración cercana a los 500 ng/ μ L (Spinazzola *et al.*, 2006). La RT-PCR se llevó a cabo en placas de 96 pocillos con Taqman® Master MIX (Universal PCR Master Mix, MMX), la sonda y primers para mtDNA (Probe CO1-MGB-FAM, primer forward y primer reverse) y la sonda y primers para el nDNA (Mouse GADP VIC-MGB) de Applied Biosystem®. Se trata de una PCR a tiempo real (Stratagene Mx3005P) con ordenador y software de análisis (MxPro).

4. Análisis estadístico.

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

Resultados

1. RESULTADOS 'IN VITRO'.

En primer lugar, para el desarrollo de este estudio se ha llevado a cabo una clasificación de todos los compuestos analizados según el porcentaje de inhibición de cada fármaco sobre la actividad nNOS e iNOS y además su grado de selectividad frente a dichas isoformas 'in vitro'.

Posteriormente, se han seleccionado los compuestos con mayor capacidad de inhibición y con mayor selectividad respecto a las diferentes isoformas constitutiva e inducible, para su posterior evaluación 'in vivo'.

1.1 SERIE DE INDAZOLES:

Se evaluó la inhibición de la actividad NOS, tanto neuronal como inducible, de la siguiente serie de compuestos indazol, mostrando una mayor capacidad inhibitoria para la iNOS en la mayoría de los derivados.

A continuación, en la tabla 2 se representa la estructura química y los pesos moleculares de estos compuestos, así como los porcentajes residuales sobre la actividad iNOS y nNOS recombinantes.

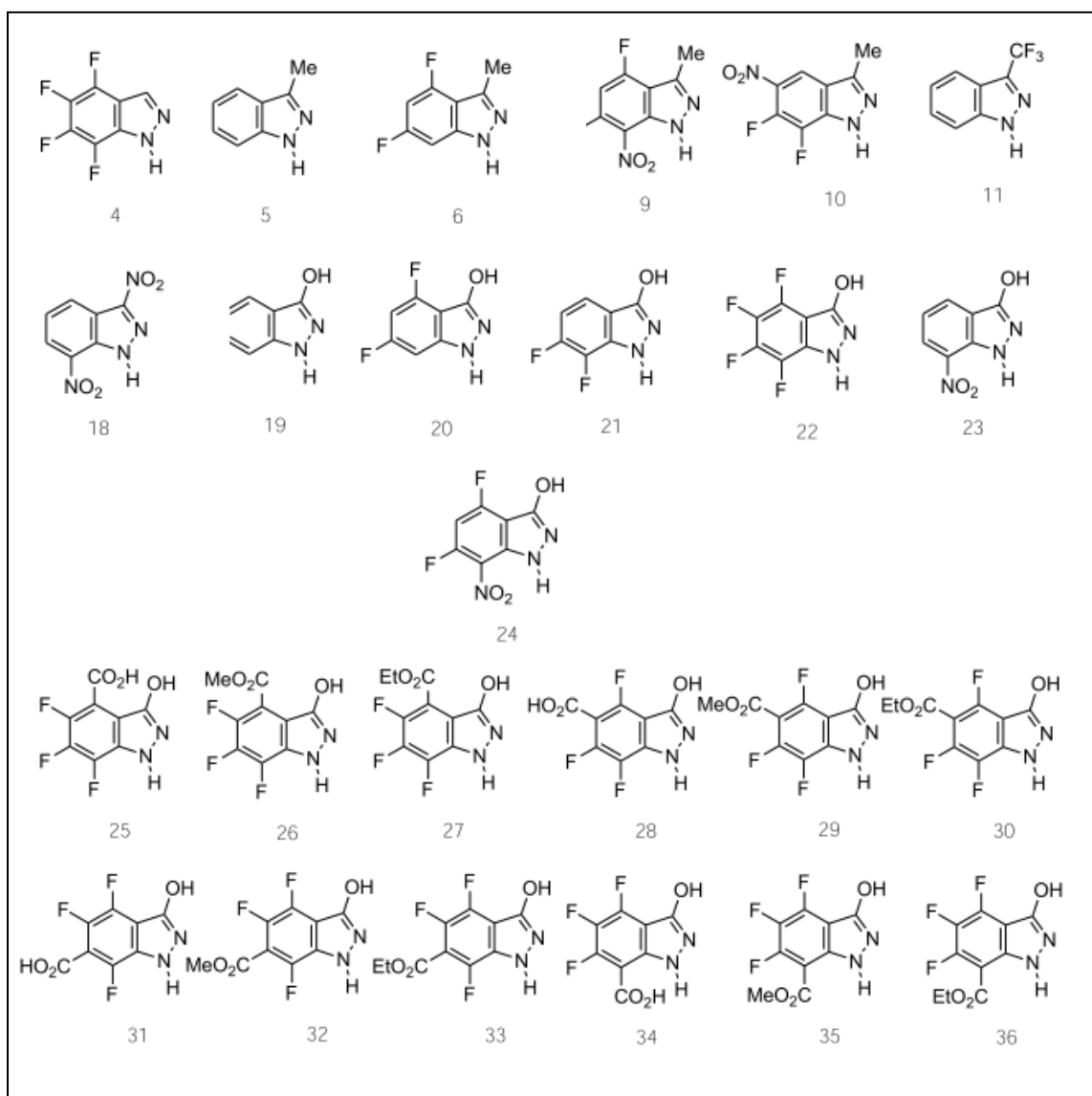


Tabla 2. Porcentajes de actividad residual iNOS y nNOS de los compuestos indazol.

Compuesto	pm	% Actividad residual	
		iNOS	nNOS
4	190.10	1.32 ± 0.12	56.68 ± 0.32
5	132.16	22.59 ± 0.23	66.3 ± 1.23
6	168.14	25.73 ± 0.56	47.93 ± 2.2
7	168.14	30.78 ± 0.6	41.6 ± 2.12
9	213.14	8.01 ± 0.89	9.98 ± 2.68
10	213.14	4.44 ± 1.09	14.59 ± 1.38
11	186.13	19.93 ± 1.22	30.1 ± 2.84
18	208.00	10.66 ± 1.43	97.88 ± 3.22
19	134.00	44.89 ± 1.41	68.57 ± 2.75
20	170.12	51.93 ± 1.43	88.9 ± 3.29
21	170.12	10.87 ± 0.93	42.92 ± 3.65
23	179.13	91.77 ± 1.42	81.07 ± 2.47
24	215.11	8.97 ± 1.64	85.07 ± 3.29
25	232.12	37.41 ± 1.89	98.23 ± 3.32
26	246.14	77.42 ± 1.63	93.66 ± 4.2
27	260.17	61.27 ± 2.04	98.79 ± 3.29
28	232.12	83.69 ± 1.93	87.91 ± 3.2
29	246.14	51.08 ± 2.12	86.73 ± 2.97
30	260.17	48.23 ± 1.23	97.46 ± 3.2
31	232.12	58 ± 2.00	94.55 ± 2.34
32	246.14	53.85 ± 2.93	80.35 ± 2.4
33	260.17	46.46 ± 2.49	89.79 ± 1.2
34	232.12	59.28 ± 2.92	88.91 ± 1.92
35	246.14	50.44 ± 3.21	94.91 ± 1.33
36	260.17	56.34 ± 3.76	94.44 ± 1.04

Las figuras 11 A y 11 B muestran los cambios ordenados por grado de inhibición de la actividad iNOS y nNOS respectivamente en presencia de los compuestos evaluados. La mayoría de los compuestos presentan un mayor grado de inhibición de la actividad inducible de la NOS con respecto a la nNOS. En cuanto a los inhibidores más eficientes de la iNOS, por un lado, podemos destacar los compuestos 4,10, 9, 24, 18 y 21 con una inhibición que supera el 80%; y por otro lado los compuestos 11, 5, 6, 7 y 25 con una inhibición por encima del 60% de la actividad iNOS.

Con respecto a la acción inhibitoria de estos derivados sobre la nNOS cabe destacar el efecto de los compuestos 9, 10,11.

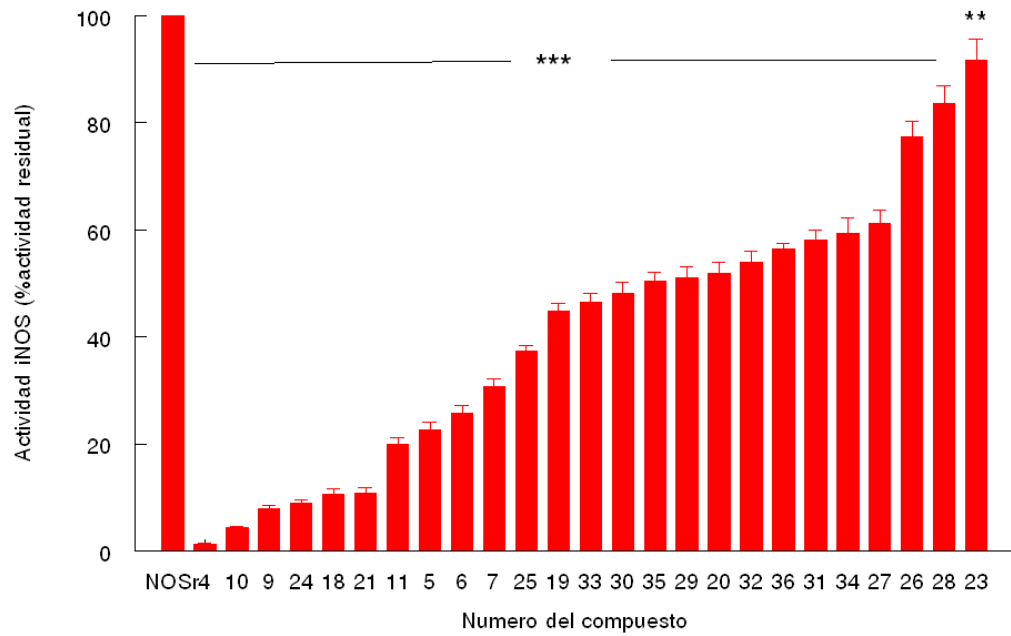


Figura 11 A. Efectos de los derivados indazol en la actividad iNOS. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ vs NOSr.

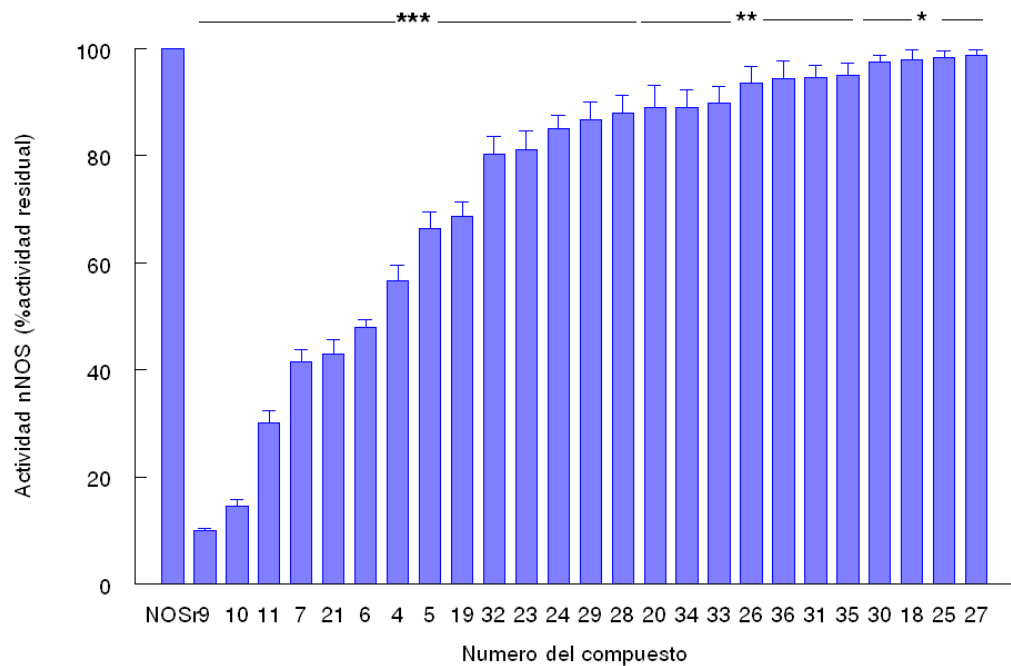


Figura 11 B. Efectos de los derivados indazol en la actividad nNOS. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ vs NOSr.

Estos resultados han sido objeto de la siguiente publicación:

Indazoles as inhibitors of inducible nitric oxide synthase (iNOS): potency and selectivity versus neuronal nNOS. R. M. Claramunt, C. López, A. López, C. Pérez-Medina, M. Pérez-Torralba, I. Alkorta, J. Elguero, G. Escames, and D. Acuña-Castroviejo. EJMC , 2010.

Trabajo1

European Journal of Medicinal Chemistry

Synthesis and biological evaluation of indazole derivatives

Rosa M. Claramunt ^{a,*}, Concepción López ^a, Ana López ^{c,d}, Carlos Pérez-Medina ^a, Marta Pérez-Torralba ^a, Ibon Alkorta ^b, José Elguero ^b, Germaine Escames ^{c,d}, Darío Acuña-Castroviejo ^{c,d,*}

^a *Departamento de Química Orgánica y Bio-Orgánica, Facultad de Ciencias, UNED, Senda del Rey 9, E-28040 Madrid, Spain*

^b *Instituto de Química Médica, CSIC, Centro de Química Orgánica Manuel Lora-Tamayo, Juan de la Cierva 3, E-28006 Madrid, Spain*

^c *Centro de Investigación Biomédica, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Universidad de Granada, Avenida del Conocimiento s/n, E-18100 Armilla, Granada, Spain*

^d *Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Avenida de Madrid 11, 18012 Granada, Spain*

ABSTRACT

The inhibition of neuronal and inducible nitric oxide synthases (nNOS and iNOS) by a series of 36 indazoles has been evaluated, showing that most of the assayed derivatives are better iNOS than nNOS inhibitors. A parabolic model relating the iNOS inhibition percentage with the difference, E_{rel} , between stacking and apical interaction energies of indazoles with the active site of the NOS enzyme has been established.

Keywords: indazoles, iNOS, nNOS, modeling

1. Introduction

A family of enzymes known as nitric oxide synthases (NOS) catalyzes the oxidation of L-arginine to L-citrulline and nitric oxide (NO), a molecule that plays an important role in the regulation of blood pressure, neurotransmission, and the immune response. Three isoforms of nitric oxide synthase have been identified in different tissues. Neuronal (nNOS) and endothelial (eNOS) nitric oxide synthases are expressed constitutively and are calcium/calmodulin dependent; inducible nitric oxide synthase (iNOS) is expressed in response to inflammatory or immunologic stimuli and its activity is independent of calmodulin. All NOS isoforms are protoporphyrin IX heme enzymes and require NADPH, FAD, FMN and tetrahydrobiopterin (H₄B) as cofactors [1-4].

We present here the results of our investigation on the selectivity of inducible iNOS compared to constitutive nNOS of a series of indazoles depicted in Figure 1, in a similar approach to that of the Pharmacia & Upjohn group ~~did~~ with U-19451A [5] where they explored the iNOS/nNOS selectivity. Save the first three 7-nitro derivatives, **1-3**, 3-methylindazole (**5**), the three 3-bromo-7-nitro derivatives, **15-17**, 3,7-dinitroindazole (**18**), 3-hydroxyindazole (**19**) and 3-hydroxy-7-nitroindazole (**23**), the remaining 26 indazoles contain fluorine substituents. To date, only our group has explored the inhibitory activity of fluoroindazoles against iNOS.

<Around here Figure 1>

This is our third paper on the inhibitory properties of indazoles against NOS. In the first one [6], we reported the percentage of nNOS and iNOS inhibition of eleven indazoles at 1mM concentration: **1, 2, 3, 8, 12, 13, 14, 15, 16, 17** and **22**, whose values will be used in this paper. In the second one we proposed a theoretical model based on the stacking of indazoles above the heme [7].

2. Results and discussion

2.1. In vitro NOS inhibition

The 36 indazoles studied in this article have been tested for their inhibitory properties employing the method reported by Bredt *et al.* for the determination of the NOS activity (section 4.2). The final concentration of indazole was 1 mM and the results of these experiments are gathered in Table 1, along with the data regarding three indazoles **37-39** taken from the literature (Figure 2). 25 of these indazoles are studied for the first time; each value reported in Table 1 is the average of three measurements.

<Around here Table 1 and Figure 2>

Some values of iNOS and nNOS percentages of inhibition (marked ~) for compounds **37**, **38** and **39** have been estimated. Bland-Ward and Moore described that the iNOS inhibitory properties of indazole itself (**37**) should be weak [8], and consequently we have used a 45% value. The IC₅₀ mM values of 7-methoxyindazole (**38**) were established by Boucher *et al.*: nNOS = 1.5 and iNOS = 5.5 [11], and since the percentage of inhibition against nNOS was known (80.0), [9] we have estimated the effect on iNOS to be similar but slightly lower, 70 %. Vichard *et al.* [12] have reported the IC₅₀ mM values for 7-cyanoindazole (**39**): nNOS = 25 and iNOS = 110 (these much larger values determined by a different technique should not be compared with those of other authors) and also for 7-nitroindazole (**1**), nNOS = 25 and iNOS = 50. Therefore, we have used the same value for nNOS (88 %, as for **1**) and reduced the value for iNOS to 80 %.

A perusal of Table 1 shows that the most potent iNOS inhibitors are, in decreasing order, **4** (98.7) > **15** (97.0) > **10** (95.6) > **9** (92.0) > **24** (91.0) > **18** (89.3) > **21** (89.1) > **1**

(84.0) > **8** (83.0) (Figure 3). Meanwhile the nNOS inhibitory potency decreases as follows: **15** (95.0) > **9** (90.0) > **1** (88.0) > **10** (85.4) (Figure 4).

<Around here Figure 3 and Figure 4>

Regarding selectivity we can say that, though most of them only very slightly, the majority of the assayed indazoles are better iNOS than nNOS inhibitors. At a concentration of 1 mM, compounds **18** (40-fold selective), **14** (10-fold), **24** (6-fold) and **4** (2-fold) show good promise as possible iNOS selective inhibitors. At the same concentration, the other potent iNOS inhibitors (compounds **1**, **9** and **15**) also show high potency *versus* nNOS and thus poor selectivity between the isoforms. However, these compounds deserve to be studied more in depth before ruling out selectivity.

All indazoles bearing a carboxylic or an ester substituent, **25-36**, proved to be moderate iNOS inhibitors and very weak nNOS ones, being 3-hydroxy-5,6,7-trifluoroindazole-4-carboxylic acid (**25**) (iNOS = 62.6%, nNOS = 1.8% - 35-fold selective) the most promising candidate. A Free-Wilson analysis using presence-absence matrices [13,14] of these 12 indazoles affords the values gathered in Table 2.

<Around here Table 2>

Coefficients in Table 2 indicate small sensitivity to the nature of R (H, CH₃, C₂H₅) and the position (4, 5, 6, 7) of the substituent, but are always larger for iNOS than for nNOS.

If one wants to exclude nitroaromatic compounds to avoid toxicity problems [15-17], then the most interesting indazole is **4** distantly followed by **21** and **8**. In fact 7-cyanoindazole (**39**) and its 3-bromo derivative were prepared [12] to by-pass the aforementioned problems shown by the nitroindazoles **1** and **15**.

2.2. Chemistry

We have already reported the preparation and physicochemical properties of the 36 assayed compounds save those of **4**, **18**, **20**, **21** and **24**. 7-Nitroindazole (**1**) is commercially available and was used without further purification. Compounds **5**, **8**, **11** and **12** can be found in reference 18 whereas indazoles **2**, **3**, **13**, **14**, **16**, **17** and **22** in reference 6. Difluoro-3-methylindazoles **6**, **7**, **9** and **10** are reported in reference 19 and 3-hydroxyindazole (**19**) and 3-hydroxy-7-nitroindazole (**23**) in reference 20. Finally, trifluoro-3-hydroxy-indazolecarboxylic acids and esters, **25-36**, are described in reference 21.

In order to prioritize comparability over correct nomenclature, we have named all of the compounds as substituted indazoles even in the case of the 3-hydroxy groups that in accordance with IUPAC rules are indazol-3-ols. Also, for the sake of clarity we avoided the use of the prefix *1H* for unsubstituted indazoles in the text. See Table 1 for the full name of all derivatives.

4,5,6,7-Tetrafluoroindazole (**4**) was prepared, not without difficulty, according to Scheme 1.

<Around here Scheme 1>

When pentafluorobenzaldehyde (**40**) reacted with hydrazine in the standard conditions to prepare indazoles, only azine **42** was isolated [22]. To obtain hydrazone **41** the reaction was carried out in ethanol/water at low temperature and high-dilution. When **41** was heated in toluene or *N,N*-dimethylformamide the only product isolated was **42**. These failed attempts are in agreement with the results reported by Lukin *et al* [23] about the difficulty to cyclize hydrazones derived from benzaldehydes when compared to those derived from acetophenones, which could be due to an unfavorable conformation of the former [24].

However, according to Lukin, the formation of indazoles from hydrazones occurs through a hydrazine-hydrazone intermediate like **43** (in the original article without fluorine substituents) that cyclizes into 3-hydrazineindazoline **44** to afford, after elimination of a

molecule of hydrazine, the desired indazole **4**. Therefore, we carried out the reaction of **40** with an excess of hydrazine (1:5) and, although we obtained the desired product **4** in 13% yield, we also isolated a large amount of the isomeric hydrazine-hydrazone **45**.

3,7-Dinitroindazole (**18**) has been described in the literature by two different groups both using the same synthetic approach (Scheme 2) involving the nitration of 7-nitroindazole (**1**) to afford 2,7-dinitroindazole (**46**) that on heating in anisole [25] or amyl alcohol [26] solution was converted into **18**. We have followed the method described in reference 25, with similar results to those reported.

<Around here Scheme 2>

3-Hydroxy-4,6-difluoroindazole (**20**) and 3-hydroxy-6,7-difluoroindazole (**21**) were prepared in a similar way to other 3-hydroxyindazoles described in a previous paper [21] (Scheme 3). Secondary products resulting from the nucleophilic replacement of the fluorine atoms in *para*-position to the ester group were also detected.

<Around here Scheme 3>

Indazoles **20** and **21** have CAS Registry numbers (887567-77-3 and 1000343-93-0, respectively) but only the first one appears to have been described in a patent [27]. Finally, nitration of compound **20** affords 3-hydroxy-4,6-difluoro-7-nitroindazole (**24**) in good yield (Scheme 3).

2.3. Modeling studies

In our previous work we advocated the use of the difference E_{rel} of stacking and apical interaction energies between indazoles and porphyrines to estimate the inhibitory potency of these compounds [7]. The model (Figure 5) was based on crystallographic studies [28-30], replacing the Fe by Zn for computational ease. The NOS inhibitory activity (in percentage) was related, in an exponential relationship, with the difference, E_{rel} , between

the stacking and the apical (lone-pair) interaction energies as follows: % inhibition = $104.0 - 2.21 \times e^{(E_{rel}/8.54)}$. A similar result was obtained using stacking energies instead of E_{rel} . Compound **14**, C₁₃H₉N₂, due to its excessive size was excluded from the calculations.

<Around here Figure 5>

As shown in Figure 5, the interaction of indazoles with the active site of the NOS enzyme involves not only stacking but hydrogen bonding (HB) of the N–H(indazole)···O=C and N–H···N(indazole) types. Then, we explored a model including N–H HB acidity and N: HB basicity using the thermodynamic acidity (ΔH) and basicity (PA or proton affinity), since it is known that they are proportional for structurally related compounds [7,31,32]. Table 3 contains all the information we have gathered on this problem, including data for different heterocycles (pyridine, imidazole and pyrazole) of known experimental basicity (PA) and acidity (ΔH).

<Around here Table 3>

In order to check the validity of the calculated values before using them for modelization purposes, we have carried out two comparative analyses making use of the values we found in the NIST database [33]: pyridine basicity 930, imidazole basicity 942.8 and acidity 1466, pyrazole basicity 894.1 and acidity 1480, indazole basicity 900.8 and acidity 1457 kJ mol⁻¹. Using these values, the following trendlines can be calculated:

$$\begin{aligned} \text{PA} &= (75 \pm 38) + (0.92 \pm 0.04) \text{ basicity,} \\ n &= 4, R^2 = 0.996 \text{ (differences } \pm 2.7 \text{ kJ mol}^{-1}\text{)} \end{aligned} \quad \text{Eq. 1}$$

$$\begin{aligned} \Delta H &= (506 \pm 81) + (0.64 \pm 0.05) \text{ acidity,} \\ n &= 3, R^2 = 0.993 \text{ (differences } -26 \text{ kJ mol}^{-1}\text{)} \end{aligned} \quad \text{Eq. 2}$$

Although the experimental gas-phase acidities are systematically underestimated by the calculations, they are proportional (Eq. 2) and therefore can be used in the models of activity.

In a previous report, we related iNOS activity with the E_{rel} for a total of eleven indazoles, suggesting the existence of an asymptotic model [6]. Now, with a larger number of compounds available, we consider that a parabolic model is a better fit than the former. Parabolic relationships (corresponding to polynomial models of order 2) were introduced by Hansch and soon became classical in medicinal chemistry [14,34,35].

Figure 6 represents the variation of iNOS inhibition percentage with E_{rel} after excluding compounds **12** (3-trifluoromethyl-4,5,6,7-tetrafluoroindazole) and **21** (3-hydroxy-6,7-difluoroindazole). The trendline corresponds to: iNOS % inhibition = $(95 \pm 3) - (0.24 \pm 0.12) E_{rel} - (0.036 \pm 0.005) E_{rel}^2$, $n = 13$, $R^2 = 0.81$, Eq. 3. The curve reaches its maximum (100%) for values of E_{rel} close to 0 (no experimental data correspond to it).

<Around here Figure 6>

The only other property that appears to have an effect on some inhibition data is the thermodynamic basicity, PA. The acidity does not appear to have an influence of the inhibitory properties. Equations 4, 5 and 6 can be calculated from the data reported in tables 1 and 3, and although only the first one is significant, the other two suggest a necessary criterion for selectivity iNOS vs. nNOS: the indazole must have low basicity.

$$\% \text{ iNOS} = (189 \pm 67) - (0.22 \pm 0.11) E_{rel} - (0.30 \pm 0.07) (E_{rel}^2)/10 - (0.11 \pm 0.08) \text{ PA}$$

$$n = 13, R^2 = 0.85 \quad \text{Eq. 4}$$

$$\% \text{ nNOS} = - (325 \pm 284) - (0.62 \pm 0.26) (E_{rel}^2)/10 + (0.50 \pm 0.32) \text{ PA}$$

$$n = 13, R^2 = 0.35 \quad \text{Eq. 5}$$

Selectivity ($\Delta = \% \text{ iNOS} - \% \text{ nNOS}$) = $(365 \pm 205) - (0.72 \pm 0.42) E_{\text{rel}} - (0.55 \pm 0.28) \text{ PA}$

$n = 13, R^2 = 0.48$ Eq. 6

3. Conclusions

For the first time the inhibitory properties of fluorinated indazoles against iNOS have been evaluated. From a library of 34 indazole derivatives we have identified a very potent iNOS inhibitor, 4,5,6,7-tetrafluoroindazole (**4**), a non-nitro derivative that constitutes a promising candidate for future developments.

We advocate the use of computational modeling of the interaction between a large series of indazole candidates with Zn-porphyrins and proceed to synthesize and test only those that the model predicts to be active and selective. Even though these predictions are not entirely precise they suffice to know where to address the research.

4. Experimental

4.1. Assay of iNOS/nNOS activities

L-Arginine, L-citruline, *N*-(2-hydroxymethyl)piperazine-*N'*-(2-ethanesulfonic acid) (HEPES), DL-dithiothreitol (DTT), leupeptin, aprotinin, pepstatin, phenylmethylsulfonyl-fluoride (PMSF), hypoxantine-9- β -D-ribofuranosid (inosine), ethylene glycol-bis-(2-aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (EGTA), bovine serum albumin (BSA), Dowex-50 W (50 x 8-200), FAD, NADPH and 5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterin dihydrochloride (H_4 -biopterin) were obtained from Sigma-Aldrich Química (Spain). L-[^3H]-arginine (58 Ci/mmol) was obtained from Amersham (Amersham Biosciences, Spain). Tris(hydroxymethyl)-aminometane (Tris-HCl) and calcium chloride were obtained from Merck (Spain).

For iNOS activity determination, male Wistar rats (3-months old, 220-250 g) were bred and kept in the University animal facility on a 12 h light/12 h dark cycle at 22 ± 2 °C, on regular chow and tap water until the day of the experiment. All experiments were performed according to the Spanish Government Guide and the European Community Guide for animal care. The experimental paradigm was published elsewhere [36]. Briefly, three days before the experiment the jugular vein was cannulated under i.p. equithesin anesthesia (1 mL/kg) for LPS administration. Rats were i.v. injected with 10 mg/kg b.w. LPS (*E. coli* 0127:B8, Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) dissolved in 0.3 mL of saline. Six hours after LPS injection, animals were killed by decapitation. Lungs were quickly collected, washed, and frozen to -80 °C in liquid nitrogen. Pieces of lungs were homogenized (0.1 g/mL) in ice-cold buffer (25 mM Tris, 0.5 mM DTT, 10 µg/mL pepstatin, 10 µg/mL leupeptin, 10 µg/mL aprotinin, 1 mM PMSF, pH 7.6) at 0-4 °C [37]. The crude homogenate was centrifuged at 2,500 g at 4 °C for 5 min, and aliquots of the supernatant were either stored at -80 °C for total protein determination [38] or used immediately for NOS activity measurement.

For nNOS activity determination, untreated male Wistar rats (200–250 g) were killed by cervical dislocation and striata were quickly collected and immediately used to measure nNOS activity. Upon removal, tissues were cooled in an ice-cold buffer (25 mM Tris, 0.5 mM DTT, 10 µg/mL leupeptin, 10 µg/mL pepstatin, 10 µg/mL aprotinin, 1 mM PMSF, pH 7.6). Two striata were placed in 1.25 mL of the same buffer and sonicated (10 s x 6). The crude homogenates were centrifuged 5 min at 1,000 g, and an aliquot of the supernatant was frozen at -80 °C for total protein determination [38].

NOS activity was measured by the method of Bredt *et al.* [39], monitoring the conversion of L-³H-arginine to L-³H-citrulline. Enzyme activity was referred as pmol L-³H-citrulline/min/mg prot. The final incubation volume was 100 µL and consisted of 10 µL sample added to prewarmed (37 °C) buffer to give a final concentration of 25 mM Tris, 1

mM DTT, 30 μ M H₄-biopterin, 10 μ M FAD, 0.5 mM inosine, 0.5 mg/mL BSA, 0.1 mM CaCl₂, 10 μ M L-arginine and 40 nM L-³H-arginine, pH 7.6. The reaction was started by the addition of 10 μ L NADPH (0.75 mM final concentration) and continued for 30 min at 37 °C. Control incubations were performed in absence of NADPH. The activity of iNOS was measured in the presence or absence of 10 mM EDTA. EDTA removes calcium from the medium preventing the activation of nNOS; thus, in the presence of EDTA only iNOS activity is detected. The reaction was stopped adding 400 μ L of cold 0.1 M HEPES containing 10 mM EGTA, 175 mM L-³H-citrulline, pH 5.5. The mixture was decanted onto a 2 mL column packed with Dowex-50W ion exchanger resin (Na⁺ form) and eluted with 1.2 mL of water. L-³H-citrulline was quantified by liquid scintillation counting in a Beckman LS-6000 system (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). The retention of L-³H-arginine in this process was greater than 98%.

A total of 25 compounds were assayed for nNOS/iNOS activities: 4,5,6,7-tetrafluoro-1*H*-indazole (**4**); 3-methyl-1*H*-indazole (**5**); 3-methyl-4,6-difluoro-1*H*-indazole (**6**); 3-methyl-6,7-difluoro-1*H*-indazole (**7**); 3-methyl-4,6-difluoro-7-nitro-1*H*-indazole (**9**); 3-methyl-6,7-difluoro-5-nitro-1*H*-indazole (**10**); 3-trifluoromethyl-1*H*-indazole (**11**); 3,7-dinitro-1*H*-indazole (**18**); 3-hydroxy-1*H*-indazole (**19**); 3-hydroxy-4,6-difluoro-1*H*-indazole (**20**); 3-hydroxy-6,7-difluoro-1*H*-indazole (**21**); 3-hydroxy-7-nitro-1*H*-indazole (**23**); 3-hydroxy-4,6-difluoro-7-nitro-1*H*-indazole (**24**); 3-hydroxy-5,6,7-trifluoro-1*H*-indazole-4-carboxylic acid (**25**); 3-hydroxy-5,6,7-trifluoro-1*H*-indazole-4-carboxylic acid methyl ester (**26**); 3-hydroxy-5,6,7-trifluoro-1*H*-indazole-4-carboxylic acid ethyl ester (**27**); 3-hydroxy-4,6,7-trifluoro-1*H*-indazole-5-carboxylic acid (**28**); 3-hydroxy-4,6,7-trifluoro-1*H*-indazole-5-carboxylic acid methyl ester (**29**); 3-hydroxy-4,6,7-trifluoro-1*H*-indazole-5-carboxylic acid ethyl ester (**30**); 3-hydroxy-4,5,7-trifluoro-1*H*-indazole-6-carboxylic acid (**31**); 3-hydroxy-4,5,7-trifluoro-1*H*-indazole-6-carboxylic acid methyl ester (**32**); 3-hydroxy-4,5,7-trifluoro-1*H*-indazole-6-carboxylic acid ethyl ester (**33**); 3-hydroxy-4,5,6-trifluoro-1*H*-indazole-7-carboxylic acid

(**34**); 3-hydroxy-4,5,6-trifluoro-1*H*-indazole-7-carboxylic acid methyl ester (**35**); 3-hydroxy-4,5,6-trifluoro-1*H*-indazole-7-carboxylic acid ethyl ester (**36**). Except when indicated, the concentration of these compounds used in the NOS assays was 1 mM.

4.2. Chemistry

Melting points for compounds **4**, **20**, **21** and **24** were determined by DSC on a Seiko DSC 220C connected to a Model SSC5200H Disk Station while for compounds **18**, **41**, **42** and **45** a ThermoGalen hot stage microscope was used. Thermograms (sample size 0.003–0.0010 g) were recorded at a scanning rate of 2.0-5.0 °C min⁻¹. Thin-layer chromatography (TLC) was performed with Merck silica gel (60 F₂₅₄). Compounds were detected with a 254-nm UV lamp. Silica gel (60-320 mesh) was employed for routine column chromatography separations with the indicated eluent. Elemental analyses for carbon, hydrogen, and nitrogen were carried out on a Perkin–Elmer 240 analyzer. Exact Mass was determined on a Q-TOF LC/MS 6520 (Agilent Technologies) equipment using ESI+.

Solution spectra were recorded, at 300 K save specified, on a Bruker DRX 400 (9.4 Tesla, 400.13 MHz for ¹H, 376.50 for ¹⁹F, 100.62 MHz for ¹³C and 40.56 MHz for ¹⁵N) spectrometer with a 5-mm inverse detection H–X probe equipped with a z-gradient coil for ¹H, ¹³C and ¹⁵N. For ¹⁹F NMR experiments, a 5-mm inverse detection QNP probe equipped with a z-gradient coil was used. Chemical shifts (δ in ppm) are given from internal solvents, CDCl₃ (7.26), DMSO-d₆ (2.49), THF-d₈ (3.58) and CD₃CN (1.93) for ¹H and CDCl₃ (77.0), DMSO-d₆ (39.5), THF-d₈ (67.4) and CD₃CN (1.4 and 118.7) for ¹³C. And external references, CFCl₃ (0.00) for ¹⁹F and CH₃NO₂ (0.00) for ¹⁵N NMR were used. 2D (¹H–¹H) gs-COSY and inverse proton detected heteronuclear shift correlation spectra, (¹H–¹³C) gs-HMQC, (¹H–¹³C) gs-HMBC, (¹H–¹⁵N) gs-HMQC, and (¹H–¹⁵N) gs-HMBC, were

acquired and processed using standard Bruker NMR software and in non-phase-sensitive mode [40]. Gradient selection was achieved through a 5% sine truncated shaped pulse gradient of 1 ms. Variable temperature experiments were recorded on the same spectrometer. A Bruker BVT3000 temperature unit was used to control the temperature of the cooling gas stream and an exchanger to achieve low temperatures.

4,5,6,7-Tetrafluoro-1*H*-indazole (**4**)

In a three-neck round-bottom flask equipped with a reflux condenser, 98% hydrazine monohydrate (0.70 g, 14 mmol) was dissolved in THF (200 mL). The flask was placed in a bath of ice/water and 2,3,4,5,6-pentafluorobenzaldehyde (**40**) (0.55 g, 2.8 mmol) dissolved in THF (150 mL) was added dropwise. The mixture was then stirred at 70 °C for 48 hours. The solution was decanted and solvent removed under reduced pressure to obtain a yellowish solid which was suspended in hexane. The solid was filtered, washed with chloroform and discarded (0.29 g). In the mother liquor the product together with 2,3,5,6-tetrafluoro-4-(hydrazonomethyl)phenylhydrazine (**45**) was present. The separation of these two components was carried out by column chromatography on silica gel with hexane/diethyl ether 20:1 to afford **4** (70 mg, 13%) as a white solid. Mp 191.5 °C (DSC). Anal. Calcd for C₇H₂F₄N₂: C, 44.23; H, 1.06; N, 14.74. Found: C, 44.34; H, 1.17; N, 14.62. ¹H NMR (CDCl₃) δ 10.79 (br s, 1H, NH), 8.24 (d, ⁵J_{F7} = 3.1, 1H, H3); ¹⁹F NMR (CDCl₃) δ -145.5 (dd, ³J_{F5} = 18.9, ⁵J_{F7} = 18.9, F4), -165.5 (ddd, ³J_{F4} = 18.9, ³J_{F6} = 18.9, ⁴J_{F7} = 2.2, F5), -156.9 (dd, ³J_{F5} = 18.9, ³J_{F7} = 18.9, F6), -159.0 (dd, ³J_{F6} = 18.9, ⁵J_{F4} = 18.9, F7); ¹³C NMR (THF-d₈) δ 132.2 (d, ¹J = 194.9, C3), 111.4 (dd, ²J = 20.8, ³J = 3.2, C3a), 139.6 (dddd, ¹J = 250.1, ²J = 11.4, ³J = ⁴J = 3.8, C4), 135.8 (ddd, ¹J = 242.7, ²J = ²J = 15.5, C5), 139.8 (dddd, ¹J = 247.6, ²J = ²J = 15.1, ³J = 2.5, C6), 132.7 (ddd, ¹J = 250.9, ²J = 14.7, ³J = 4.1, C7), 126.3 (ddd, ²J = 15.4, ³J = 6.6, ³J = 3.5, C7a); ¹⁵N NMR (THF-d₈, T = 207 K) δ -201.1 (N1), -58.6 (N2).

2,3,5,6-Tetrafluoro-4-(hydrazonomethyl)phenyl)hydrazine (**45**) was obtained as a yellow solid. Mp > 300 °C. Exact mass (ESI+) calc for C₇H₆F₄N₄ 222.0529, found 222.0527. ¹H NMR (DMSO-d₆) δ 7.62 (s, 1H, -CH=N-), 7.11 (s, 2H, H₂N-NH-C1), 6.94 (s, 1H, -NH-), 4.46 (br s, 2H, =N-NH₂); ¹⁹F NMR (DMSO-d₆) δ -147.9 (m, F3 and F5), -159.3 (m, F2 and F6); ¹³C NMR (DMSO-d₆) δ 143.9 (ddd, ¹J = 246.6, ²J = 12.7, ³J = 3.4, C3 and C5), 136.8 (ddd, ¹J = 239.2, ²J = 15.3, ³J = 3.8, C2 and C6), 129.8 (dd, ²J = ²J = 10.0, C1), 126.1 (-CH=), 103.5 (dd, ²J = ²J = 13.2, C4).

Reaction of 2,3,4,5,6-pentafluorobenzaldehyde (**40**) with hydrazine monohydrate in toluene leads to 2-bis(perfluorobenzylidene)hydrazine (**42**), obtained after purification by column chromatography on silicagel with hexane/ethyl acetate 40:1 and crystallization in chloroform as yellow needles (62%). Mp 124-130 °C (lit. [22] 131 °C). ¹H NMR (CDCl₃) δ 8.76 (s, 1H, -CH=N-); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 108.9 (m, C1), 137.9 (dm, C3 and C5), 142.9 (dm, C2 and C6), 146.0 (dm, C4), 152.3 (d, -CH=N-); ¹⁹F NMR (CDCl₃) δ -161.5 (m, F3, F3', F5 and F5'), -148.9 (m, F4 and F4'), -139.0 (m, F2, F2', F6 and F6'). If the reaction of 2,3,4,5,6-pentafluorobenzaldehyde (**40**) was carried out with hydrazine monohydrate in ethanol/water at low temperature and high-dilution, perfluorobenzylidenehydrazine (**41**) was obtained as a white solid (89%). Mp 68-9 °C (lit. [22] 68 °C). ¹H NMR (CDCl₃) δ 6.00 (s, 2H, NH₂), 7.70 (s, 1H, -CH=N-); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 110.4 (m, C1), 128.7 (d, -CH=N-), 137.8 (dm, C3 and C5), 140.5 (dm, C2 and C6), 144.5 (dm, C4); ¹⁹F NMR (CDCl₃) δ -163.2 (m, F3 and F5), -155.7 (m, 1F, F4), -144.2 (m, F2 and F6).

3,7-Dinitro-1H-indazole (**18**)

This compound was prepared according to reference 25 and obtained as a yellow solid. Mp 220-222 °C (Lit. [25] 220 °C). ¹H NMR (CD₃CN) δ 12.83 (br s, 1H, NH), 7.65 (t, 1H, ³J = 8.0, H5), 8.48 (d, 1H, ³J = 7.9, H6), 8.62 (d, 1H, ³J = 8.1, H4); ¹³C NMR (CD₃CN) δ 151.5 (m, C3), 120.2 (d, ²J = 9.5, C3a), 130.3 (dd, ¹J = 171.7, ³J = 8.6, C4), 126.4 (d, ¹J = 168.7, C5), 126.8 (ddd, ¹J = 168.5, ²J = 2.3, ³J = 8.6, C6), 134.9 (m, C7), 135.4 (dd, ³J =

$^3J = 6.7$, C7a); ^{15}N NMR (CD_3CN) δ -14.2 (NO_2), the other nitrogen atoms were not detected.

General Procedure for Esterifications

A solution of 2,4,6-trifluorobenzoic acid (**47**) or 2,3,4-trifluorobenzoic acid (**48**) (0.3 g, 1.7 mmol) in dry methanol (10 mL) was prepared in a three-necked, round-bottom flask fitted with a reflux condenser and a calcium chloride tube. The flask was placed in an ice/water bath, thionyl chloride (1.4 mL) was then added dropwise, and the mixture was heated at 60–65 °C for three days under argon. After removal of solvent, the resulting residue was purified by extraction with pentane in the case of **49** and using column chromatography on silica gel (hexane/diethyl ether 6:1) for **50**.

Methyl 2,4,6-trifluorobenzoate (49): Colorless oil, yield 85% (lit.[41] Bp 105-110 °C/15 mm Hg). ^1H NMR (CDCl_3) δ 3.94 (s, 3H, OCH_3), 6.72 (dd, $^3J = ^3J = 8.3$, 2H, H3 and H5).

Methyl 2,3,4-trifluorobenzoate (50): Colorless oil, yield 81%. ^1H NMR (CDCl_3) δ 3.95 (s, 3H, OCH_3), 7.03 (m, 1H, H6), 7.74 (m, 1H, H5).

3-Hydroxy-4,6-difluoro-1*H*-indazole (**20**)

In a three-neck round-bottom flask equipped with a reflux condenser, methyl 2,4,6-trifluorobenzoate (**49**) (0.20 g, 1.1 mmol) was dissolved in tetrahydrofuran (20 mL); then, a solution of 98% hydrazine monohydrate (0.15 g, 3.0 mmol) in ethanol (10 mL) was added dropwise. The mixture was heated at 70 °C for 24 h. After cooling at room temperature, the solution was decanted and the organic solvent evaporated under vacuum. The solid residue was washed with dichloromethane and dried to afford **20** (0.13 g, 76%) as a white solid. Mp 293.5 °C. Anal. Calcd for $\text{C}_7\text{H}_4\text{F}_2\text{N}_2\text{O}$: C, 49.42; H, 2.37; N, 16.47. Found: C, 49.44; H, 2.49; N, 16.27. ^1H NMR (DMSO-d_6) δ 11.8 (br s, 1H, NH), 10.9 (br s, 1H, OH), 6.71 (ddd, $^3J_{\text{F4}} = ^3J_{\text{F6}} = 10.3$, $^4J_{\text{H7}} = 1.9$, 1H, H5), 7.09 (dd, $^3J_{\text{F6}} = 9.2$, $^4J_{\text{H5}} = 1.9$, 1H, H7); ^{19}F NMR (DMSO-d_6) δ -115.9 (dd, $^3J_{\text{H5}} = 9.6$, $^4J_{\text{F6}} = 8.4$, F4), -111.6 (br s, F6); ^{13}C NMR

(DMSO- d_6) δ 153.6 (s, C3), 98.9 (d, $^2J = 20.2$, C3a), 155.7 (dd, $^1J = 253.3$, $^3J = 16.7$, C4), 94.4 (dd, $^2J = 30.5$, $^2J = 23.3$, C5), 161.8 (dd, $^1J = 242.7$, $^3J = 11.7$, C6), 92.0 (dd, $^2J = 26.1$, $^4J = 4.7$, C7), 143.6 (dd, $^3J = 15.1$, $^3J = 10.3$, C7a); ^{15}N NMR (THF- d_8 , T = 207 K) δ –224.1 (N1, $^1J = 107.1$), –117.9 (N2).

3-Hydroxy-6,7-difluoro-1*H*-indazole (21)

In a three-neck round-bottom flask equipped with a reflux condenser, methyl 2,3,4-trifluorobenzoate (**50**) (0.21 g, 1.1 mmol) was dissolved in toluene (10 mL), then, a solution of 98% hydrazine monohydrate (0.24 g, 4.7 mmol) in ethanol (10 mL) was added dropwise. The mixture was heated at 80 °C for 24 h. After cooling at room temperature 5 mL of toluene were added, the solution was decanted and the organic solvent evaporated under vacuum. The solid residue was washed with pentane and 0.16 g of a crude solid was obtained. After silica gel chromatography with (hexane/ethyl acetate 3:1), **21** was obtained (0.11 g, 60%) as a white solid. Mp 237.3 °C (DSC). Anal. Calcd for $\text{C}_7\text{H}_4\text{F}_2\text{N}_2\text{O}$: C, 49.42; H, 2.37; N, 16.47. Found: C, 49.43; H, 2.61; N, 16.01. ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 12.1 (br s, 1H, NH), 11.0 (br s, 1H, OH), 7.43 (ddd, $^3J_{\text{H}_5} = 8.8$, $^4J_{\text{F}_6} = 4.4$, $^5J_{\text{F}_7} = 0.7$, 1H, H4), 6.99 (ddd, $^3J_{\text{F}_6} = 11.0$, $^3J_{\text{H}_4} = 8.8$, $^4J_{\text{F}_7} = 6.6$, 1H, H5); ^{19}F NMR (DMSO- d_6) δ –145.2 (ddd, $^3J_{\text{F}_7} = 20.3$, $^3J_{\text{H}_5} = 10.9$, $^4J_{\text{H}_4} = 3.1$, F6), –158.7 (dd, $^3J_{\text{F}_6} = 20.3$, $^4J_{\text{H}_5} = 6.5$, F7); ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ 155.9 (s, C3), 112.7 (d, $^3J = 4.3$, C3a), 116.5 (dd, $^2J = 9.6$, $^3J = 4.5$, C4), 109.1 (d, $^2J = 21.0$, C5), 148.2 (dd, $^1J = 241.2$, $^3J = 9.0$, C6), 135.0 (dd, $^1J = 247.3$, $^3J = 16.3$, C7), 131.7 (dd, $^2J = 11.6$, $^3J = 3.6$, C7a); ^{15}N NMR (THF- d_8 , T = 207 K) δ –234.4 (N1), –115.1 (N2).

3-Hydroxy-4,6-difluoro-7-nitro-1*H*-indazole (24)

A round-bottomed flask containing 3-hydroxy-4,6-difluoro-1*H*-indazole (**20**) (0.06 g, 0.35 mmol) and potassium nitrate (0.04 g, 0.4 mmol) was placed in an ice-water bath. Then, concentrated sulphuric acid 95–98% conc. (0.8 mL, $d = 1.84$ g/mL) was added dropwise, and the mixture kept at 0–4 °C for 1h. The mixture was stirred at room

temperature for 24 h and poured into ice-water (5 mL). The solution was extracted with ethyl acetate (3 x 20 mL), dried with anhydrous sodium sulfate and solvent was removed under reduced pressure to afford a yellow solid. The product was purified by silica gel chromatography with (hexane/ethyl ether 4:1), to afford **24** (0.045 g, 60%) as a yellow solid. Mp 217.4 °C (DSC). Anal. Calcd for C₈H₆F₂N₃O₂: C, 39.08; H, 1.41; N, 19.53; Found: C, 39.36; H, 1.61; N, 19.00. ¹H NMR (DMSO-d₆) δ 12.8 (br s, 1H, NH), 11.7 (br s, 1H, OH), 7.13 (dd, ³J_{F6} = 12.4, ³J_{F4} = 9.9, 1H, H5); ¹⁹F NMR (DMSO-d₆) δ -101.2 (dd, ⁴J_{F6} = 17.7, ³J_{H5} = 9.8, F4), -110.3 (br s, F6); ¹³C NMR (DMSO-d₆) δ 154.6 (s, C3), 101.5 (d, ²J = 20.1, C3a), 159.2 (dd, ¹J = 265.4, ³J = 16.8, C4), 96.4 (dd, ²J = 28.7, ²J = 25.5, C5), 158.4 (dd, ¹J = 265.9, ³J = 14.4, C6), 118.6 (dd, ²J = 8.8, ⁴J = 5.0, C7), 136.2 (dd, ³J = 11.3, ³J = 2.5, C7a); ¹⁵N NMR (THF-d₈, T = 207 K) δ -216.3 (¹J = 112.3, N1), -112.4 (N2), the NO₂ signal was not detected.

4.3. Statistical analysis

Data are expressed as the mean ± SEM. One-way analysis of variance, followed by the Newman-Keuls multiple range test was used. A P < 0.05 value was considered statistically significant.

4.4. Computational details

The geometry of the systems was initially optimized at the M05-2x/6-311+G(d) computational level [42,43]. This functional has shown to provide a good description for a large variety of molecular interaction complexes [44,45]. Frequency calculations at this computational level were performed to confirm that the structures obtained correspond to energetic minima. All these calculations were carried out within the Gaussian 03 package

[46].

Acknowledgments

This work has been partially supported by Grants CTQ2007-62113, CTQ2010-16122 and SAF2005-07991-C02-01 and CTQ2010-16122 (Ministerio de Ciencia e Innovación, MICINN, Spain), PI08-1664 (Instituto de Salud Carlos III, Spain), and P07-CTS-03135 (Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía, Spain). The help of Dr. M^a Ángeles García from the NMR laboratory of the UNED is greatly acknowledged.

References and notes

- [1] R. M. J. Palmer, A. G. Ferrige, S. Moncada, *Nature* 327 (1987) 524.
- [2] L. J. Ignarro, G. M. Buga, G. M. Wood, R. E. Byrns, G. Chaudhuri, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987) 9265.
- [3] J. F. Kerwin, M. Heller, *Med. Res. Rev.* 14 (1994) 23.
- [4] S. Moncada, E. A. Higgs, *FASEB J.* 9 (1995) 1319.
- [5] N. C. Stratman, G. J. Fici, V. H. Sethy, *Life Sci.* 59 (1996) 945.
- [6] R. M. Claramunt, C. López, C. Pérez-Medina, M. Pérez-Torralba, J. Elguero, G. Escames, D. Acuña-Castroviejo, *Bioorg. Med. Chem.* 17 (2009) 6180.
- [7] J. Elguero, I. Alkorta, R. M. Claramunt, C. López, D. Sanz, D. Santa María, *Bioorg. Med. Chem.* 17 (2009) 8027.
- [8] P. A. Bland-Ward, P. K. Moore, *Life Sci.* 57 (1995) 131.
- [9] P. Schumann, V. Collot, Y. Hommet, W. Gsell, F. Dauphin, J. Sopkova, E. T. MacKenzie, D. Duval, M. Boulouard, S. Rault, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11 (2001) 1153.

- [10] L. Salerno, V. Sorrenti, C. Di Giacomo, G. Romeo, M. A. Siracusa, *Curr. Pharm. Des.* 8 (2002) 177.
- [11] A. Tuynman, C. Pérollier, Y. Frapart, P. Schumann-Bard, V. Collot, S. Rault, J.-L. Boucher, *Nitric Oxide* 9 (2003) 86.
- [12] B. Cottyn, F. Acher, B. Ramassamy, L. Alvey, M. Lepoivre, Y. Frapart, D. Stuehr, D. Mansuy, J.-L. Boucher, D. Vichard, *Bioorg. Med. Chem.* 16 (2008) 5962.
- [13] S. M. J. Free, J. W. Wilson, *J. Med. Chem.* 7 (1964) 395.
- [14] D. J. Abraham, D. P. Rotella (Editors), *Burgers Medicinal Chemistry, Drug Discovery and Development*, 8 volume set, Wiley, 2010.
- [15] D. E. Rickert, *Toxicity of nitroaromatic compounds*. Hemisphere Publishing Corporation, Washington, 1985.
- [16] J. C. Spain, *Biodegradation of Nitroaromatic Compounds*, Plenum Press, New York, 1995.
- [17] T. Maeda, R. Nakamura, K. Kadokami, H. I. Ogawa, *Environ. Toxicol. Chem.* 26 (2007) 237.
- [18] J. Teichert, P. Oulié, K. Jacob, L. Vendier, R. M. Claramunt, C. López, C. Pérez-Medina, I. Alkorta, J. Elguero, *New. J. Chem.* 31 (2007) 936.
- [19] C. Pérez Medina, C. López, R. M. Claramunt, J. Elguero, *J. Heterocycl. Chem.* 46 (2009) 1408.
- [20] R. M. Claramunt, D. Sanz, C. López, E. Pinilla, M. R. Torres, J. Elguero, P. Nioche, C. S. Raman, *Helv. Chim. Acta* 92 (2009) 1952.
- [21] C. Pérez Medina, C. López, R. M. Claramunt, J. Elguero, *Eur. J. Org. Chem.* (2010) 890.
- [22] E. V. Aroskar, P. J. N. Brown, R. G. Plevey, R. Stephens, *J. Chem. Soc. C* (1968) 1569.
- [23] K. Lukin, M. C. Hsu, D. Fernando, M. R. Leanna, *J. Org. Chem.* 71 (2006) 8166.

- [24] B. A. Hathaway, G. Day, M. Lewis, R. Glaser, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* (1998) 2713.
- [25] C. L. Habraken, P. Cohen-Fernandes, *J. Org. Chem.* 36 (1971) 3084.
- [26] U. Wrzeciono, E. Linkowska, A. Rogowska, M. Lakoma, D. Kubiak, *Pharmazie* 39 (1984) 389.
- [27] G. Zoller, S. Petry, G. Mueller, H. Heuer, N. Tennagels, Patent No. WO 2007042178, Apr 19, 2007.
- [28] R. J. Rosenfeld, E. D. Garcin, K. Panda, G. Andersson, A. Åberg, A. V. Wallace, G. M. Morris, A. J. Olson, D. J. Stuehr, J. A. Tainer, E. D. Getzoff, *Biochemistry* 41 (2002) 13915.
- [29] C. S. Raman, H. Li, P. Martásek, G. Southan, B. S. S. Masters, T. L. Poulos, *Biochemistry* 40 (2001) 13448.
- [30] P. R. Porubsky, K. M. Meneely, E. E. Scott, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 33698.
- [31] J. Catalán, J. L. M. Abboud, J. Elguero, *Adv. Heterocycl. Chem.* 41 (1987) 187.
- [32] B. Chan, J. E. D. Bene, J. Elguero, L. Radom, *J. Phys. Chem. A* 109 (2005) 5509.
- [33] NIST Chemistry Webbook; P. J. Linstrom, W. G. Mallard, Eds. NIST Standard Reference Database No. 69; National Institute of Standards and Technology: Gaithersburg, MD, 2003. <http://webbook.nist.gov>.
- [34] T. Fujita, C. Hansch, *J. Med. Chem.* 10 (1967) 991.
- [35] H. Kubinyi, *QSAR: Hansch analysis and related approaches*; VCH: Weinheim, 1993.
- [36] E. Crespo, M. Macías, D. Pozo, G. Escames, M. Martin, F. Vives, J. M. Guerrero, D. Acuña-Castroviejo, *FASEB J.* 13 (1999) 1537.
- [37] G. Escames, J. León, M. Macías, H. Khaldy, D. Acuña-Castroviejo, *FASEB J.* 17 (2003) 932.
- [38] O. H. Lowry, N. J. Rosenbrough, A. L. Farr, R. J. Randall, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265.

- [39] D. S. Bredt, S. H. Snyder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 9030.
- [40] S. Berger, S. Braun, *200 and more NMR Experiments*, Wiley-VCH: Weinheim, 2004.
- [41] N. Punja, *Eur. Pat. Appl. EP 31199 19810701*, 1981. CAS Registry number 79538-28-6.
- [42] Y. Zhao, N. E. Schultz, D. G. Truhlar, *J. Chem. Theory Comput.* 2 (2006) 364.
- [43] M. J. Frisch, J. A. Pople, J. S. Binkley, *J. Chem. Phys.* 80 (1984) 3265.
- [44] Y. Zhao, D. G. Truhlar, *J. Phys. Chem. C* 112 (2008) 6860.
- [45] Y. Zhao, D. G. Truhlar, *Acc. Chem. Res.* 41 (2008) 157.
- [46] M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. Montgomery, T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez, J. A. Pople, *GAUSSIAN-03; Gaussian*: Wallingford, CT, 2003.

Table 1

iNOS and nNOS % inhibition in the presence of indazoles. Values from reference 6 are underlined. Except when indicated, the concentration of these compounds used in the NOS assays was 1 mM.

Compound	iNOS	nNOS
1 (7-nitro-1 <i>H</i> -indazole)	<u>84.0</u>	<u>88.0</u>
2 (1-methyl-7-nitro-1 <i>H</i> -indazole)	<u>25.0</u>	<u>27.3</u>
3 (2-methyl-7-nitro-2 <i>H</i> -indazole)	<u>36.0</u>	<u>29.0</u>
4 (4,5,6,7-tetrafluoro-1 <i>H</i> -indazole)	98.7	43.3
5 (3-methyl-1 <i>H</i> -indazole)	77.4	33.7 ^a
6 (3-methyl-4,6-difluoro-1 <i>H</i> -indazole)	74.3	52.1
7 (3-methyl-6,7-difluoro-1 <i>H</i> -indazole)	69.2	58.4
8 (3-methyl-4,5,6,7-tetrafluoro-1 <i>H</i> -indazole)	<u>83.0</u>	<u>63.0</u>
9 (3-methyl-4,6-difluoro-7-nitro-1 <i>H</i> -indazole)	92.0	90.0
10 (3-methyl-6,7-difluoro-5-nitro-1 <i>H</i> -indazole)	95.6	85.4
11 (3-trifluoromethyl-1 <i>H</i> -indazole)	80.1	69.9
12 (3-trifluoromethyl-4,5,6,7-tetrafluoro-1 <i>H</i> -indazole)	<u>21.0</u>	<u>41.0</u>
13 (3-phenyl-4,5,6,7-tetrafluoro-1 <i>H</i> -indazole)	<u>37.0</u>	<u>11.0</u>
14 (3-pentafluorophenyl-4,5,6,7-tetrafluoro-1 <i>H</i> -indazole)	<u>80.0</u>	<u>8.0</u>
15 (3-bromo-7-nitro-1 <i>H</i> -indazole)	<u>97.0</u>	<u>95.0</u>
16 (1-methyl-3-bromo-7-nitro-1 <i>H</i> -indazole)	<u>10.0</u>	<u>22.0</u>
17 (2-methyl-3-bromo-7-nitro-2 <i>H</i> -indazole)	<u>7.0</u>	<u>29.0</u>
18 (3,7-dinitro-1 <i>H</i> -indazole)	89.3	2.1
19 (3-hydroxy-1 <i>H</i> -indazole)	55.1	31.4 ^b
20 (3-hydroxy-4,6-difluoro-1 <i>H</i> -indazole)	48.1	11.1
21 (3-hydroxy-6,7-difluoro-1 <i>H</i> -indazole)	89.1	57.1
22 (3-hydroxy-4,5,6,7-tetrafluoro-1 <i>H</i> -indazole)	<u>6.0</u>	<u>23.0</u>
23 (3-hydroxy-7-nitro-1 <i>H</i> -indazole)	8.2	18.9
24 (3-hydroxy-4,6-difluoro-7-nitro-1 <i>H</i> -indazole)	91.0	14.9
25 (3-hydroxy-5,6,7-trifluoro-1 <i>H</i> -indazole-4-carboxylic acid)	62.6	1.8
26 (3-hydroxy-5,6,7-trifluoro-1 <i>H</i> -indazole-4-carboxylic acid methyl ester)	22.6	6.3
27 (3-hydroxy-5,6,7-trifluoro-1 <i>H</i> -indazole-4-carboxylic acid ethyl ester)	38.7	1.2
28 (3-hydroxy-4,6,7-trifluoro-1 <i>H</i> -indazole-5-carboxylic acid)	16.3	12.1
29 (3-hydroxy-4,6,7-trifluoro-1 <i>H</i> -indazole-5-carboxylic acid methyl ester)	48.9	13.3
30 (3-hydroxy-4,6,7-trifluoro-1 <i>H</i> -indazole-5-carboxylic acid ethyl ester)	51.8	2.5
31 (3-hydroxy-4,5,7-trifluoro-1 <i>H</i> -indazole-6-carboxylic acid)	42.0	5.4
32 (3-hydroxy-4,5,7-trifluoro-1 <i>H</i> -indazole-6-carboxylic acid methyl ester)	46.2	19.7
33 (3-hydroxy-4,5,7-trifluoro-1 <i>H</i> -indazole-6-carboxylic acid ethyl ester)	53.5	10.2
34 (3-hydroxy-4,5,6-trifluoro-1 <i>H</i> -indazole-7-carboxylic acid)	40.7	11.1
35 (3-hydroxy-4,5,6-trifluoro-1 <i>H</i> -indazole-7-carboxylic acid methyl ester)	49.6	5.1
36 (3-hydroxy-4,5,6-trifluoro-1 <i>H</i> -indazole-7-carboxylic acid ethyl ester)	43.7	5.6
37 (1 <i>H</i> -indazole) [8]	~45	11.2
38 (7-methoxy-1 <i>H</i> -indazole) [9]	~70	80.0
39 (7-cyano-1 <i>H</i> -indazole) [12]	~80	~88

^a The related 3-ethyl-1*H*-indazole has a % of nNOS inhibition of 18.8 [8].

^b 3-Hydroxy-1*H*-indazole (**19**) is inactive towards nNOS (IC₅₀ (μM) > 1000) [6,10].

Table 2

Contribution of the different substituents and positions to the activity of the 12 indazoles bearing a CO₂R substituent

Substituent	iNOS	nNOS
CO ₂ H	40±7	8±3
CO ₂ CH ₃	42±7	11±3
CO ₂ C ₂ H ₅	47±7	5±3
R ²	0.93	0.76
4-CO ₂ R	41±8	3±3
5-CO ₂ R	39±8	9±3
6-CO ₂ R	47±8	12±3
7-CO ₂ R	45±8	7±3
R ²	0.93	0.80

Table 3

PA (basicity), ΔH (acidity), E_i stacking energies, E_i apical energies, E_{rel} (E_i stacking – E_i apical). M05-2x/6-311+G(d) calculations including BSSE. All values in kJ mol⁻¹

Ligand	PA	ΔH	Stacking	Apical	E _{rel}
Pyridine	927.8	-----	-----	-----	-----
Imidazole	945.5	1489.0	-----	-----	-----
Pyrazole	891.4	1513.0	-----	-----	-----
1	860.2	1446.8	-41.1	-60.0	18.9
4	839.2	1409.0	-63.6	-73.1	9.5
5	918.3	1482.2	-82.7	-56.7	-26.0
8	862.7	1416.2	-45.4	-66.6	21.2
9	858.8	1424.5	-75.3	-74.4	-0.9
10	844.4	1382.5	-78.8	-78.4	-0.4
12	803.9	1358.5	-45.0	-49.7	4.7
15	843.3	1408.1	-44.9	-55.7	10.8
18	793.7	1358.4	-54.4	-43.5	-10.9
19	901.4	1477.0	-92.7	-55.1	-37.6
21	872.0	1444.8	-61.4	-91.2	29.8
24	849.4	1417.0	-88.4	-75.1	-13.3
37	898.7	1477.9	-36.7	-68.5	31.8
38	911.2	1487.8	-62.8	-76.2	13.4
39	859.2	1428.4	-57.5	-72.8	15.3

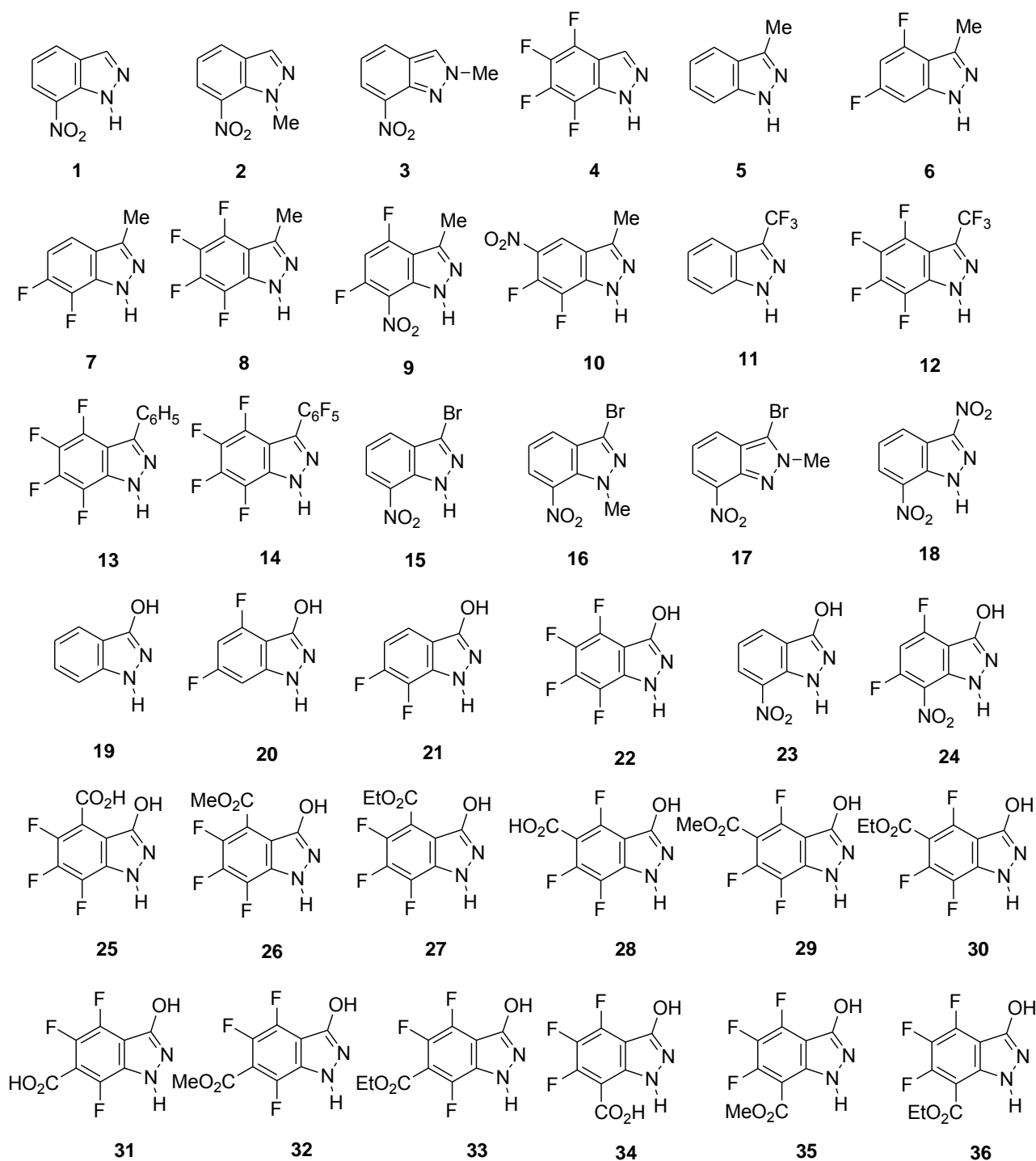


Figure 1. The indazoles series.

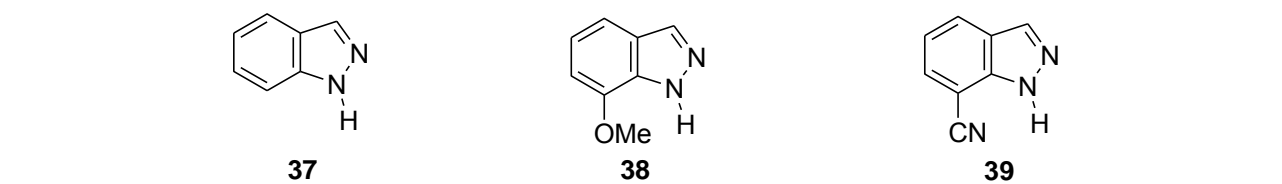


Figure 2. Three literature indazoles.

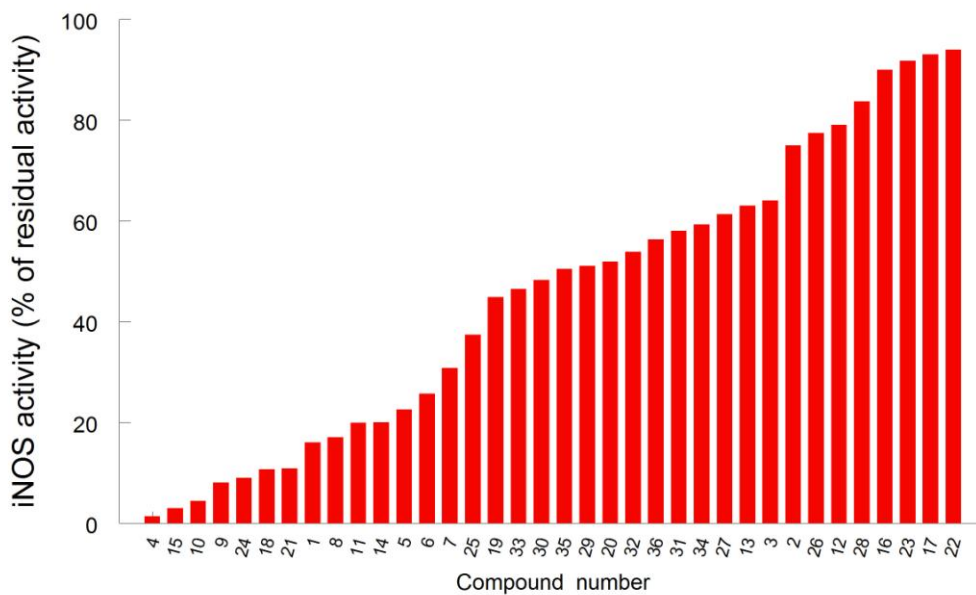


Figure 3. Percentage of residual activity of iNOS in the presence of the tested compounds.

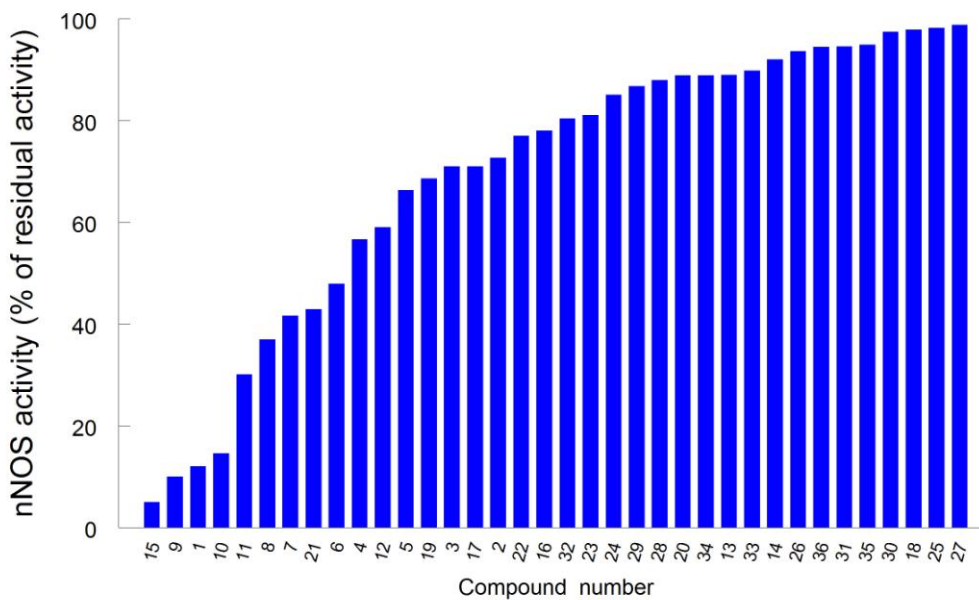


Figure 4. Percentage of residual activity of nNOS in the presence of the tested compounds.

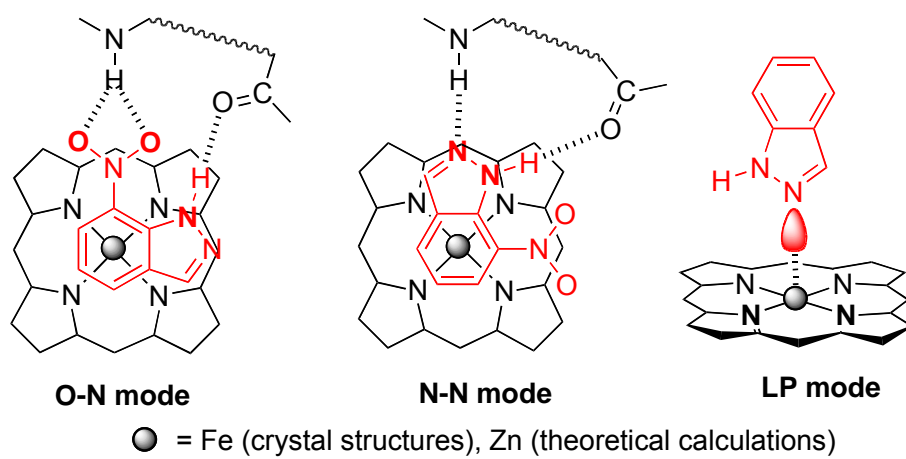


Figure 5. Different interaction modes of indazoles with Zn-porphyrins.

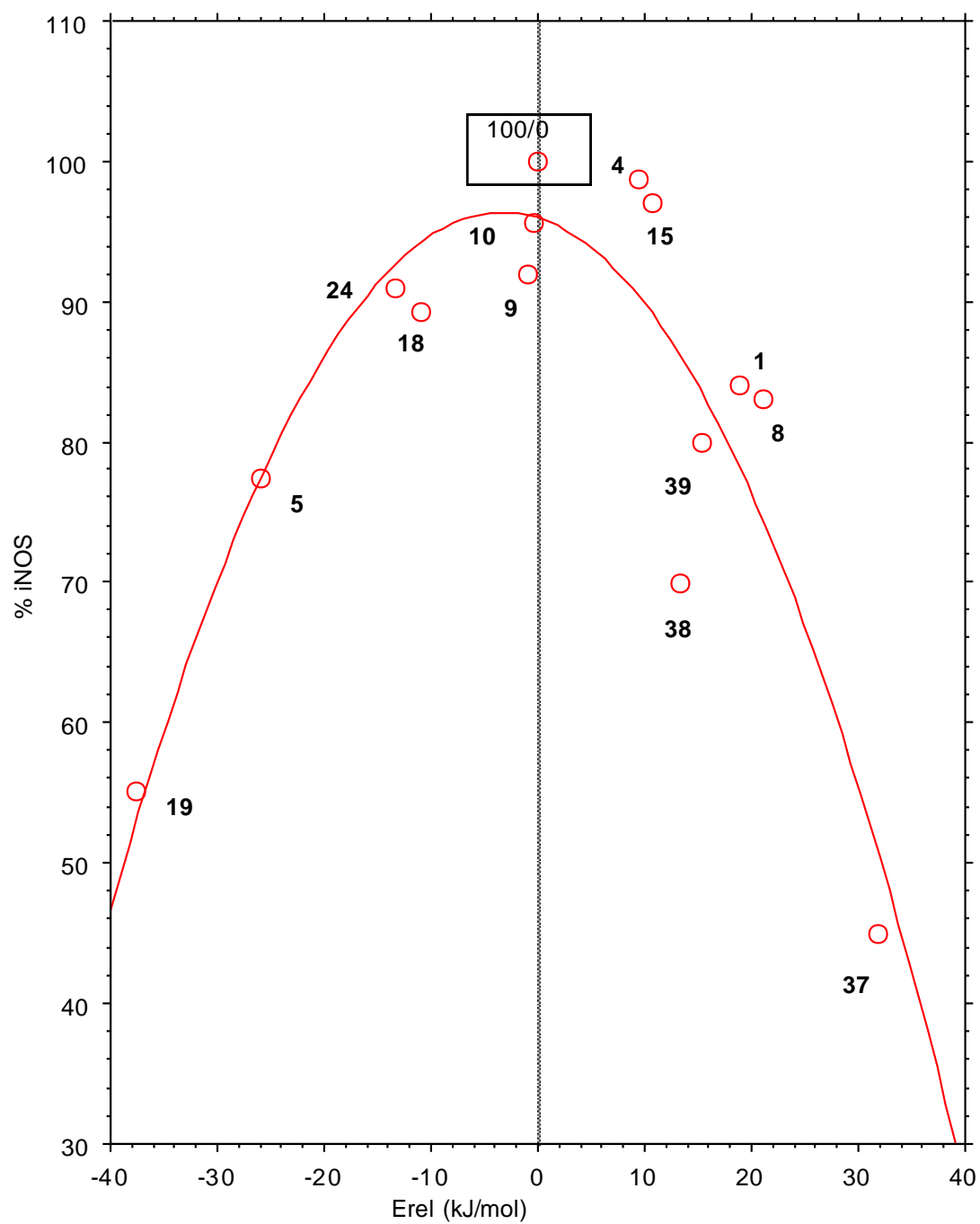
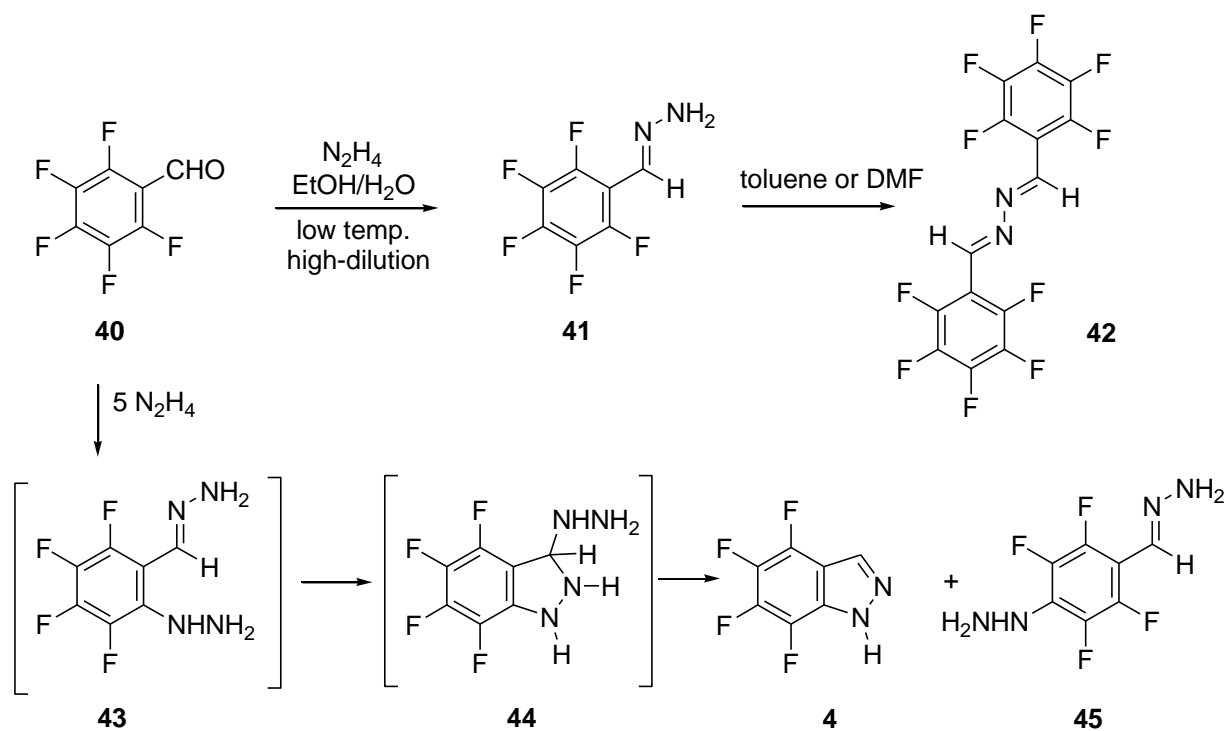
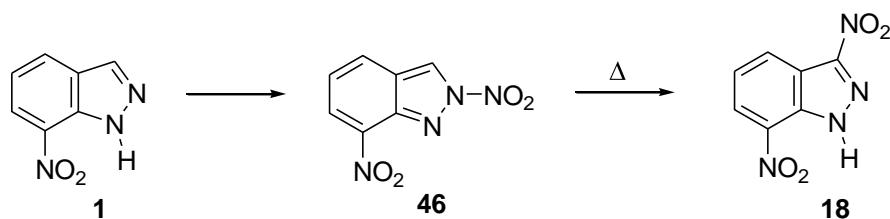


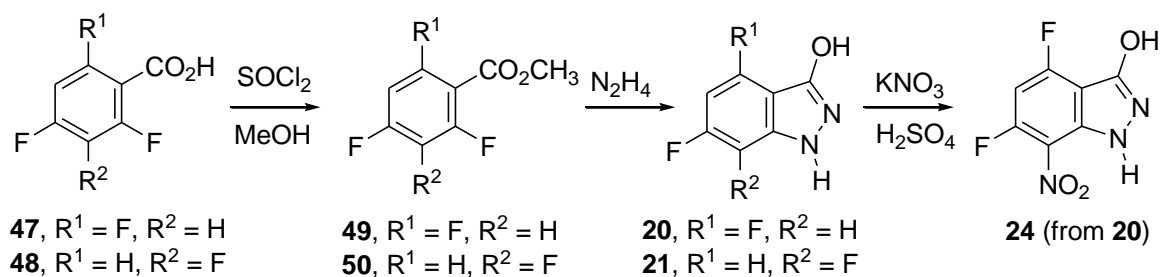
Figure 6. Variation of the percentage of iNOS inhibition with E_{rel} .



Scheme 1. Synthesis of indazole 4.



Scheme 2. Synthesis of indazole 18.



Scheme 3. Synthesis of indazoles 20, 21 and 24.

Research highlights

- 1) synthetic indazoles are good inhibitors of NOS isoforms
- 2) a fluorine atom in the molecule increases the inhibitory potency against NOS
- 3) 4,5,6,7-tetrafluoroindazole is a potent and selective iNOS inhibitor
- 4) a parabolic model relates the interaction between inhibitory indazoles and iNOS

1.2 SERIE DE LAS TIADIAZOLINAS.

En la tabla 3 se representa la estructura química y los sustituyentes R de estos compuestos, así como los porcentajes residuales sobre la actividad iNOS y nNOS recombinantes.

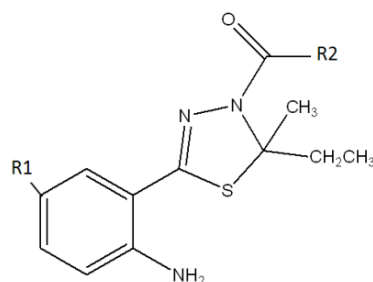


Tabla 3. Porcentajes de actividad residual iNOS y nNOS de los compuestos tiadiazolinas.

Código	R ₁	R ₂	pm	% residual iNOS	% residual nNOS
QFF-301	H	CH ₃	263.36	57.16 ± 2.33	76.33 ± 3.3
QFF-302	H	C ₂ H ₅	277.39	70.01 ± 1.23	70.5 ± 2.13
QFF-303	H	C ₃ H ₇	291.41	64.21 ± 1.65	75.74 ± 2.43
QFF-304	H	C ₄ H ₉	275.37	65.21 ± 0.64	53.42 ± 1.58
QFF-305	H	c-C ₃ H ₅	289.4	52.8 ± 0.54	64.8 ± 0.32
QFF-306	H	c-C ₄ H ₇	303.42	57.11 ± 1.04	61.73 ± 2.32
QFF-307	H	c-C ₅ H ₉	317.45	69.31 ± 2.35	86.1 ± 1.89
QFF-308	H	c-C ₆ H ₁₁	311.4	72.74 ± 3.23	82.36 ± 1.37
QFF-309	H	C ₆ H ₅	279.356	82.68 ± 3.12	65.78 ± 0.43
QFF-310	OCH ₃	CH ₃	293.383	61.09 ± 2.03	60.82 ± 1.03
QFF-311	OCH ₃	C ₂ H ₅	307.41	68.76 ± 2.04	73.72 ± 2.04
QFF-312	OCH ₃	C ₃ H ₇	319.42	71.39 ± 1.23	54.92 ± 0.34
QFF-313	OCH ₃	C ₄ H ₉	333.45	62.42 ± 0.32	105.03 ± 4.23
QFF-314	OCH ₃	c-C ₃ H ₅	347.47	32.83 ± 0.21	77.87 ± 1
QFF-315	OCH ₃	c-C ₄ H ₇	341.43	78 ± 1.25	104.24 ± 3.23
QFF-316	OCH ₃	c-C ₅ H ₉	283.77	70.75 ± 2.87	109.84 ± 4.74
QFF-317	OCH ₃	c-C ₆ H ₁₁	379.8	69.6 ± 3.26	78.18 ± 1.73
QFF-318	OCH ₃	C ₆ H ₅	311.83	67.76 ± 1.98	94.97 ± 2.48
QFF-319	Cl	CH ₃	325.85	78.17 ± 1.23	96.8 ± 3.87
QFF-320	Cl	C ₂ H ₅	309.81	61.7 ± 1.76	97.37 ± 3.29
QFF-321	Cl	C ₃ H ₇	323.84	32.93 ± 0.45	67.52 ± 1.93
QFF-322	Cl	C ₄ H ₉	337.87	69.63 ± 0.23	93.68 ± 2.98
QFF-323	Cl	c-C ₃ H ₅	351.89	73.19 ± 1.58	106.13 ± 3.28
QFF-324	Cl	c-C ₄ H ₇	347.86	71.66 ± 1.33	104.84 ± 3.85
QFF-325	Cl	c-C ₅ H ₉	263.36	78.84 ± 1.38	103.03 ± 3.47
QFF-326	Cl	c-C ₆ H ₁₁	277.39	70.72 ± 2.38	99.39 ± 2.47

Código	R ₁	R ₂	pm	% residual iNOS	% residual nNOS
QFF-327	Cl	C6H5	291.41	77.85 ± 1.04	90.97 ± 1.57

La figura 12 A muestra los cambios en la actividad iNOS en presencia de las tiadiazolinas evaluadas. Entre estos compuestos destacan el QFF-314 y el QFF-321 como los más potentes en inhibición de la iNOS.

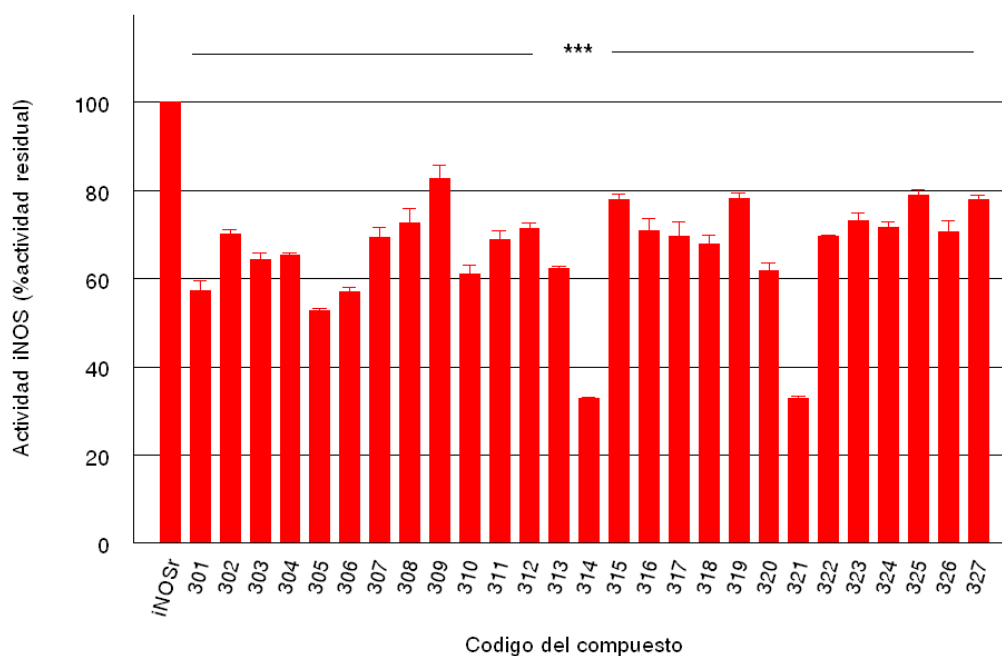


Figura 12 A. Efectos de los derivados tiadiazolinas (1 mM) sobre la actividad iNOS. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ vs NOSr.

La figura 12 B muestra los cambios en la actividad nNOS en presencia de estos compuestos. La máxima inhibición de la nNOS en este grupo se alcanzó con los compuestos QFF-304 y QFF-312, mientras que en ninguno de los casos el porcentaje de inhibición superó el 50%, por lo que podemos decir que esta serie presenta una inhibición de la nNOS frente a la iNOS bastante menor.

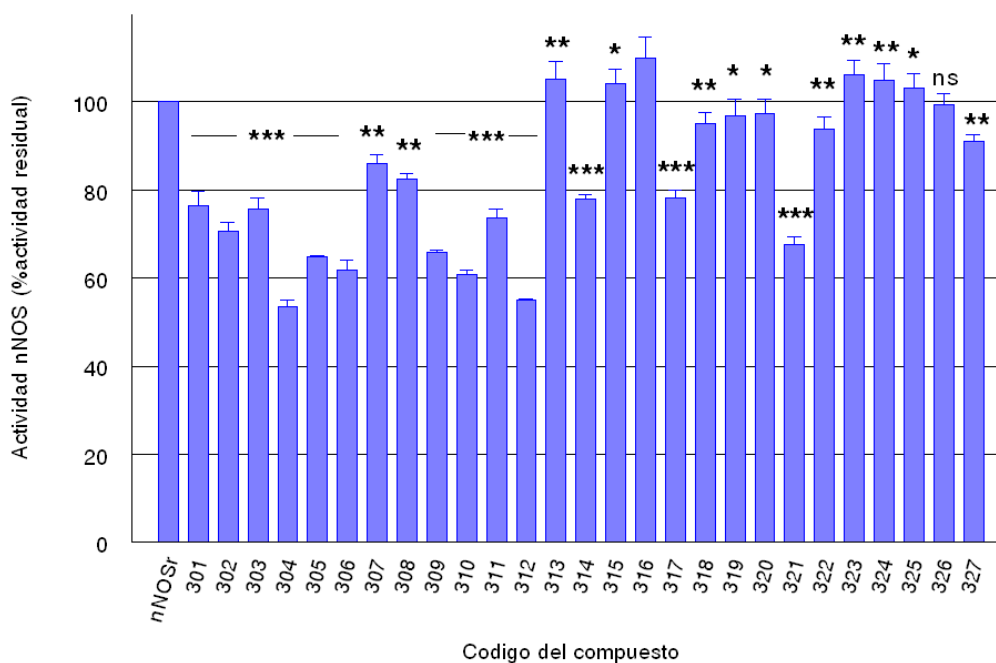


Figura 12 B. Efectos de los derivados tiadiazolinas (1 mM) sobre la actividad nNOS. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ vs NOSr.

1.3 SERIE DE LOS PIRROLES.

En la tabla 4 se representa la estructura química y los sustituyentes R de estos compuestos, así como los porcentajes residuales sobre la actividad iNOS y nNOS recombinantes.

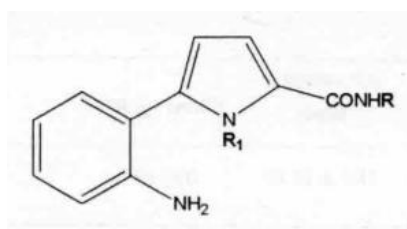


Tabla 4. Porcentajes de actividad residual iNOS y nNOS de los compuestos pirroles.

Código	R	R1	pm	% residual iNOS	% residual nNOS
QFF-205	CH ₃	H	215.251	67.32 ± 2.78	112.79 ± 0.21
QFF-212	Ph	H	269.342	47.21 ± 1.70	94.64 ± 3.19

La figura 13 muestra los cambios en la actividad nNOS e iNOS en presencia de estos compuestos. Los derivados QFF-205 y QFF-212 inhiben la actividad iNOS, mientras que no alteraran la actividad nNOS.

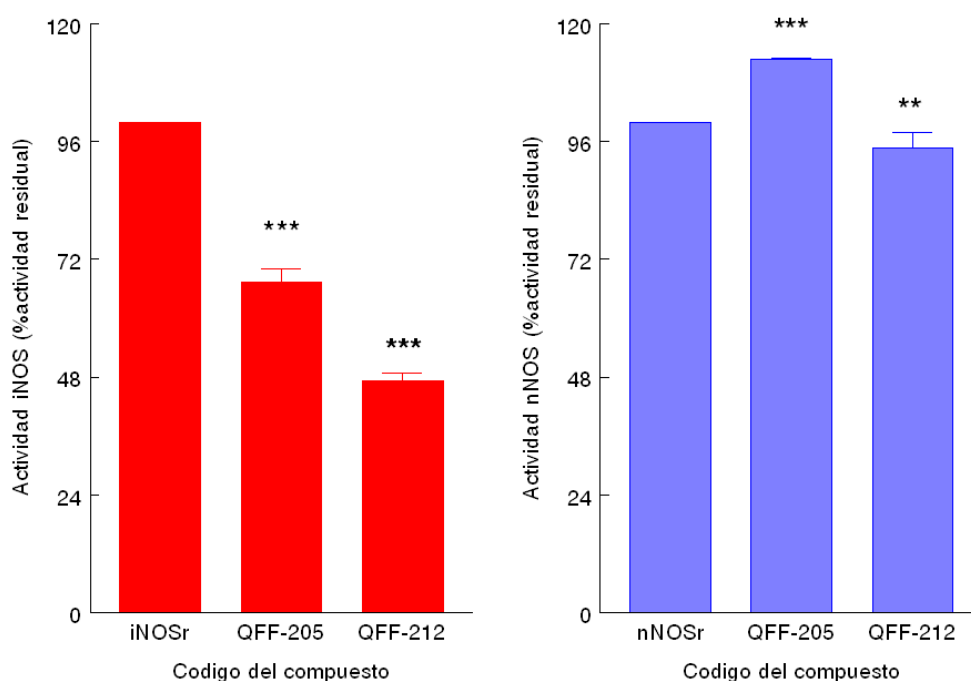


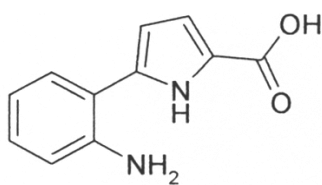
Figura 13 Efectos de los compuestos QFF-205 y QFF-212 (1 mM) sobre la actividad nNOS (derecha) e iNOS (izquierda). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ vs NOSr.

1.4 SERIE DE LOS DERIVADOS ÁCIDO Y ÉSTER DE PIRROLES.

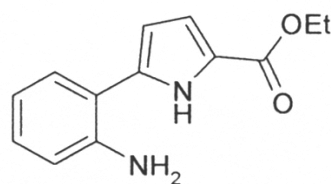
A continuación se representan las estructuras químicas de los compuestos y la tabla con los resultados de actividad residual sobre las dos isoformas de la NOS recombinantes.

El primero (QFF-338) es el ácido libre, que pudiera ser el metabolito común de los compuestos pirrolítico con $R_1 = H_s$, producido po hidrólisis de la amida En la tabla 5 se representa la estructura química y los sustituyentes R de estos derivados, así como los porcentajes de inhibición sobre la nNOS e iNOS.

El compuesto QFF-339 se trata de un éster en lugar de una amida que por hidrólisis generará también el ácido libre QFF-338.



QFF338



QFF339

Tabla 5. Porcentajes de actividad residual iNOS y nNOS del ácido (QFF-338) y éster (QFF-339) de pirrol.

Código	pm	% residual iNOS	% residual nNOS
QFF-338	246.32	62.53 ± 1.98	99.12 ± 2.35
QFF-339	286.54	72.78 ± 1.23	86.89 ± 3.23

La figura 14 muestra que los compuestos de esta serie inhiben significativamente la actividad iNOS mientras que apenas modifican la actividad nNOS.

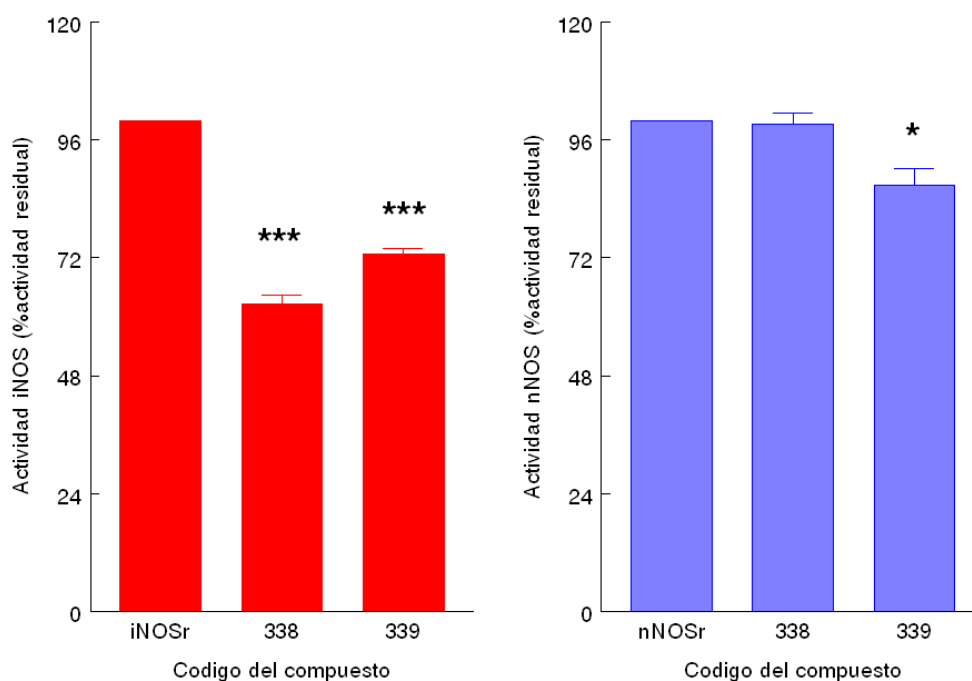


Figura 14. Efectos de los compuestos QFF-338 y QFF339 (1 mM) sobre la actividad iNOS (a la izquierda) y nNOS (a la derecha). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ vs NOSr.

1.5 SERIE DE LOS PIRROLES SIN AMINO.

En la tabla 6 se representa la estructura química y los sustituyentes R de estos compuestos, así como los porcentajes residuales sobre la actividad iNOS y nNOS recombinantes.

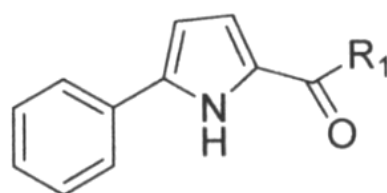


Tabla 6. Porcentajes de actividad residual iNOS y nNOS de los pirroles sin grupo amino.

Código	R ₁	pm	% residual iNOS	% residual nNOS
QFF-328	-NH-(CH ₂) ₂ -CH ₃	228	88.3 ± 3.12	66.22 ± 0.54
QFF-329	-Ph	254	91.03 ± 2.03	84.76 ± 1.04
QFF-330	-NH-C ₆ H ₁₁	268	62.42 ± 2.04	95.32 ± 2.35
QFF-331	-NH-(CH ₂) ₃ -CH ₃	242	75.35 ± 1.23	74.31 ± 3.23
QFF-332	NH- C ₃ H ₅	240	75.81 ± 0.32	95.46 ± 3.12
QFF-333	-NH-C ₄ H ₇	200	87.97 ± 0.21	73.23 ± 1.65
QFF-334	-NH-CH ₃	240	77.4 ± 1.25	106.72 ± 0.64
QFF-335	-NH-(CH ₂) ₂ -CH ₃	276	62.32 ± 2.87	80.99 ± 0.54
QFF-337	-OH	228	66.02 ± 3.26	82.31 ± 1.04

La figura 15 muestra como todos los compuestos evaluados inhiben significativamente la actividad iNOS, destacando los compuestos QFF-330 y QFF-335, con un porcentaje de inhibición cercano al 40%.

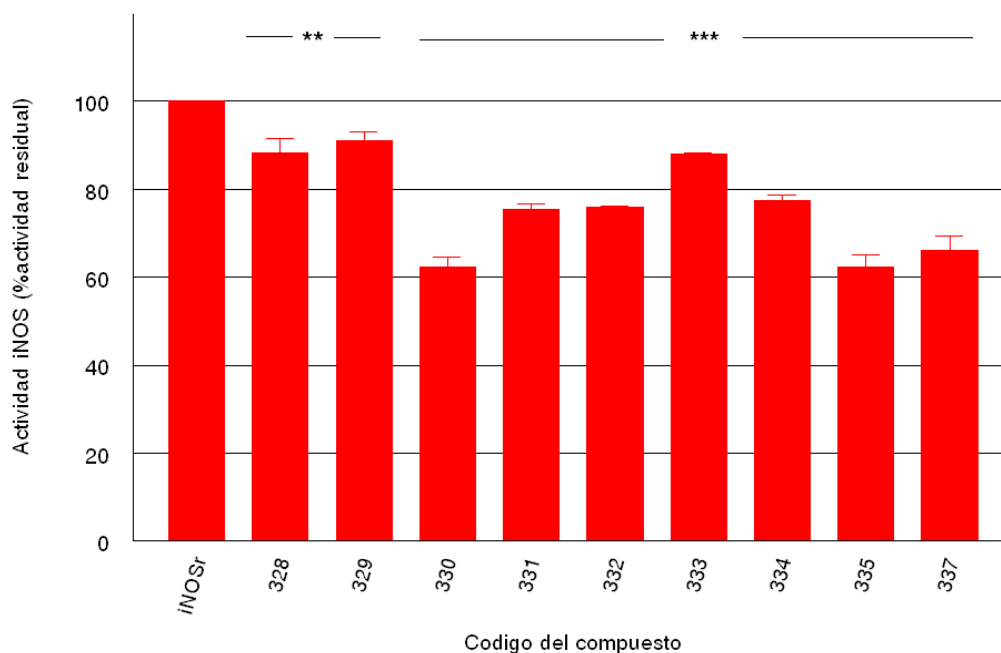


Figura 15. Efectos de los derivados pirrólicos sin grupo amino (1 mM) sobre la actividad iNOS). * P<0.05, ** P<0.01 y *** P<0.001 vs NOSr.

La figura 16 muestra como todos los compuestos evaluados inhiben significativamente la actividad nNOS. El compuesto QFF-328 sería el más potente de esta serie inhibiendo selectivamente la actividad nNOS de forma selectiva. En el caso contrario tendríamos al compuesto QFF-330 como inhibidor selectivo de iNOS, modificando apenas la actividad nNOS.

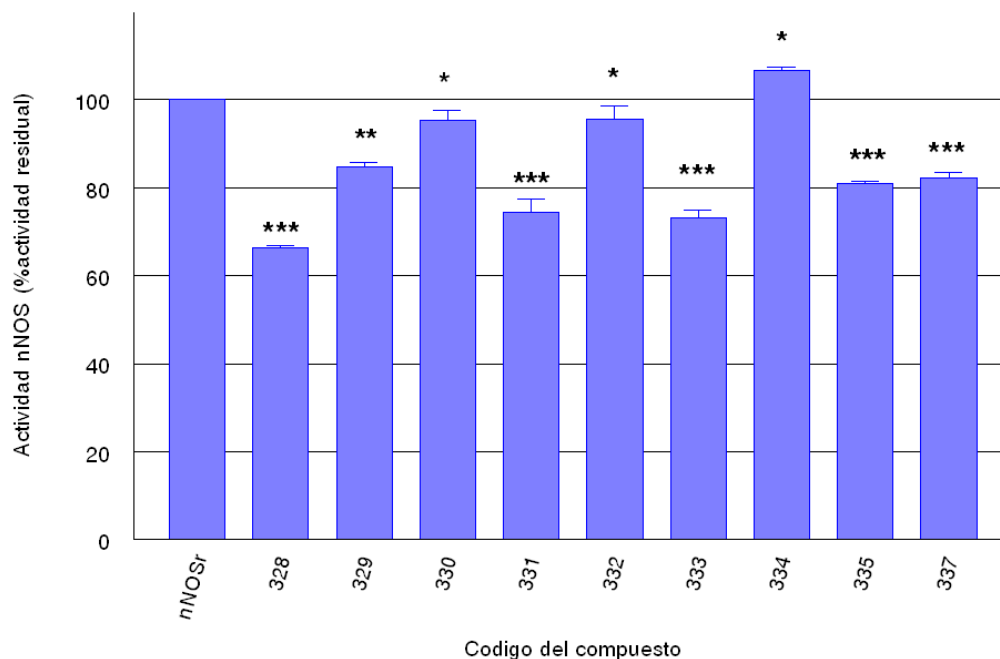


Figura 16. Efectos de los derivados piróolicos sin grupo amino (1 mM) sobre la actividad nNOS. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ vs NOSr.

1.6 SERIE DE LAS OXIDIAZOLINAS.

En la tabla 7 se representa la estructura química y los sustituyentes R de estos compuestos, así como los porcentajes residuales sobre la actividad iNOS y nNOS recombinantes.

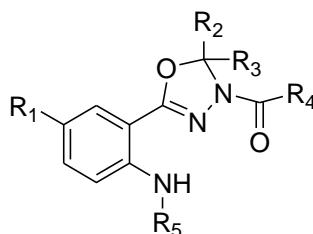


Tabla 7. Porcentajes de actividad residual iNOS y nNOS de las oxidiazolinas.

Código	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	pm	% residual iNOS	% residual nNOS
QFF 340	H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	233	71.59 ± 1.76	58.92 ± 3.12
QFF 341	H	CH ₃	C ₂ H ₅	CH ₃	H	247	67.8 ± 0.45	86.89 ± 2.03
QFF 342	H	CH ₃	CH ₃	C ₂ H ₅	H	247	68.62 ± 0.23	63.5 ± 2.04

Código	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	pm	% residual iNOS	% residual nNOS
QFF 343	H	CH ₃	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	H	261	47.15 ± 1.58	86.68 ± 1.23
QFF 344	H	CH ₃	CH ₃	C ₃ H ₇	H	261	62.37 ± 1.33	71.99 ± 0.32
QFF 345	H	CH ₃	CH ₃	C ₄ H ₉	COC ₄ H ₉	359	65.02 ± 2.32	51.22 ± 0.21
QFF 346	H	CH ₃	CH ₃	C ₄ H ₉	H	275	59.72 ± 1.89	44.89 ± 1.25

La figura 17 muestra que estos compuestos ensayados inhiben significativamente la actividad iNOS, especialmente el compuesto QFF-343.

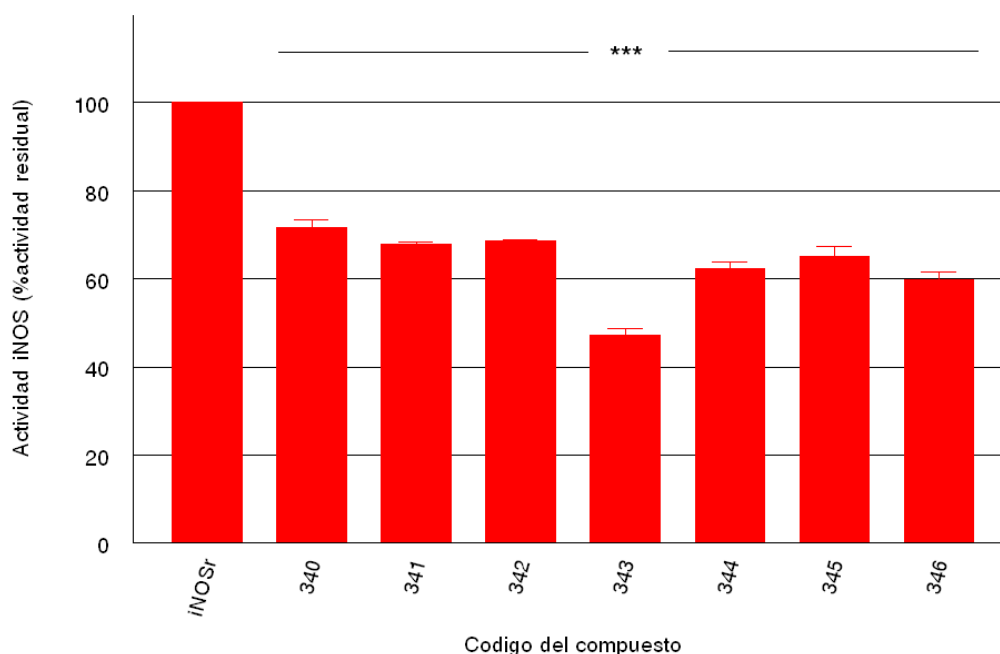


Figura 17. Efectos de oxidiazolinas (1 mM) sobre la actividad iNOS. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ vs NOSr.

La figura 18 muestra los cambios en la actividad nNOS en presencia de estos compuestos; la máxima inhibición de la nNOS se alcanzó con los derivados QFF-345 y QFF-346. Las oxidiazolinas estudiadas han resultado tener un efecto inhibitorio similar de las actividad iNOs y nNOS excepto en los casos QFF-341 y QFF-343 que parecen comportarse como inhibidores más selectivos de la iNOS al no afectar en gran medida la actividad nNOS.

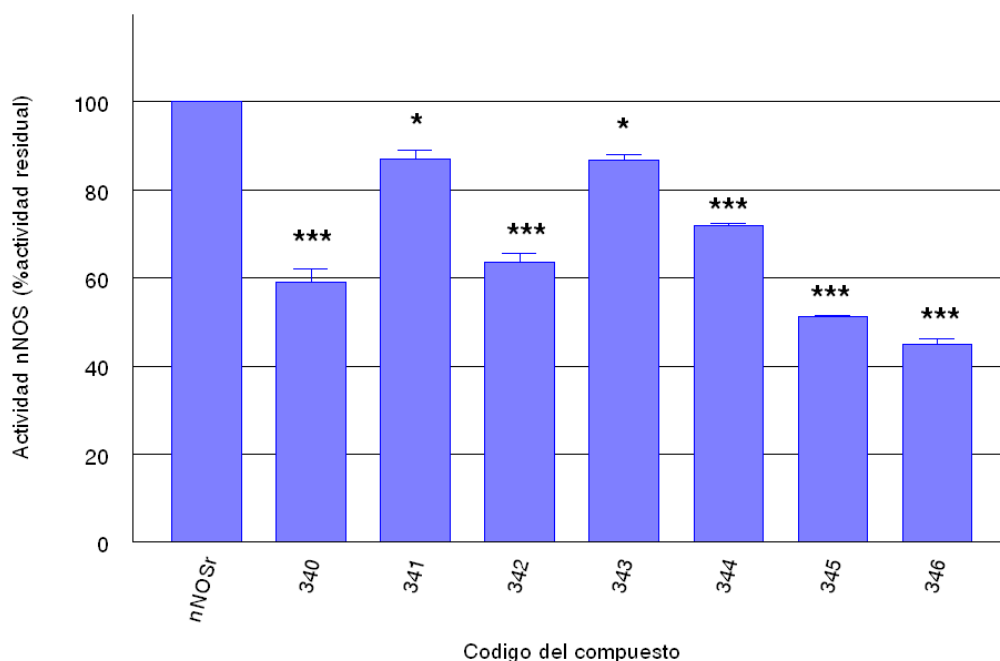


Figura 18. Efectos de las oxidiazolinas (1mM) sobre la actividad nNOS. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ vs NOSr.

1.7 SERIE DE LAS QUINAZOLONAS:

En la tabla 8 se representa la estructura química y los sustituyentes R de estos compuestos, así como los porcentajes residuales sobre la actividad iNOS y nNOS recombinantes.

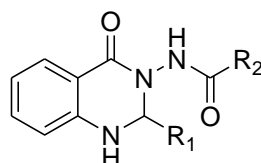


Tabla 8. Porcentajes de actividad residual iNOS y nNOS de las quinazolonas.

Código	R ₁	R ₂	pm	% residual iNOS	% residual nNOS
QFF-347	CH ₃	CH ₃	219.24	67.19 ± 1.37	56.92 ± 2.87
QFF-348	CH ₃	Et	233.26	80.19 ± 0.43	65.82 ± 3.26
QFF-349	CH ₃	Pr	247.29	93.6 ± 1.03	108.97 ± 0.45
QFF-350	CH ₃	Bu	261.32	80.39 ± 1.73	34.68 ± 0.23
QFF-351	C ₂ H ₅	CH ₃	233.26	81.54 ± 2.48	84.11 ± 1.58
QFF-352	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	247.29	81.07 ± 3.87	97.53 ± 1.33
QFF-353	C ₂ H ₅	Pr	261.32	103.68 ± 3.29	93.74 ± 1.38
QFF-354	C ₂ H ₅	Bu	275.35	113.5 ± 4.23	89.54 ± 2.38

En la figura 19 muestra los cambios en la actividad iNOS en presencia de estas quinazolonas, siendo QFF-347 el compuesto con mayor inhibición sobre la actividad iNOS, mientras que QFF-354 presenta un porcentaje de actividad iNOS mayor del encontrado en la encima recombinante, lo que podría interpretarse como una potenciación del encima inducible.

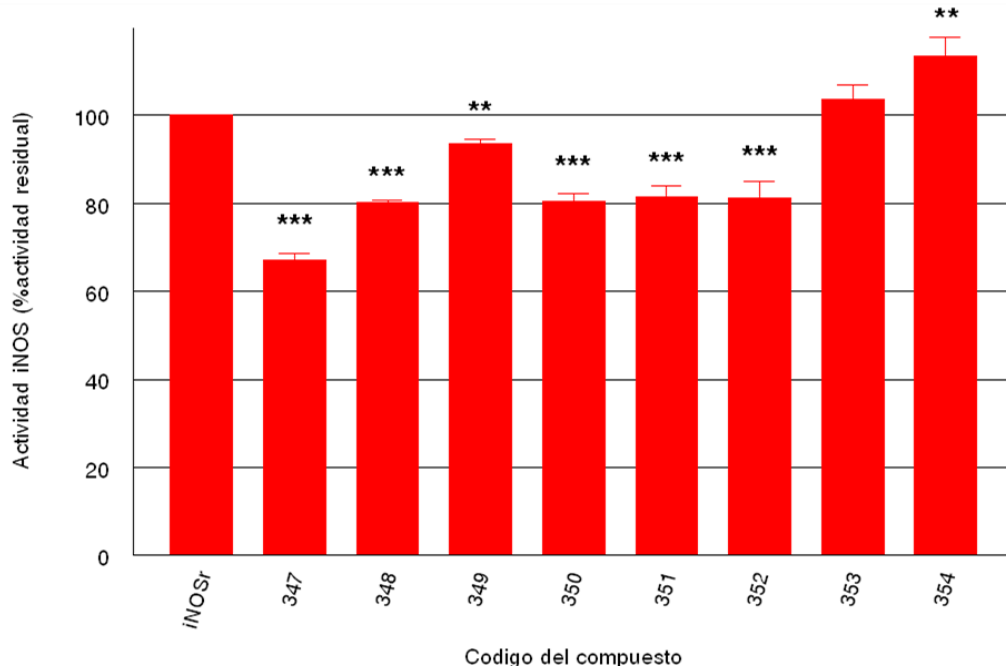


Figura 19. Efectos de oxidiazolinas (1 mM) sobre la actividad iNOS. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ vs NOSr.

En la figura 20 se muestran los cambios en la actividad nNOS en presencia de las quinazolonas estudiadas, siendo el compuesto QFF-350 el compuesto con mayor inhibición sobre la actividad nNOS.

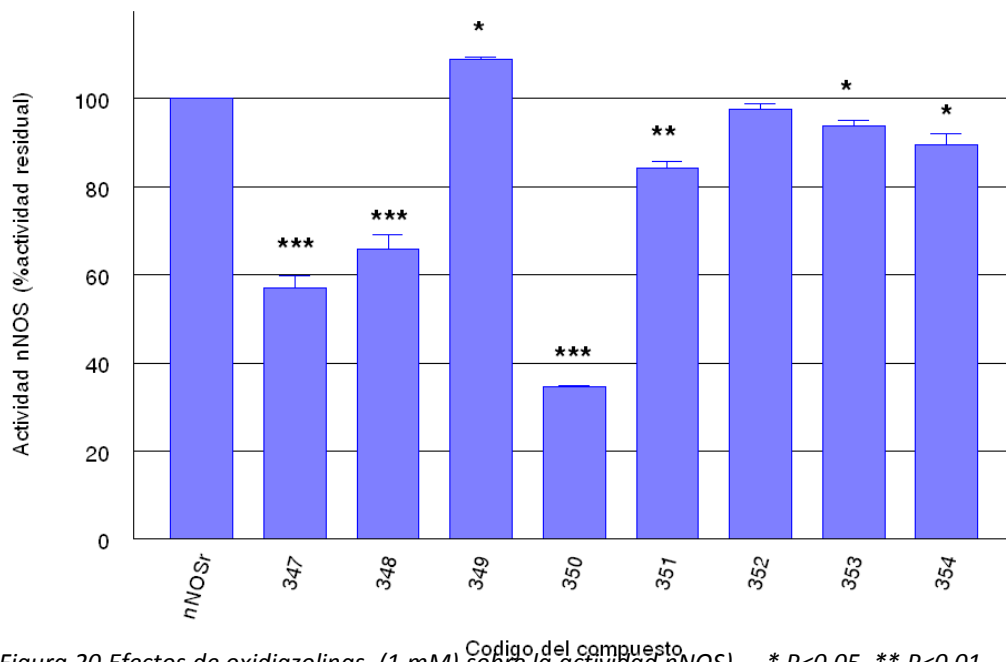


Figura 20 Efectos de oxidiazolinas (1 mM) sobre la actividad nNOS. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ vs NOSr.

1.8 SERIE DE LAS PIRAZOLINAS.

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

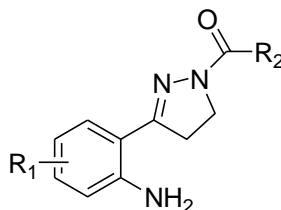


Tabla 9. Porcentajes de actividad residual iNOS y nNOS de las pirazolininas ensayadas.

Código	R ₁	R ₂	pm	% residual iNOS	% residual nNOS
QFF-124	5-OMe	Ph	295.34	12.18 ± 0.55	58.91 ± 2.04
QFF-370	5-Cl	CH ₂ Ph	313.5	68.63 ± 2.43	81.76 ± 2.35
QFF-371	5-Cl	CH ₂ CH ₂ Ph	315.5	84.47 ± 0.23	67.64 ± 3.23
QFF-372	4,5-di-Cl	c-C ₃ H ₅	286	85 ± 1.58	49.52 ± 3.12
QFF-373	5-OMe	CH ₂ Ph	297	78.81 ± 1.33	113.28 ± 2.03
QFF-374	5-OMe	CH ₂ CH ₂ Ph	311	74.79 ± 1.38	74.07 ± 2.04
QFF-375	4,5-di-OMe	c-C ₃ H ₅	277	79 ± 2.38	80.35 ± 1.23
QFF-376	4,5-di-OMe	CH ₂ Ph	327	76.28 ± 1.04	64.93 ± 0.32
QFF-377	4,5-di-OMe	CH ₂ CH ₂ Ph	341	69.93 ± 3.21	44.67 ± 0.21
QFF-378	4,5,6-tri-OMe	c-C ₃ H ₅	308	76.61 ± 3.23	104.05 ± 1.25
QFF-379	4,5,6-tri-OMe	CH ₂ Ph	358	81.71 ± 4.74	51.64 ± 2.87
QFF-380	4,5,6-tri-OMe	CH ₂ CH ₂ Ph	372	65.38 ± 1.73	17.55 ± 3.26

La figura 21 muestra como todos los compuesto presentan capacidad para inhibir la actividad iNOS, destacando el compuesto QFF-124 con una inhibición cercana al 90%.

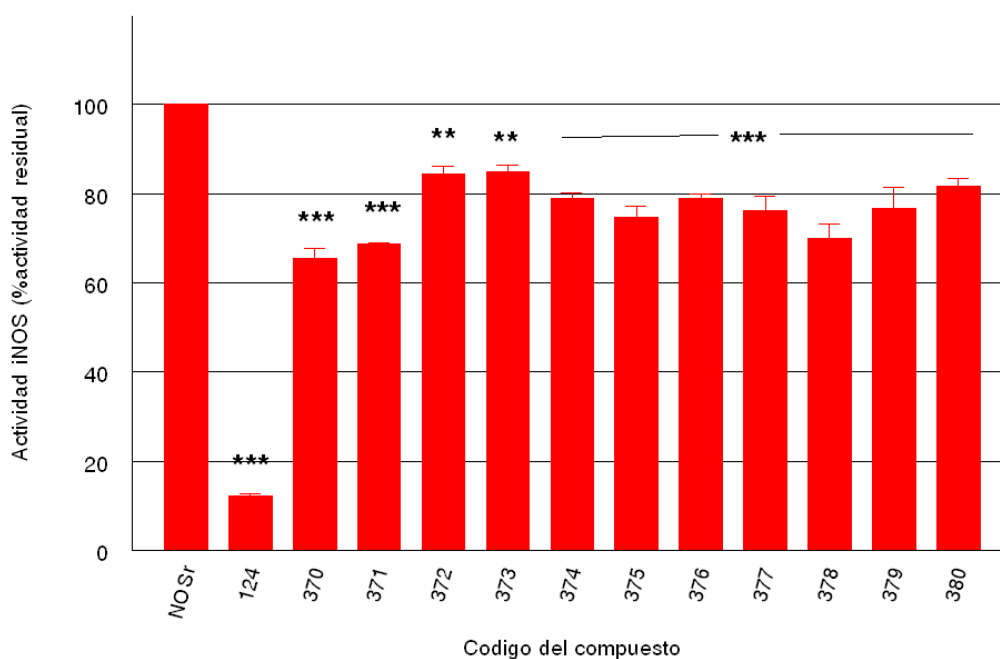


Figura 21. Efectos de pirazolinas (1 mM) sobre la actividad iNOS. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ vs NOSr.

La figura 22 muestra la existencia de compuestos con diferente grado de inhibición de la actividad nNOS; destacando así entre las mejores, las pirazolinas QFF-372, QFF-377 y QFF-379 en menor proporción, y finalmente la máxima inhibición con QFF-380.

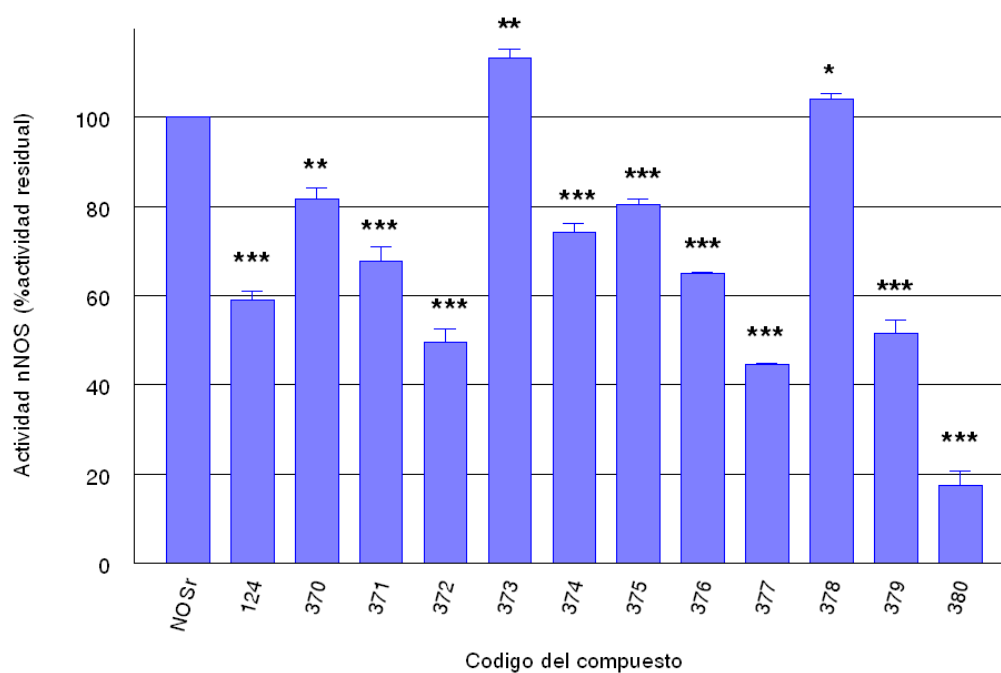


Figura 22. Efectos de pirazolinas (1 mM) sobre la actividad nNOS. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ vs NOSr.

1.9 SERIE DE DERIVADOS BICÍCLICOS.

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

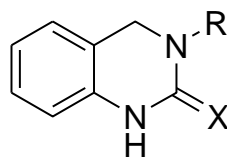


Tabla 10. Porcentajes de actividad residual iNOS y nNOS de los derivados bicíclicos ensayadas.

Código	X	R	pm	% residual iNOS	% residual nNOS
QFF-401	S	COCH ₃	206.05	50.42 ± 2.48	85.58 ± 1.98
QFF-402	O	COCH ₃	190.07	81.87 ± 3.87	90.34 ± 1.23
QFF-403	NH	CH ₃	161.1	44.58 ± 3.29	54.98 ± 1.76
QFF-404	O	CH ₃	162.08	43.19 ± 1.93	32.09 ± 0.45
QFF-407	O	CH ₂ CH ₂ CH ₃	190.11	43.41 ± 3.45	97.79 ± 1.33
QFF-408	NH	CH ₂ CH ₂ CH ₃	189.13	76.43 ± 2.33	152.73 ± .38
QFF-409	O	c-C ₄ H ₉	202.11	44.68 ± 1.23	67.98 ± 2.38

La figura 23 muestra los efectos de esta serie de derivados bicíclicos sobre la actividad iNOS y donde destacan por su potente efecto inhibitor los compuestos QFF-401, QFF-403, QFF-404, QFF-407 y QFF-409.

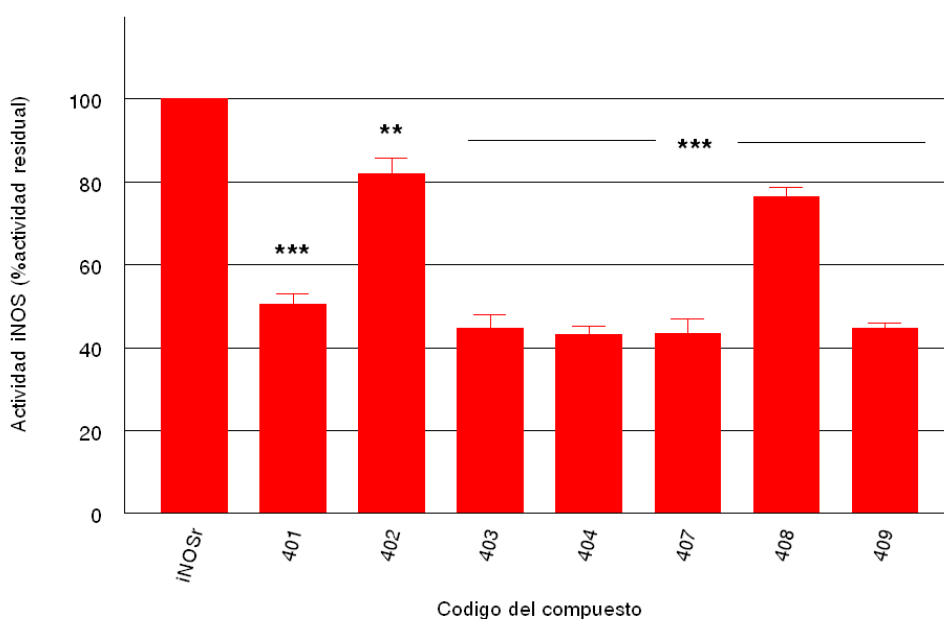


Figura 23. Efectos de los derivados bicíclicos (1 mM) sobre la actividad iNOS.

* $P < 0.05$, * $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ vs control.

En la figura 24 se encuentra representado el efecto de estos compuestos en la actividad nNOS. Los derivados QFF-403 y más especialmente el compuesto QFF-404, presentan un alto grado de inhibición de la isoforma neuronal, mientras que el QFF-408 parece potenciar la actividad del enzima.

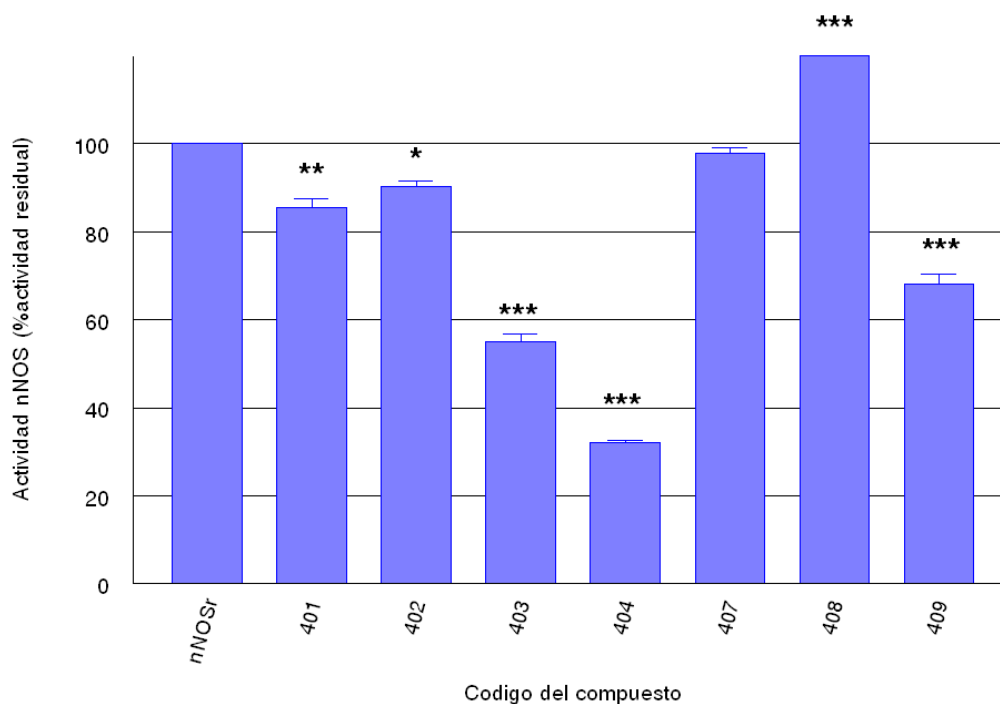


Figura 24. Efectos de los derivados bicíclicos (1 mM) sobre la actividad nNOS. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ vs control.

1.10 SERIE DE DERIVADOS TRICÍCLICOS:

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

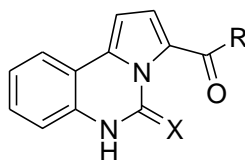


Tabla 11. Porcentajes de actividad residual iNOS y nNOS de los derivados tricíclicos ensayadas.

Código	X	R	pm	% residual iNOS	% residual nNOS
QFF-405	O	OEt	256.08	85.83 ± 0.56	21.21 ± 0.23
QFF-406	O	NHCH ₃	241.09	84.2 ± 3.63	67.98 ± 1.58

La figura 25 muestra la incapacidad de estos compuestos para inhibir la actividad iNOS de forma muy significativa. Sin embargo, la gráfica de la derecha muestra como ambos derivados inhiben la actividad nNOS, siendo el compuesto QFF-405 el que presenta mayor inhibición.

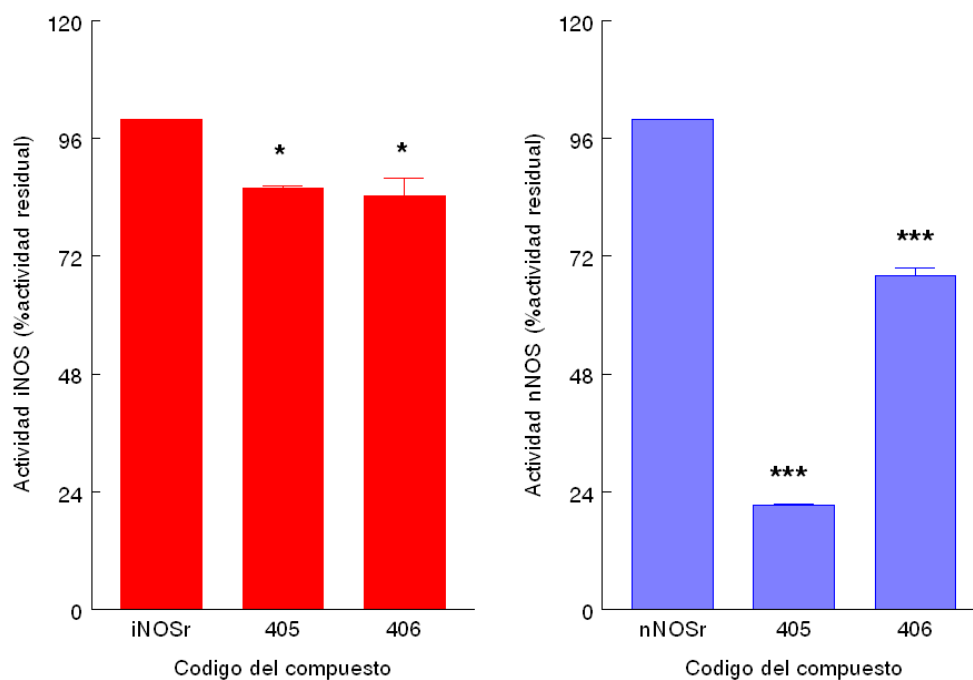


Figura 25. Efectos de los derivados tricíclicos QFF-405 y QFF-406 (1 mM) sobre la actividad iNOS (a la izquierda) y nNOS (a la derecha). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ vs NOSr.

1.11 SERIE DE TIADIAZOLINAS OXIDADAS.

En la tabla 26 se representa la estructura química y los sustituyentes R de esta serie de tiadiazolinas oxidadas, así como los porcentajes de actividad residual encontrados sobre la actividad iNOS y nNOS recombinantes.

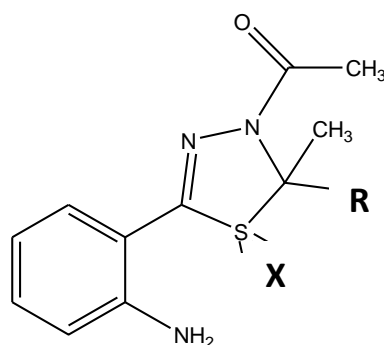


Tabla 12. Porcentajes de actividad residual iNOS y nNOS de las tiadiazolinas oxidadas ensayadas.

Código	X	R	pm	% residual iNOS	% residual nNOS
QFF-421	O	CH ₃	265.33	77.95 ± 1.93	93.91 ± 1.04
QFF-422	O2	CH ₃	281.33	93.83 ± 2.98	66.68 ± 3.21
QFF-423	-	Ph	311.40	89.43 ± 3.28	60.75 ± 3.2
QFF-424	O	Ph	327.40	78.8 ± 3.85	143.67 ± 3.3
QFF-425	O2	Ph	343.40	90.04 ± 3.47	110.54 ± 2.13
QFF-426	-	CH ₂ CH ₃	263.35	80.16 ± 2.47	113.82 ± 2.43

La figura 26 muestra los cambios en la actividad iNOS en presencia de estas tiadiazolinas oxidadas. Como se puede observar, todos los compuestos inhiben significativamente al enzima iNOS aunque el mayor grado de inhibición sólo ronda el 20% en los casos QFF-421, QFF-424 y QFF-426.

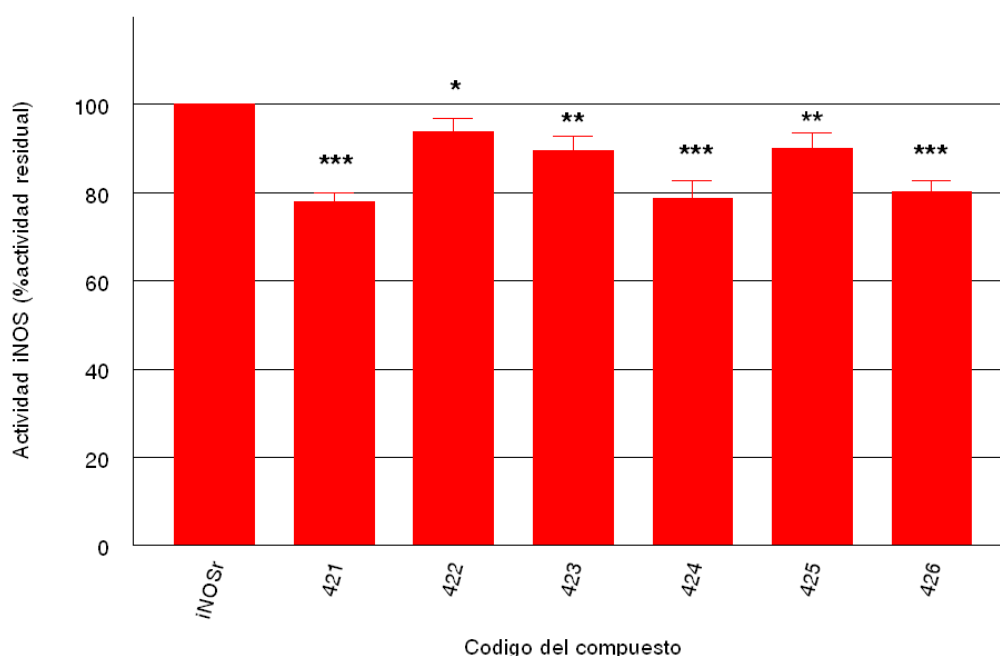


Figura 26. Efectos de las tiadiazolinas oxidadas (1 mM) sobre la actividad iNOS. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ vs control.

Sin embargo en la figura 27 se observan tres subgrupos que ejercen distinto efecto sobre la actividad nNOS. Como se puede observar, el compuesto QFF-421 no ejerce gran efecto sobre la actividad nNOS, seguidamente, los compuestos QFF-422 y QFF-423 presentan una inhibición entre el 30 y el 40%, y por último, los compuestos QFF-424, QFF-425 y QFF-426 potencian significativamente la actividad nNOS.

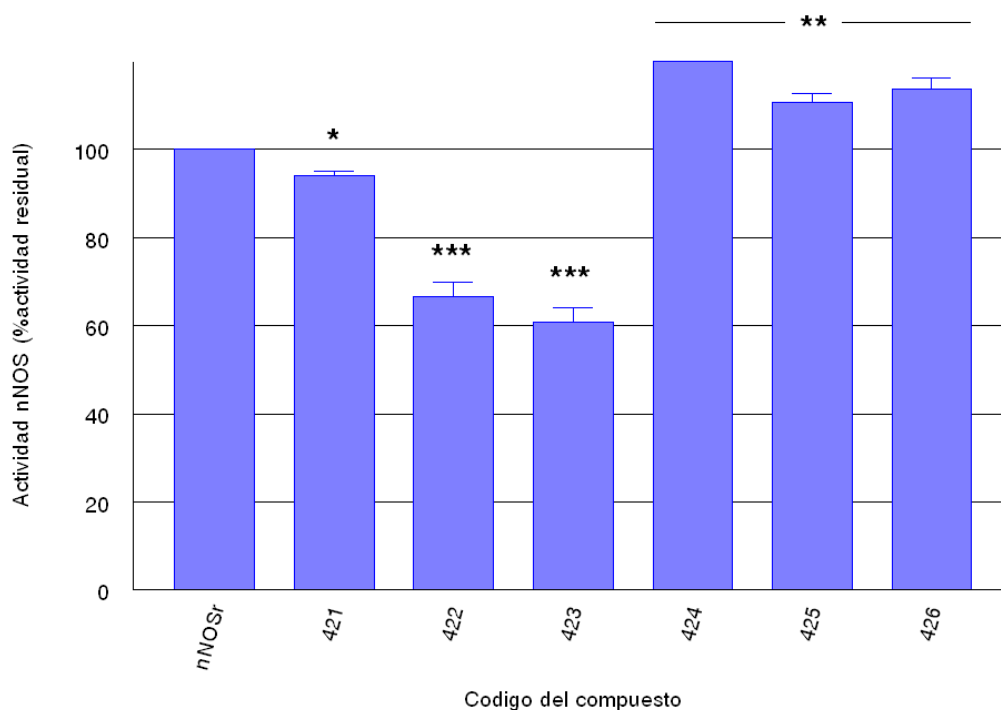


Figura 27. Efectos de las tiadiazolinas oxidadas (1 mM) sobre la actividad nNOS. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ vs control.

1.12 SERIE DE KINURENAMINAS CON RESTOS DE UREA

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

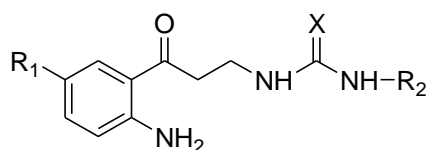


Tabla 13. Porcentajes de actividad residual iNOS y nNOS de las Kinurenaminas con restos de urea ensayadas.

Código	X	R ₁	R ₂	pm	% residual iNOS	% residual nNOS
QFF-451	O	OCH ₃	Et	265.14	77.92± 1.57	133.34± 1.58
QFF-452	S	OCH ₃	Et	281.12	82.21± 4.74	59.7± 0.32
QFF-453	S	H	Et	251.11	54.17± 1.73	87.07± 3.45

La figura 28 muestra los cambios en la actividad iNOS en presencia de estas Kinurenaminas con restos de urea. Destaca el grado de inhibición que alcanza el compuesto QFF-453, próximo al 50%.

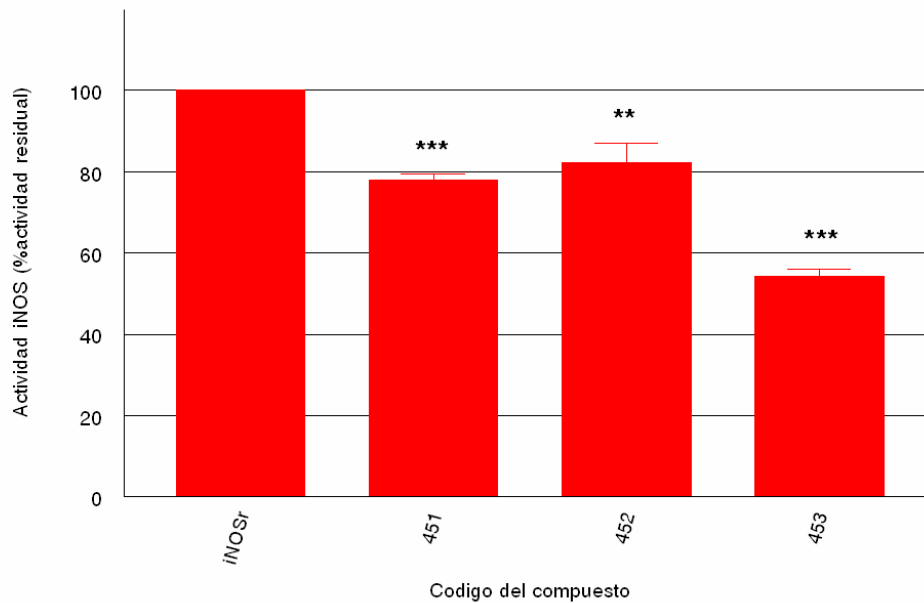


Figura 28. Efectos de las Kinurenaminas con restos de urea (1 mM) sobre la actividad iNOS. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ vs control.

En la figura 29 nuevamente podemos observar dos subgrupos constituidos por un compuesto capaz de incrementar la actividad nNOS (QFF-451), y dos compuestos que la inhiben (QFF-452 y QFF-453 en menor medida).

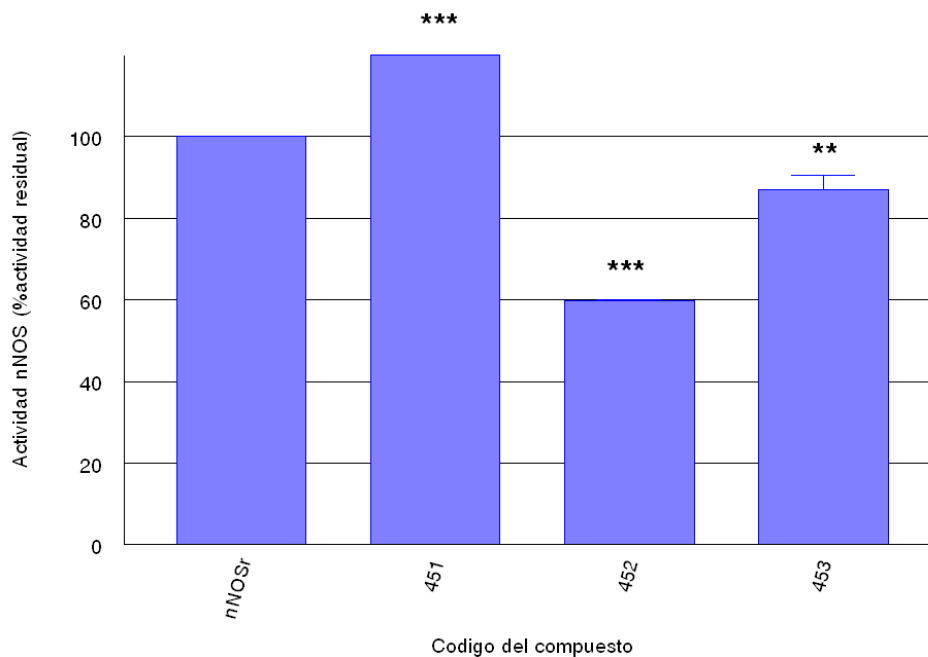


Figura 29. Efectos de las Kinurenaminas con restos de urea (1 mM) sobre la actividad nNOS. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ vs control.

1.13 CLASIFICACIÓN COMPUESTOS POR MAYOR GRADO DE INHIBICIÓN DE LA nNOS.*(Tablas 31,32, 33,34 y 35)*

75-100%			30-50%		
Compuesto	Familia	% Inhibición iNOS	Compuesto	Familia	% Inhibición iNOS
4	Indol	98.68 ± 0.12	QFF-401	Bicíclico	49.58 ± 2.48
10	Indol	95.56 ± 1.09	35	Indol	49.56 ± 3.21
9	Indol	91.99 ± 0.89	29	Indol	48.92 ± 2.12
24	Indol	91.03 ± 1.64	20	Indol	48.07 ± 1.43
QFF-425	Tiadiaz. Oxidada	9.96 ± 3.47	QFF-305	Tiadiazolina	47.2 ± 0.54
18	Indol	89.34 ± 1.43	32	Indol	46.15 ± 2.93
21	Indol	89.13 ± 0.93	QFF-453	Kinurenaminas	45.83 ± 1.73
QFF-124	Pirazolina	87.82 ± 0.55	36	Indol	43.66 ± 3.76
11	Indol	80.07 ± 1.22	QFF-306	Tiadiazolina	42.89 ± 1.04
QFF-329	Pirrol sin NH ₃	8.97 ± 2.03	QFF-301	Tiadiazolina	42.84 ± 2.33
23	Indol	8.23 ± 1.42	31	Indol	42 ± 2.00
5	Indol	77.41 ± 0.23	34	Indol	40.72 ± 2.92
			QFF 346	Oxidiazolina	40.28 ± 1.89
			QFF-310	Tiadiazolina	38.91 ± 2.03
			27	Indol	38.73 ± 2.04
			QFF-320	Tiadiazolina	38.3 ± 1.76
			QFF-335	Pirrol sin NH ₃	37.68 ± 2.87
			QFF 344	Oxidiazolina	37.63 ± 1.33
			QFF-330	Pirrol sin NH ₃	37.58 ± 2.04
			QFF-313	Tiadiazolina	37.58 ± 0.32
			QFF-338	Pirrol ácido	37.47 ± 1.98
			QFF-303	Tiadiazolina	35.79 ± 1.65
			QFF 345	Oxidiazolina	34.98 ± 2.32
			QFF-304	Tiadiazolina	34.79 ± 0.64
			QFF-370	Pirazolina	34.62 ± 2.43
			QFF-337	Pirrol sin NH ₃	33.98 ± 3.26
			QFF-347	Quinazolona	32.81 ± 1.37
			QFF-318	Tiadiazolina	32.24 ± 1.98
			QFF 341	Oxidiazolina	32.2 ± 0.45
			QFF 342	Oxidiazolina	31.38 ± 0.23
			QFF-371	Pirazolina	31.37 ± 0.23
			QFF-311	Tiadiazolina	31.24 ± 2.04
			QFF-307	Tiadiazolina	30.69 ± 2.35
			QFF-317	Tiadiazolina	30.4 ± 3.26
			QFF-322	Tiadiazolina	30.37 ± 0.23
			QFF-378	Pirazolina	30.07 ± 3.23

50- 75%		
Compuesto	Familia	% Inhibición iNOS
6	Indol	74.27 ± 0.56
7	Indol	69.22 ± 0.6
QFF-314	Tiadiazolina	67.17 ± 0.21
QFF-321	Tiadiazolina	67.07 ± 0.45
25	Indol	62.59 ± 1.89
QFF-349	Quinazolona	6.4 ± 1.03
QFF-422	Tiadiaz. Oxidada	6.17 ± 2.98
QFF-404	Bicíclico	56.81 ± 1.93
QFF-409	Bicíclico	56.59 ± 1.23
QFF-403	Bicíclico	55.42 ± 3.29
QFF-406	Tricíclico	55.32 ± 3.63
19	Indol	55.11 ± 1.41

< 30 %		
Compuesto	Familia	% Inhibición iNOS
QFF-302	Tiadiazolina	29.99 ± 1.23
QFF-205	Pirrol	29.28 ± 2.78
QFF-326	Tiadiazolina	29.28 ± 2.38
QFF-316	Tiadiazolina	29.25 ± 2.87
QFF-312	Tiadiazolina	28.61 ± 1.23
QFF 340	Oxidiazolina	28.41 ± 1.76
QFF-324	Tiadiazolina	28.34 ± 1.33
QFF-308	Tiadiazolina	27.26 ± 3.23
QFF-339	Pirrol amida	27.22 ± 1.23
QFF-323	Tiadiazolina	26.81 ± 1.58
QFF-375	Pirazolina	25.21 ± 2.38
QFF-331	Pirrol sin NH ₃	24.65 ± 1.23
QFF-332	Pirrol sin NH ₃	24.19 ± 0.32
QFF-377	Pirazolina	23.72 ± 3.21
QFF-405	Tricíclico	23.57 ± 0.56
QFF-379	Pirazolina	23.39 ± 4.74
QFF-334	Pirrol sin NH ₃	22.6 ± 1.25
26	Indol	22.58 ± 1.63
QFF-212	Pirrol	22.15 ± 1.70
QFF-327	Tiadiazolina	22.15 ± 1.04
QFF-451	Kinurenaminas	22.08 ± 1.57
QFF-421	Tiadiaz. Oxidada	22.05 ± 1.93
QFF-315	Tiadiazolina	22 ± 1.25
QFF-319	Tiadiazolina	21.83 ± 1.23

< 30 %		
Compuesto	Familia	% Inhibición iNOS
QFF-424	Tiadiaz. Oxidada	21.2 ± 3.85
QFF-374	Pirazolina	21.19 ± 1.38
QFF-325	Tiadiazolina	21.16 ± 1.38
QFF-376	Pirazolina	21 ± 1.04
QFF-426	Tiadiaz. Oxidada	19.84 ± 2.47
QFF-348	Quinazolona	19.81 ± 0.43
QFF-350	Quinazolona	19.61 ± 1.73
QFF-352	Quinazolona	18.93 ± 3.87
QFF-351	Quinazolona	18.46 ± 2.48
QFF-380	Pirazolina	18.29 ± 1.73
QFF-402	Bicíclico	18.13 ± 3.87
QFF-452	Kinurenaminas	17.79 ± 4.74
QFF-309	Tiadiazolina	17.32 ± 3.12
28	Indol	16.31 ± 1.93
QFF-408	Bicíclico	15.8 ± 2.33
QFF-372	Pirazolina	15.53 ± 1.58
QFF-373	Pirazolina	15 ± 1.33
QFF-407	Bicíclico	14.17 ± 3.45
QFF-333	Pirrol sin NH ₃	12.03 ± 0.21
QFF-328	Pirrol sin NH ₃	11.7 ± 3.12
QFF-423	Tiadiaz. Oxidada	10.57 ± 3.28
QFF-353	Quinazolona	-3.68 ± 3.29
QFF-354	Quinazolona	-13.5 ± 4.23

1.14 CLASIFICACIÓN COMPUESTOS POR MAYOR GRADO DE INHIBICIÓN DE LA nNOS.*(Tablas 36, 37, 38, 39 y 40)*

75-100%		
Compuesto	Familia	% Inhibición nNOS
9	Indol	90.02 ± 2.68
10	Indol	85.41 ± 1.38
QFF-380	Pirazolina	82.45 ± 3.26
QFF-407	Bicíclico	78.79 ± 1.33

50- 75%		
Compuesto	Familia	% Inhibición nNOS
11	Indol	69.9 ± 2.84
QFF-404	Bicíclico	67.91 ± 0.45
QFF-350	Quinazolona	65.32 ± 0.23
7	Indol	58.4 ± 2.12
21	Indol	57.08 ± 3.65
QFF-377	Pirazolina	55.33 ± 0.21
QFF 346	Oxidiazolina	55.11 ± 1.25
6	Indol	52.07 ± 2.2
QFF-372	Pirazolina	50.48 ± 3.12

30-50%		
Compuesto	Familia	% Inhibición nNOS
QFF 345	Oxidiazolina	48.78 ± 0.21
QFF-379	Pirazolina	48.36 ± 2.87
QFF-304	Tiadiazolina	46.58 ± 1.58
QFF-312	Tiadiazolina	45.08 ± 0.34
QFF-403	Bicíclico	45.02 ± 1.76
4	Indol	43.32 ± 0.32
QFF-347	Quinazolona	43.08 ± 2.87
QFF-124	Pirazolina	41.09 ± 2.04
QFF 340	Oxidiazolina	41.08 ± 3.12
QFF-452	Kinurenaminas	40.3 ± 0.32
QFF-423	Tiadiaz. Oxidada	39.25 ± 3.2
QFF-310	Tiadiazolina	39.18 ± 1.03
QFF-306	Tiadiazolina	38.27 ± 2.32
QFF 342	Oxidiazolina	36.5 ± 2.04
QFF-305	Tiadiazolina	35.2 ± 0.32
QFF-376	Pirazolina	35.07 ± 0.32
QFF-309	Tiadiazolina	34.22 ± 0.43
QFF-348	Quinazolona	34.18 ± 3.26
QFF-328	Pirrol sin NH ₃	33.78 ± 0.54
5	Indol	33.7 ± 1.23
QFF-422	Tiadiaz. Oxidada	33.32 ± 3.21
QFF-321	Tiadiazolina	32.48 ± 1.93
QFF-371	Pirazolina	32.36 ± 3.23
QFF-406	Tricíclico	32.02 ± 1.58
QFF-408	Bicíclico	32.02 ± 1.38
19	Indol	31.43 ± 2.75

< 30 %			< 30 %		
Compuesto	Familia	% Inhibición nNOS	Compuesto	Familia	% Inhibición nNOS
QFF-302	Tiadiazolina	29.5 ± 2.13	QFF-353	Quinazolona	6.26 ± 1.38
QFF 344	Oxidiazolina	28.01 ± 0.32	QFF-421	Tiadiaz. Oxidada	6.09 ± 1.04
QFF-333	Pirrol sin NH ₃	26.77 ± 1.65	36	Indol	5.56 ± 1.04
QFF-311	Tiadiazolina	26.28 ± 2.04	31	Indol	5.45 ± 2.34
QFF-374	Pirazolina	25.93 ± 2.04	35	Indol	5.09 ± 1.33
QFF-331	Pirrol sin NH ₃	25.69 ± 3.23	QFF-318	Tiadiazolina	5.03 ± 2.48
QFF-303	Tiadiazolina	24.26 ± 2.43	QFF-330	Pirrol sin NH ₃	4.68 ± 2.35
QFF-301	Tiadiazolina	23.67 ± 3.3	QFF-332	Pirrol sin NH ₃	4.54 ± 3.12
QFF-314	Tiadiazolina	22.13 ± 1	QFF-319	Tiadiazolina	3.2 ± 3.87
QFF-317	Tiadiazolina	21.82 ± 1.73	QFF-320	Tiadiazolina	2.63 ± 3.29
32	Indol	19.65 ± 2.4	30	Indol	2.54 ± 3.2
QFF-375	Pirazolina	19.65 ± 1.23	QFF-352	Quinazolona	2.47 ± 1.33
QFF-335	Pirrol sin NH ₃	19.01 ± 0.54	QFF-409	Biciclico	2.21 ± 2.38
23	Indol	18.93 ± 2.47	18	Indol	2.12 ± 3.22
QFF-370	Pirazolina	18.24 ± 2.35	25	Indol	1.77 ± 3.32
QFF-337	Pirrol sin NH ₃	17.69 ± 1.04	27	Indol	1.21 ± 3.29
QFF-308	Tiadiazolina	17.64 ± 1.37	QFF-338	Pirrol ácido	0.88 ± 2.35
QFF-351	Quinazolona	15.89 ± 1.58	QFF-205	Pirrol	0.61 ± 0.21
QFF-329	Pirrol sin NH ₃	15.24 ± 1.04	QFF-326	Tiadiazolina	0.61 ± 2.47
24	Indol	14.93 ± 3.29	QFF-325	Tiadiazolina	-3.03 ± 3.47
QFF-401	Biciclico	14.42 ± 1.98	QFF-378	Pirazolina	-4.05 ± 1.25
QFF-307	Tiadiazolina	13.9 ± 1.89	QFF-315	Tiadiazolina	-4.24 ± 3.23
QFF 343	Oxidiazolina	13.32 ± 1.23	QFF-324	Tiadiazolina	-4.84 ± 3.85
29	Indol	13.27 ± 2.97	QFF-313	Tiadiazolina	-5.03 ± 4.23
QFF-339	Pirrol amida	13.11 ± 3.23	QFF-323	Tiadiazolina	-6.13 ± 3.28
QFF 341	Oxidiazolina	13.11 ± 2.03	QFF-334	Pirrol sin NH ₃	-6.72 ± 0.64
QFF-453	Kinurenaminas	12.93 ± 3.45	QFF-349	Quinazolona	-8.97 ± 0.45
28	Indol	12.09 ± 3.2	QFF-316	Tiadiazolina	-9.84 ± 4.74
20	Indol	11.1 ± 3.29	QFF-425	Tiadiaz. Oxidada	-10.54 ± 2.13
34	Indol	11.09 ± 1.92	QFF-373	Pirazolina	-13.28 ± 2.03
QFF-354	Quinazolona	10.46 ± 2.38	QFF-426	Tiadiaz. Oxidada	-13.82 ± 2.43
33	Indol	10.21 ± 1.2	QFF-451	Kinurenaminas	-33.34 ± 1.58
QFF-402	Biciclico	9.66 ± 1.23	QFF-424	Tiadiaz. Oxidada	-43.67 ± 3.3
QFF-212	Pirrol	9.03 ± 3.19	QFF-405	Tricíclico	-52.73 ± 0.23
QFF-327	Tiadiazolina	9.03 ± 1.57			
26	Indol	6.34 ± 4.2			
QFF-322	Tiadiazolina	6.32 ± 2.98			

1.15 COMPUESTOS CON INHIBICIÓN SELECTIVA.

En la siguiente figura (Figura 30) se destacan los compuestos que mayor efecto selectivo sobre la actividad iNOS (izquierda) actuando, bien como inhibidores de la isoforma que correspondería con los compuestos 4, 5, 18, 24, QFF-124, QFF-205, QFF-212, QFF-321, QFF-343, QFF-408 y QFF-424; o potenciando la nNOS como son los compuestos QFF-205, QFF-408 y QFF-424; y los compuestos con mayor inhibición selectiva sobre la actividad nNOS, correspondiente a los compuestos QFF-346, QFF-350, QFF-372, QFF-377, QFF-380 y QFF-405.

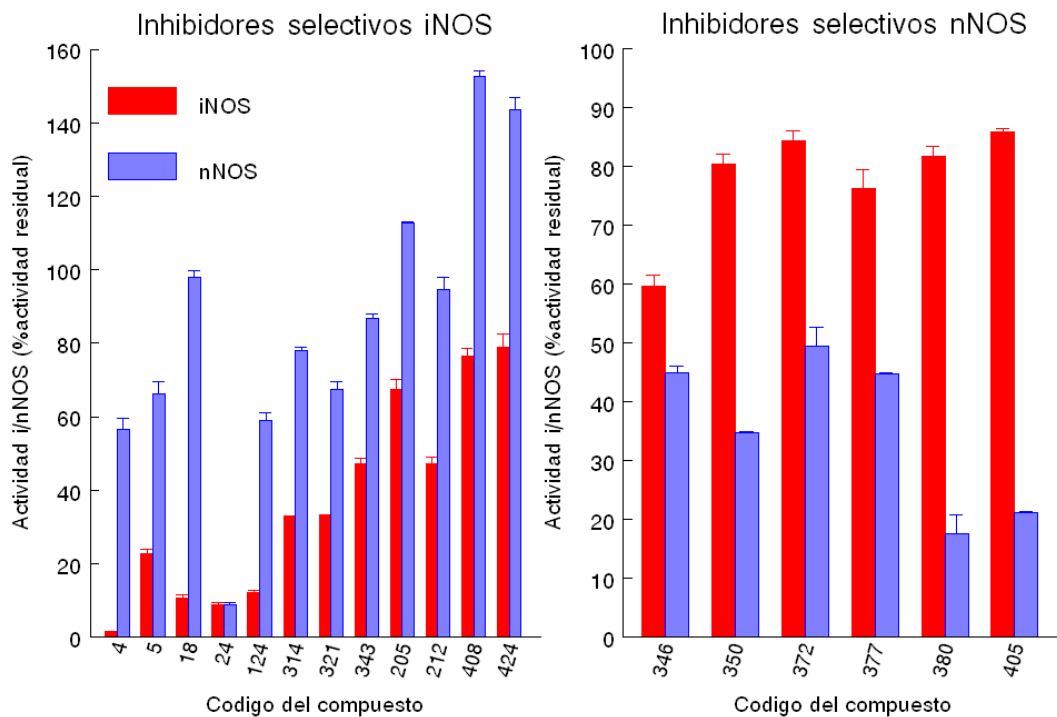


Figura 30. Representación de los compuestos con mayor inhibición selectiva sobre la forma inducible iNOS (a la izquierda) y representación de los compuestos con mayor inhibición selectiva sobre la forma constitutiva nNOS (a la derecha).

2. RESULTADOS 'IN VIVO'

La producción de NO[•] en la EP, así como el daño producido en la CTE pueden provocar un incremento del estrés oxidativo mitocondrial, dañándose los componentes mitocondriales como proteínas, lípidos y ADN. Para comprobar esta hipótesis, hemos analizado distintos parámetros relacionados, como son la actividad del complejo I de la CTE, la actividad del enzima NOS (tanto citosólica como mitocondrial) y el estrés oxidativo, concretamente la oxidación de los lípidos de membrana (LPO). En la tabla 41 se muestran los compuestos seleccionados para el estudio 'in vivo', que se encuentran dentro del grupo que presenta un mayor grado de inhibición del componente inducible de la NOS.

Tabla 41. Compuestos enzayados "in vivo"

Código	Familia	R	R ₁	% residual iNOS	% residual nNOS
QFF-124	Pirazolina	5-OMe	Ph	12.18 ± 0.55	58.91 ± 2.04
QFF-205	Pirrol	CH ₃	H	67.32 ± 2.78	112.79 ± 0.21
QFF-212	Pirrol	Ph	H	47.21 ± 1.70	94.64 ± 3.19

2.1 Actividad del complejo I de la CTE.

Para los estudios 'in vivo', se ha evaluado la pirazolina QFF-124 y los pirroles QFF-205 y QFF-212 descritos anteriormente en las tablas 9 y 4 respectivamente.

Los efectos generados por el MPTP son contrarrestados por los compuestos sintéticos. La pirazolina QFF-124 actúa recuperando los valores controles tras la administración de MPTP, incluso mejorándolos, tanto en la SN (14.07 ± 0.171 versus 5.17 ± 0.54 nmol/min/mg prot, $P < 0.001$) y de igual manera, pero en menor proporción, en el ST (10.86 ± 0.33 versus 5.59 ± 0.4 nmol/min/mg prot, $P < 0.001$) (Figura 31).

Por otro lado, los efectos generados por el MPTP son también contrarrestados por los pirroles QFF-205 y QFF-212 (aunque la aMT lo hace de forma más significativa respecto a estos compuestos), que actúan recuperando los valores controles, principalmente en la SN (9.63 ± 0.34 , 11.87 ± 0.28 nmol/min/mg prot respectivamente versus 5.17 ± 0.54 nmol/min/mg prot, $P < 0.001$) y en menor proporción en el ST (8.36 ± 0.65 y 8.81 ± 0.33 nmol/min/mg prot respectivamente, versus 5.59 ± 0.4 nmol/min/mg prot, $P < 0.05$ para el primero y $P < 0.001$ para el segundo) (Figura 31).

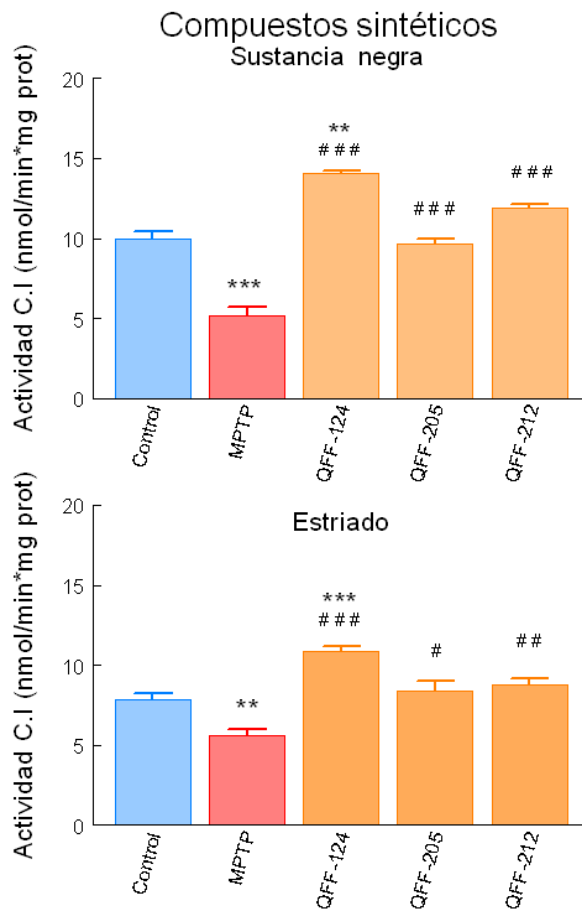


Figura 31. Cambios en la actividad del complejo I de la CTE según los distintos compuestos ensayados, tanto en la SN como en el ST de ratones C57/Bl6. Los datos se corresponden a la media \pm EE de 2 animales por grupo, por triplicado cada experimento. * $P < 0.05$ y ** $P < 0.01$ vs control; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ y ### $P < 0.001$ vs MPTP.

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

2.2.1 Sustancia Negra.

En el citosol la iNOS es prácticamente indetectable en ratones control, pero tras el tratamiento con MPTP aumenta de forma significativa, fundamentalmente en la SN (29.37 ± 0.683 versus 2.825 ± 0.098 pmol/min/mg prot, $P < 0.001$). La administración de los compuestos pirazolina QFF-124 y los pirroles QFF-205 y QFF-212, reduce significativamente la actividad iNOS estimulada por el MPTP (15.86 ± 1.38 , 9.29 ± 0.34 y 7.5 ± 0.27 pmol/min/mg prot respectivamente, $P < 0.01$ y $P < 0.001$).

Por otro lado, la neurotoxina afecta significativamente la actividad nNOS en el citosol de la SN disminuyendo su actividad (95.442 ± 0.864 versus 76.23 ± 0.378 pmol/min/mg prot); pero la administración de los compuestos estudiados reduce aún más significativamente este valor de actividad nNOS, incluso por debajo de los valores control (26.66 ± 0.9 , 63.84 ± 1.4 y 74 ± 0.26 pmol/min/mg prot para los QFF-124, QFF-201 y QFF-212 respectivamente, $P < 0.05$, $P < 0.01$ y $P < 0.001$). (Figura 32, arriba)

Cuando medimos la actividad NOS en fracciones mitocondriales puras, detectamos dos actividades diferentes, correspondientes a una isoforma constitutiva, Ca^{2+} -dependiente (mtNOS) y a una isoforma inducible, Ca^{2+} -independiente (i-mtNOS)

(Figura 32, abajo). El MPTP conlleva a un incremento de la actividad i-mtNOS en la SN (22.084 ± 0.12 versus 44.67 ± 0.18 pmol/min/mg prot, $P < 0.001$), mientras que el tratamiento con la pirazolina QFF-124 y los pirroles QFF-205 y QFF-212 normaliza la actividad i-mtNOS incluso por debajo de la actividad inducible encontrada en el control (18.35 ± 1.385 , 8.4 ± 0.05 y 5.91 ± 0.68 pmol/min/mg prot respectivamente, $P < 0.01$ y $P < 0.001$). Sin embargo, la c-mtNOS no se ve afectada por el tratamiento con MPTP (28.64 ± 0.62 versus 25.86 ± 0.54 pmol/min/mg prot). Por su parte, los compuestos QFF-205 y QFF-212 reducen significativamente la actividad c-mtNOS (10.14 ± 0.53 y 14.51 ± 2.27 pmol/min/mg prot respectivamente, $P < 0.01$ y $P < 0.001$) mientras que el compuesto QFF-124 no afecta al valor control (10.82 ± 0.49 pmol/min/mg prot).

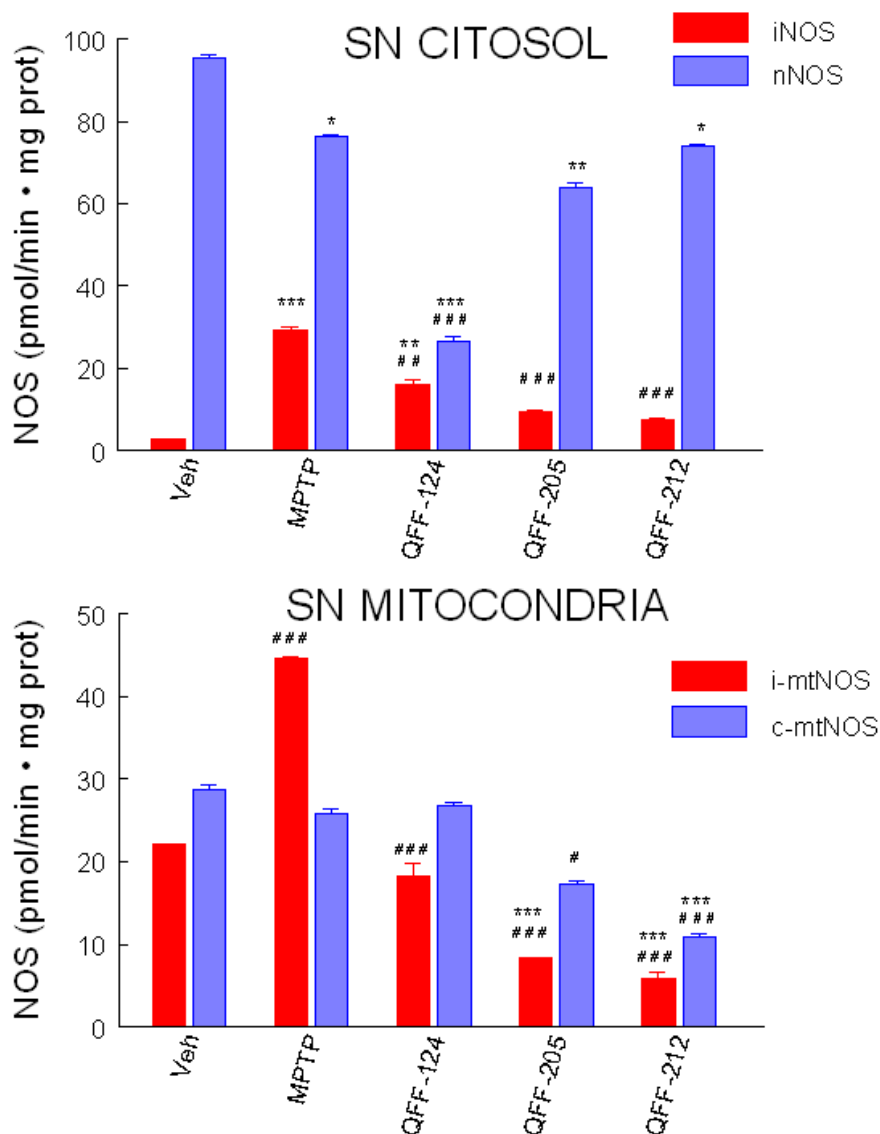


Figura 32. Cambios en la actividad de los componentes constitutivo e inducible de la NOS según los distintos compuestos ensayados, tanto en el citosol (arriba) como en la mitocondria (abajo) de la SN de ratones C57/Bl6. Los datos se corresponden a la media \pm EE de 6 animales por grupo, por triplicado cada experimento. * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ vs control; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ y ### $P < 0.001$ vs MPTP.

2.2.2 Estriado.

La figura 33 muestra también la actividad NOS en el citosol y en la mitocondria del ST de ratones C57/Bl6. Ni el MPTP ni el tratamiento con compuestos QFF-124, QFF-205 y QFF-212 modifican la actividad iNOS citosólica (Veh, 3.80 ± 0.28 ; MPTP, 5.35 ± 0.19 ; QFF-124, 3.3 ± 0.31 ; QFF-205 2.83 ± 0.8 y QFF-215, 3.6 ± 0.27 pmol/min/mg prot).

Pero el tratamiento con MPTP produce un incremento significativo en la actividad nNOS citosólica (85.68 ± 0.32 versus 95.31 ± 0.26 pmol/min/mg prot, $P < 0.05$), la cual se ve reducida significativamente después de la administración del compuesto QFF-124 (37.5 ± 0.3 pmol/min/mg prot, $P < 0.001$) y en menor medida por los pirroles QFF-205 y QFF-212 (82.5 ± 0.26 y 72.61 ± 0.23 pmol/min/mg prot respectivamente, $P < 0.05$) por debajo de los valores control (Figura 33, arriba).

En las mitocondrias estriatales, el MPTP induce un aumento en la actividad i-mtNOS (18.796 ± 0.182 versus 25.71 ± 0.629 pmol/min/mg prot, $P < 0.01$), el cual es contrarrestado tanto por la administración de la pirazolina QFF-214 como por los diferentes pirroles QFF-205 y QFF-212 (12.5 ± 0.07 , 11.28 ± 0.22 y 7.19 ± 0.09 pmol/min/mg prot respectivamente, $P < 0.05$, $P < 0.01$ y $P < 0.001$). El tratamiento con MPTP también reduce la actividad c-mtNOS (25.71 ± 0.62 versus 18.79 ± 0.18 pmol/min/mg prot, $P < 0.05$). La administración de los compuestos (22.75 ± 0.5 , 17.6 ± 0.13 y 14.95 ± 0.26 pmol/min/mg prot respectivamente) reduce la actividad c-mtNOS respecto al control pero no de forma significativa con respecto al grupo tratado con MPTP (Figura 33, abajo).

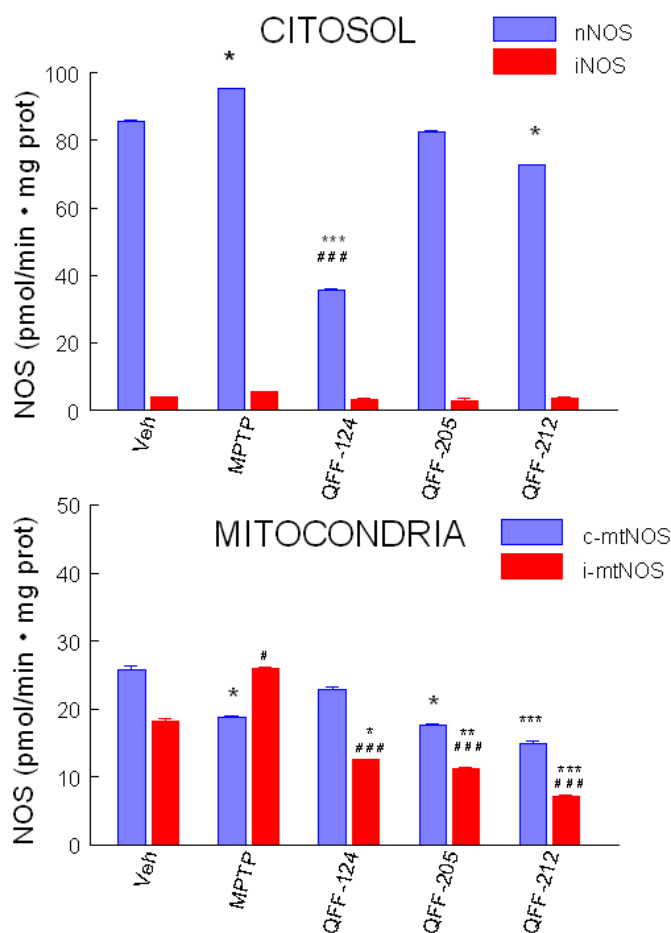


Figura 33. Cambios en la actividad de los componentes constitutivo e inducible de la NOS según los distintos compuestos ensayados, tanto en el citosol (arriba) como en la mitocondria (abajo) del ST de ratones C57/Bl6. Los datos se corresponden a la media \pm EE de 6 animales por grupo, por triplicado cada experimento. * $P < 0.05$ **, $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ vs control; # $P < 0.05$ y ### $P < 0.001$ vs MPTP.

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

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

Código	Familia	CITOSOL SN		CITOSOL ST	
		% Inhibición iNOS	% Inhibición nNOS	% Inhibición iNOS	% Inhibición nNOS
QFF-124	Pirazolina	15.86 ± 1.38	26.66 ± 0.9	3.3 ± 0.3	35.7 ± 0.3
QFF-205	Pirrol	9.29 ± 0.34	63.84 ± 1.4	2.83 ± 0.8	82.5 ± 0.26
QFF-212	Pirrol	7.5 ± 0.27	74 ± 0.26	3.6 ± 0.27	72.61 ± 0.23

Tabla 42. Porcentajes de inhibición de la NOS (tanto constitutiva como inducible) en el ST y en la SN del citosol de los compuestos ensayados "in vivo" ordenados de mayor a menor respecto al grado de inhibición del componente inducible en la SN.

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

En la tabla 43, se muestran los porcentajes de inhibición de la NOS (tanto constitutiva como inducible) en el ST y SN de la mitocondria de los compuestos estudiados para el desarrollo del modelo 'in vivo', ordenados de mayor a menor respecto al grado de inhibición del componente inducible en la SN.

Código	Familia	CITOSOL SN		CITOSOL ST	
		% Inhibición i-mtNOS	% Inhibición c-mtNOS	% Inhibición i-mtNOS	% Inhibición c-mtNOS
QFF-124	Pirazolina	18.3 ± 1.385	26.7 ± 0.54	12.5 ± 0.07	22.75 ± 0.5
QFF-205	Pirrol	8.4 ± 0.05	17.2 ± 0.39	11.28 ± 0.22	17.6 ± 0.13
QFF-212	Pirrol	5.91 ± 0.68	10.82 ± 0.49	7.19 ± 0.09	14.95 ± 0.26

Tabla 43. Porcentajes de inhibición de la NOS (tanto constitutiva como inducible) en el ST y en la SN de la mitocondria de los compuestos ensayados "in vivo" ordenados de mayor a menor respecto al grado de inhibición del componente inducible en la SN.

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

La figura 34 representa los niveles de MDA y 4HDA (LPO) en la SN y ST de ratones C57/Bl6. En la SN (Figura 34, izquierda) el MPTP incrementa significativamente los niveles de LPO en el citosol (2.05 ± 0.09 versus 2.80 ± 0.23 nmol/mg prot, $P < 0.001$). Tanto la

pirazolina QFF-214 como los pirroles QFF-205 y QFF-212 son capaces de contrarrestar el efecto generado por el MPTP (2.33 ± 0.07 , 1.93 ± 0.08 y 1.77 ± 0.08 nmol/mg) devolviendo el estado de lipoperoxidación del citosol a valores controles. La neurotoxina también incrementa los niveles de LPO en la mitocondria de la SN (2.92 ± 0.21 versus 4.05 ± 0.14 nmol/mg prot, $P < 0.001$). En este caso, los compuestos son nuevamente capaces de disminuir los niveles de LPO, aunque el efecto de los pirroles son aparentemente mayorea que los producidos por la pirazolina. (3.37 ± 0.17 , 2.54 ± 0.1 y 2.64 ± 0.07 nmol/mg prot respectivamente).

Por otro lado, la administración de MPTP también induce los niveles de LPO en el ST (Figura 34, derecha). De este modo, en el citosol del ST, el MPTP incrementa, de forma menos acusada que en SN, los niveles de LPO (2.16 ± 0.14 versus 2.62 ± 0.12 nmol/mg prot, $P < 0.01$) y los compuestos ensayados modifican dichos valores, reduciéndolos a los valores control (QFF-124, 3.21 ± 0.05 ; QFF-205 2.68 ± 0.1 y QFF-215, 2.72 ± 0.07 nmol/mg). El MPTP también aumenta la LPO en las mitocondrias estriatales (3.01 ± 0.03 versus 3.51 ± 0.11 nmol/mg prot, $P < 0.001$). En este caso, los compuestos QFF-205 y QFF-212 (2.54 ± 0.1 y 2.64 ± 0.07 nmol/mg respectivamente, $P < 0.05$) contrarrestan en mayor proporción los efectos del MPTP. Sin embargo el compuesto pirazolina QFF-214 parece no presentar eficacia frente a los efectos generados por el MPTP (3.37 ± 0.17 nmol/mg).

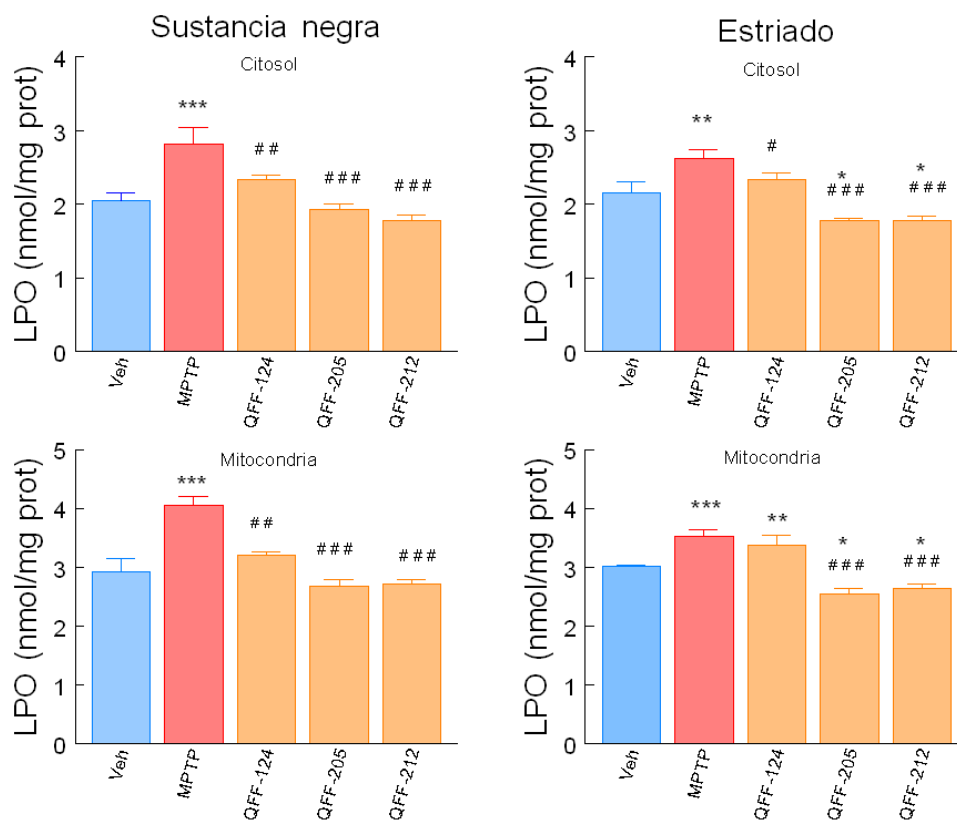


Figura 34. Cambios en los niveles de LPO según los distintos compuestos, tanto en el citosol como en la mitocondria de la SN (izquierda) y ST (derecha) de ratones C57/Bl6. Los datos se corresponden a la media \pm EE de 2 animales para el citosol y 4 animales para la mitocondria, por quintuplicado cada experimento. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$ vs control; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ y ### $P < 0.001$ vs MPTP.

3. ESTUDIO COMPARATIVO DEL EFECTO DE LA MELATONINA EN LA EP EN RATONES CONTROL, DEFICIENTES EN iNOS y DEFICIENTES EN nNOS.

3.1 Actividad del complejo I de la CTE.

Como se ha demostrado con anterioridad, la administración de MPTP (15 mg/kg cada dosis) inhibe la actividad del complejo I en la SN (9.192 ± 1.049 versus 2.724 ± 0.61 nmol/min/mg prot, $P < 0.001$) y ST (7.154 ± 0.1 versus 5.21 ± 0.31 nmol/min mg prot, $P < 0.05$) de ratones C57/Bl6. El porcentaje de inhibición del complejo I producido por el MPTP es significativamente mayor en la SN que en el ST (26% versus 66%, $P < 0.001$) (Figura 35). Los efectos generados por el MPTP son contrarrestados por la aMT en ambos tejidos, recuperando los valores control (8.066 ± 1.292 nmol/min mg prot en ST y 8.618 ± 0.791 nmol/min/mg prot en SN).

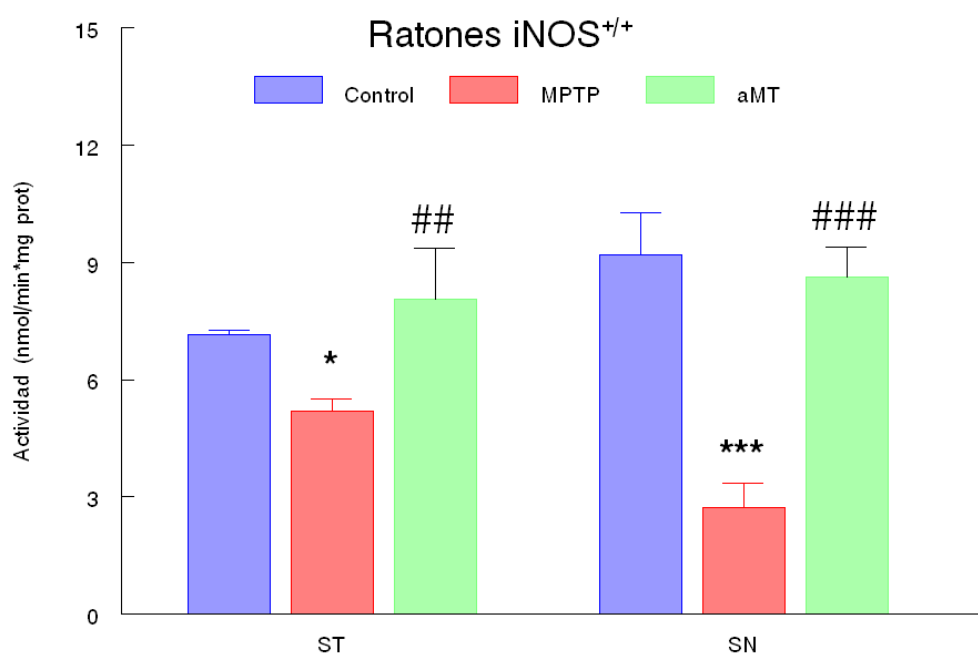


Figura 35. Cambios en la actividad del complejo I de la CTE tanto en la SN como en el ST de ratones C57/Bl6. Los datos se corresponden a la media \pm EE de 2 animales por grupo, por triplicado cada experimento. * $P < 0.05$ y *** $P < 0.01$ vs control; ## $P < 0.01$ y ### $P < 0.001$ vs MPTP.

Por otro lado, se ha evaluado también el efecto de la neurotoxina MPTP y el co-tratamiento con aMT en ratones deficientes en iNOS. Así la administración de MPTP a estos ratones iNOS^{-/-} (15 mg/kg cada dosis) inhibe igualmente la actividad del complejo I en la SN (8.683 ± 0.5981 versus 2.312 ± 0.8319 nmol/min/mg prot, $P < 0.001$) y ST (6.549 ± 0.61 versus 3.721 ± 0.3938 nmol/min mg prot, $P < 0.001$). El porcentaje de inhibición del complejo I producido por el MPTP es nuevamente significativamente mayor en la SN que en el ST

(43.18% versus 73.37 %, $P < 0.001$) (Figura 36). Los efectos generados por el MPTP son contrarrestados por la aMT en ambos tejidos, recuperando los valores control en el caso del ST (6.211 ± 0.9022 nmol/min mg prot) y en menor medida en la SN (6.087 ± 0.3398 nmol/min mg prot).

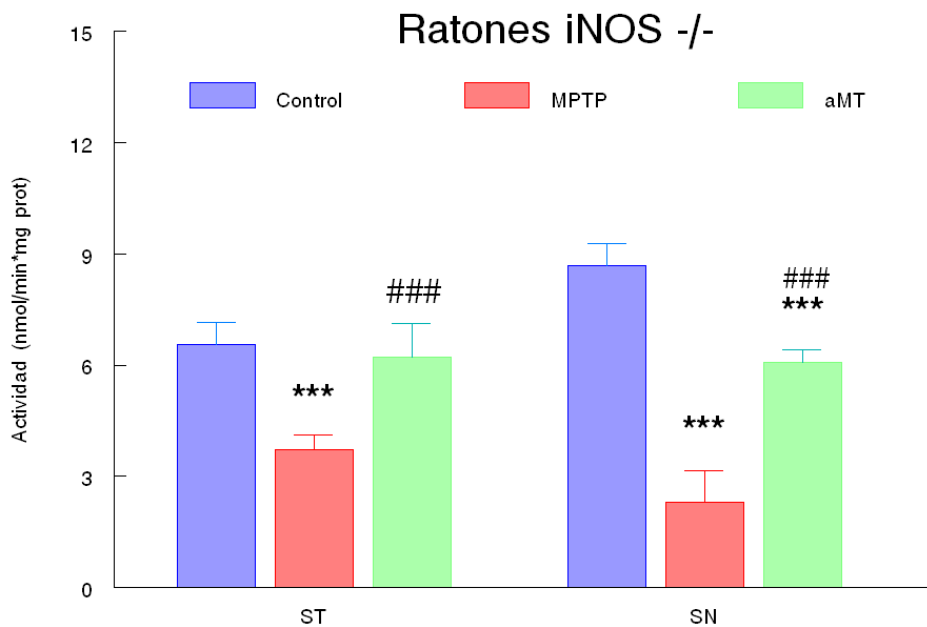


Figura 36. Cambios en la actividad del complejo I de la CTE tanto en la SN como en el ST de ratones deficientes en iNOS ($iNOS^{-/-}$). Los datos se corresponden a la media \pm EE de 2 animales por grupo, por triplicado cada experimento. *** $P < 0.01$ vs control; ### $P < 0.001$ vs MPTP.

Para evaluar también el efecto de la ausencia de nNOS en la actividad del complejo I, se utilizaron ratones control y KOnNOS. En la figura 37 se muestra el efecto del tratamiento con MPTP y aMT en ratones nNOS^{+/+} donde se puede observar como el MPTP inhibe la actividad del complejo I en la SN (11.5 ± 0.8534 versus 4.768 ± 0.7136 nmol/min/mg prot, $P < 0.001$) y ST (10.22 ± 1.61 versus 5.573 ± 0.6737 nmol/min mg prot, $P < 0.001$). El porcentaje de inhibición del complejo I producido por el MPTP es significativamente mayor en la SN que en el ST (45.47% versus 58.54 %, $P < 0.001$). Los efectos del MPTP son contrarrestados por la aMT en ambos tejidos (ST, 8.9 ± 0.66 nmol/min mg prot y SN, 9.655 ± 0.4237 nmol/min mg prot).

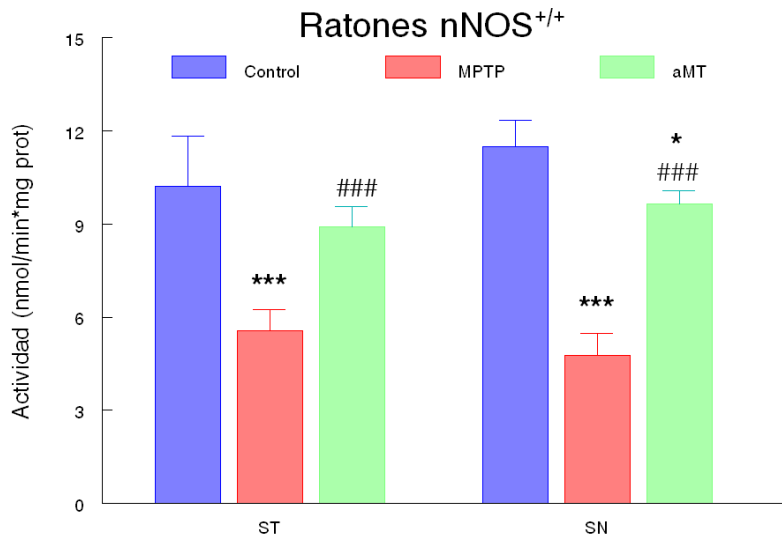


Figura 37. Cambios en la actividad del complejo I de la CTE tanto en la SN como en el ST de ratones control (nNOS^{+/+}). Los datos se corresponden a la media \pm EE de 2 animales por grupo, por triplicado cada experimento. * $P < 0.05$, *** $P < 0.01$ vs control; ### $P < 0.001$ vs MPTP.

En la figura 38 se muestra el efecto del tratamiento con MPTP y aMT en ratones deficientes en nNOS (nNOS^{-/-}). El MPTP inhibe la actividad del complejo I en la SN (5.13 ± 1.1532 versus 1.98 ± 0.6271 nmol/min/mg prot, $P < 0.01$) y ST (10.43 ± 1.9762 versus 3.93 ± 0.911 nmol/min mg prot, $P < 0.01$). El daño en la actividad del complejo I producido por el MPTP es mayor nuevamente en la SN que en el ST (reducción del 61.4% en SN versus 37.68 % en ST, $P < 0.01$). Los efectos del MPTP son contrarrestados por la aMT en ambos tejidos (ST, 7.25 ± 2.004 nmol/min mg prot y SN, 3.3 ± 0.063 nmol/min mg prot).

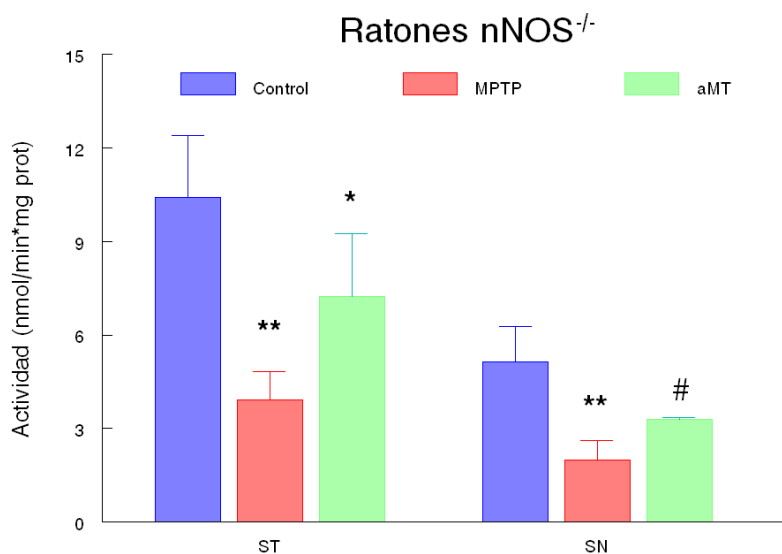


Figura 38. Cambios en la actividad del complejo I de la CTE tanto en la SN como en el ST de ratones control (nNOS^{-/-}). Los datos se corresponden a la media \pm EE de 2 animales por grupo, por triplicado cada experimento. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control; ### $P < 0.001$ vs MPTP.

3.2 Actividad NOS inducible y NOS total

Se evaluó también el efecto de la administración de MPTP y de la melatonina sobre la actividad NOS total e inducible en homogenado de SN y ST en ratones normales y deficientes en iNOS.

En SN de los ratones control (iNOS^{+/+}) el tratamiento con MPTP resulta en un incremento de la actividad NOS total a expensas de un incremento en la actividad del componente inducible (Figura 39) que es disminuido tras el tratamiento con melatonina. Así la actividad de NOS total se incrementa en un 256.5 % gracias a un incremento de la actividad inducible (19.55 ± 1.167 versus 61.125 ± 4.745 pmol/min/mg prot, $P < 0.001$). La administración de melatonina disminuye los valores de actividad total disminuyendo la actividad inducible (37.02 ± 1.79 pmol/min/mg prot, $P < 0.001$).

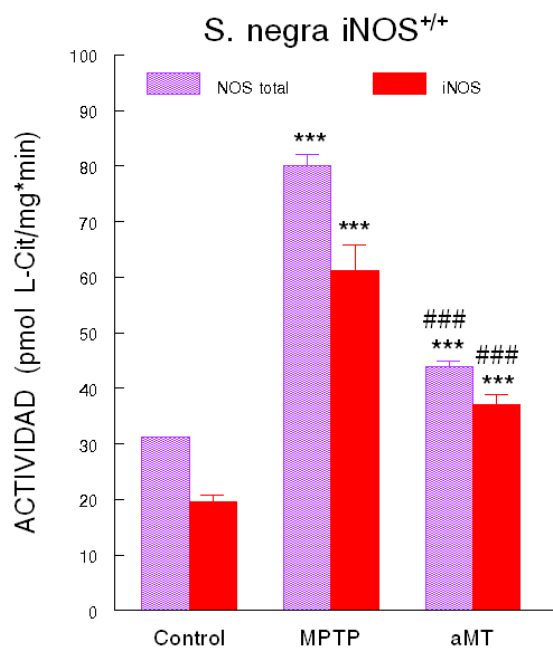


Figura 39. Cambios en la actividad NOS total e iNOS en SN de ratones control. Los datos se corresponden a la media \pm EE de 6 animales por grupo, por triplicado cada experimento. *** $P < 0.001$ vs control; ### $P < 0.001$ vs MPTP.

Por otro lado, la neurotoxina afecta significativamente la actividad NOS total e inducible en homogenado de ST de ratones (iNOS^{+/+}). En el grupo tratado con MPTP resulta en un incremento de la actividad NOS total nuevamente, a expensas de un incremento en la actividad del componente inducible (Figura 40) que es disminuido tras el tratamiento con melatonina. Así la actividad de NOS total se incrementa en un 192.9 % gracias a un incremento de la actividad inducible (29.345 ± 4.547 versus 56.615 ± 3.825 pmol/min/mg prot, $P < 0.001$). La administración de melatonina disminuye los valores de actividad total disminuyendo la actividad iNOS (28.17 ± 1.38 pmol/min/mg prot con aMT versus 52.57 ± 4.992 pmol/min/mg prot con MPTP, $P < 0.001$).

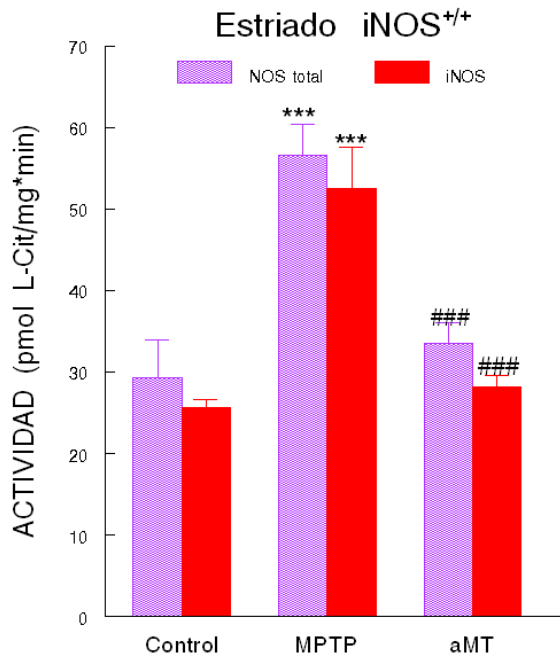


Figura 40. Cambios en la actividad NOS total e iNOS en ST de ratones control. Los datos se corresponden a la media \pm EE de 6 animales por grupo, por triplicado cada experimento. *** $P < 0.001$ vs control; ### $P < 0.001$ vs MPTP.

Cuando medimos la actividad NOS en ST y SN de ratones deficientes en iNOS (iNOS^{-/-}) podemos observar la ausencia de efecto sobre la actividad NOS total tras el tratamiento con MPTP y la ausencia de actividad iNOS y como la administración de melatonina no afecta a los valores anteriores. Así los valores de NOS total en ST resultan 65.405 ± 2.6552 pmol/min/mg prot en controles, 79.09 ± 10.649 pmol/min/mg prot en tratados con MPTP y 61.625 ± 5.961 pmol/min/mg prot tras la administración de aMT (Figura 41).

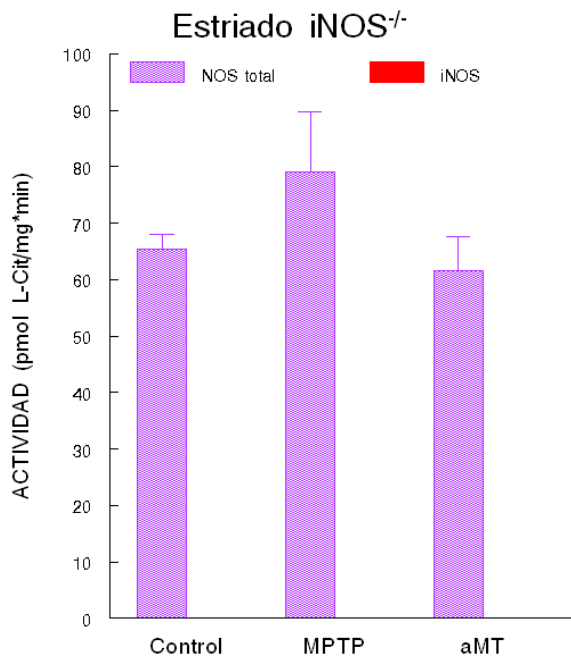


Figura 41. Cambios en la actividad NOS total e iNOS en ST de ratones iNOS^{-/-}. Los datos se corresponden a la media \pm EE de 6 animales por grupo, por triplicado cada experimento.

Del mismo modo, los resultados en SN de estos ratones son similares destacando la ausencia del componente inducible. Así los valores de NOS total en SN resultan 64.00 ± 1.81 pmol/min/mg prot en controles, 68.27 ± 2.786 pmol/min/mg prot en tratados con MPTP y 65.7 ± 1.754 pmol/min/mg prot tras la administración de aMT (Figura 42).

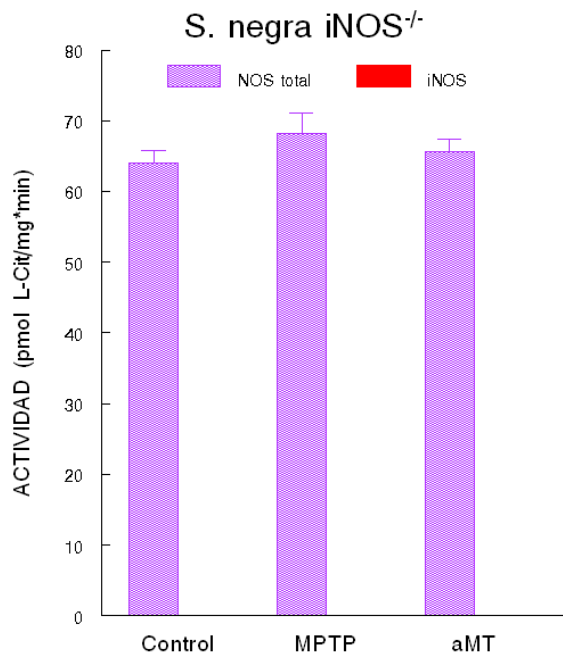


Figura 42. Cambios en la actividad NOS total e iNOS en SN de ratones ratones iNOS^{-/-}. Los datos se corresponden a la media \pm EE de 6 animales por grupo, por triplicado cada experimento.

Estos resultados han sido objeto de la siguiente publicación:

Melatonin and its brain metabolite N(1)-acetyl-5-methoxykynuramine prevent mitochondrial nitric oxide synthase induction in parkinsonian mice. Tapias V, Escames G, López LC, López A, Camacho E, Carrión MD, Entrena A, Gallo MA, Espinosa A, Acuña-Castroviejo D., *J Neurosci Res.* 2009 Oct;87(13):3002-10.

3.3 Western Blot de los Complejos de la CTE

Para el estudio del efecto del tratamiento con MPTP (15mg/kg cada dosis) y la administración de melatonina sobre la cantidad de proteína de los complejos respiratorios, se realizaron los siguientes WB. Representadas en la figura 43 se muestran las imágenes obtenidas de los WB donde se distinguen los complejos I, III, IV y V de la CTE en ratones $iNOS^{+/+}$, $iNOS^{-/-}$, $nNOS^{+/+}$ y $nNOS^{-/-}$.

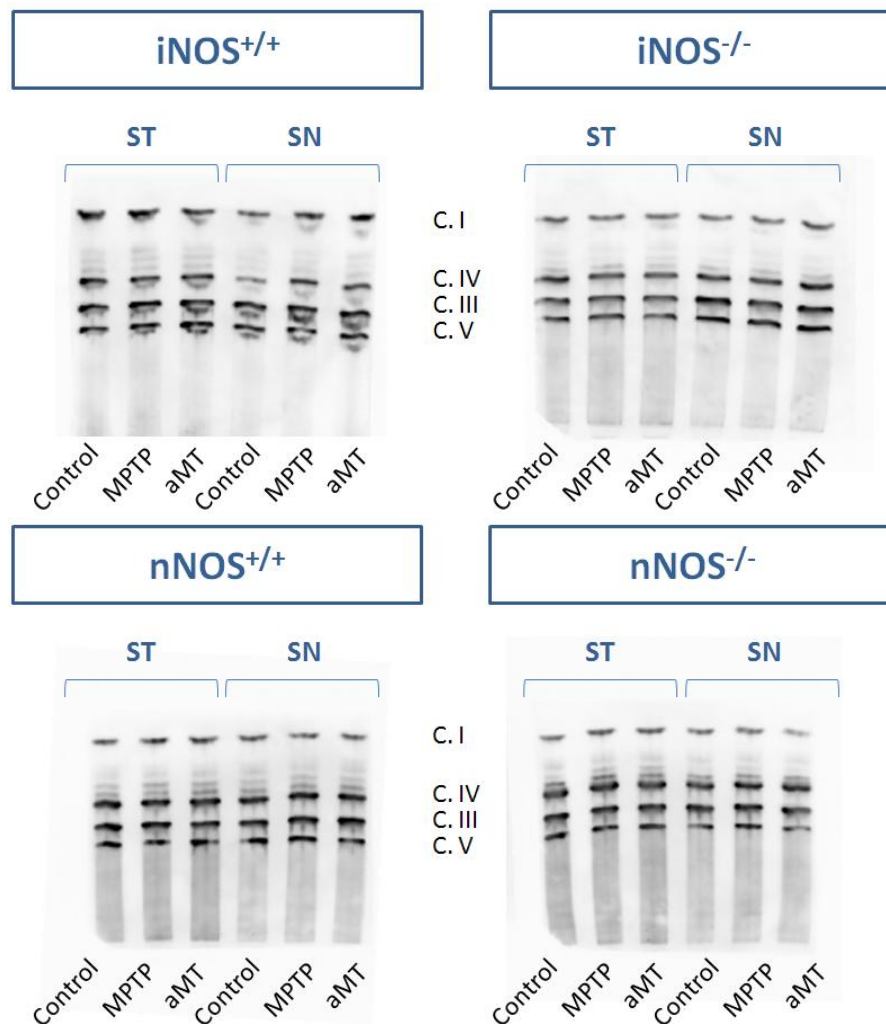


Figura 43. WB de complejos de la cadena respiratoria en ST y SN de ratones $iNOS^{+/+}$, $iNOS^{-/-}$, $nNOS^{+/+}$ y $nNOS^{-/-}$ controles, con MPTP y tratados con aMT.

Los valores obtenidos por densitometría de estos westerns blot dieron lugar a los resultados de las siguientes figuras.

En la figura 44 se muestran los cambios encontrados en la cantidad de complejo I en ratones control, tratados con MPTP y con aMT en ratones $iNOS^{+/+}$, $iNOS^{-/-}$, $nNOS^{+/+}$ y $nNOS^{-/-}$. Tanto en ST como en SN.

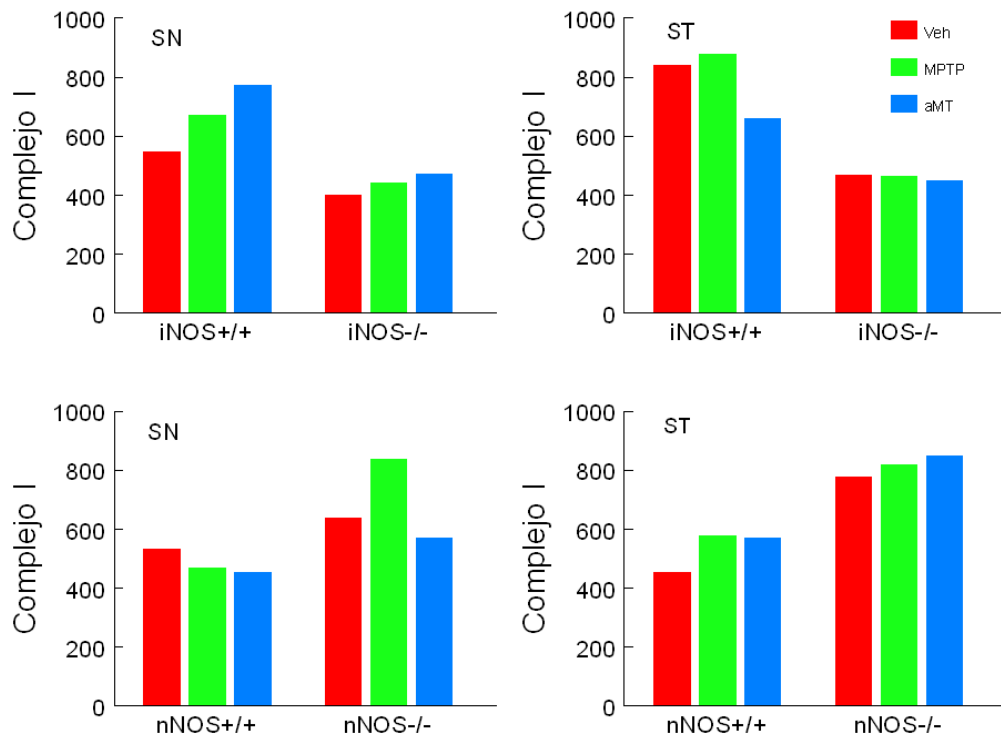


Figura 44. Análisis de la densitometría obtenida de las bandas de complejo I en ratones *iNOS^{+/+}*, *iNOS^{-/-}*, *nNOS^{+/+}* y *nNOS^{-/-}* comparando grupo control con MPTP y tratado con aMT.

En la figura 45 se muestran los cambios encontrados en la cantidad de complejo III en ratones control, tratados con MPTP y con aMT en ratones *iNOS^{+/+}*, *iNOS^{-/-}*, *nNOS^{+/+}* y *nNOS^{-/-}*. Tanto en ST como en SN.

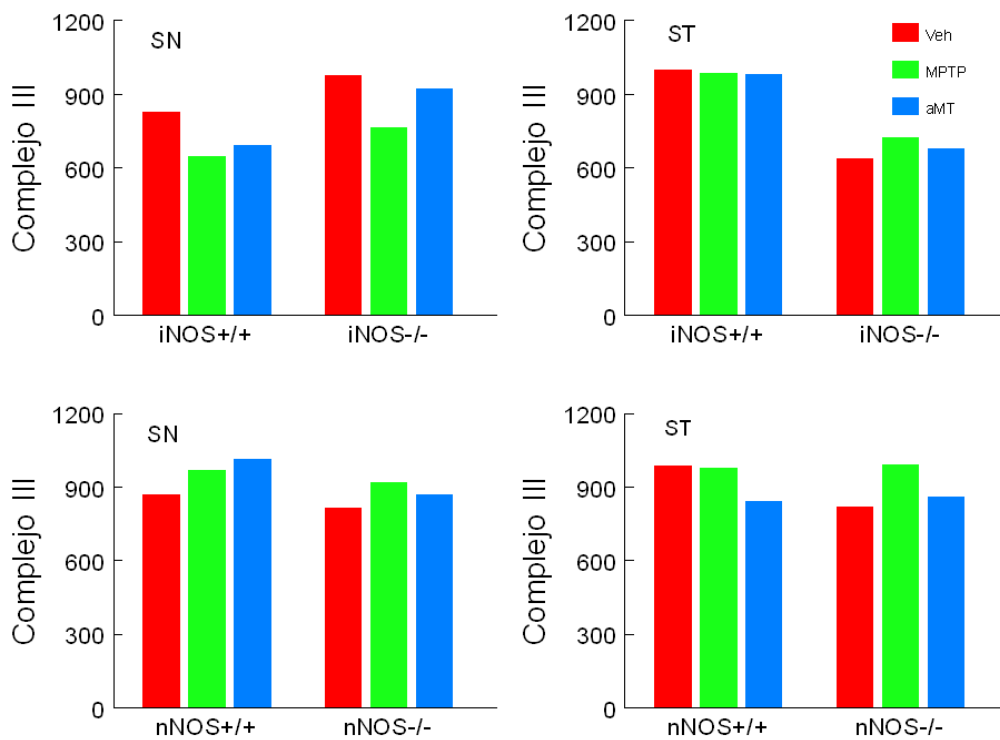


Figura 45. Análisis de la densitometría obtenida de las bandas de complejo III en ratones *iNOS^{+/+}*, *iNOS^{-/-}*, *nNOS^{+/+}* y *nNOS^{-/-}* comparando grupo control con MPTP y tratado con aMT.

En las figura 47 y 48 se muestran los cambios encontrados en la cantidad de complejo IV y V en ratones control, tratados con MPTP y con aMT en ratones $iNOS^{+/+}$, $iNOS^{-/-}$, $nNOS^{+/+}$ y $nNOS^{-/-}$. Tanto en ST como en SN.

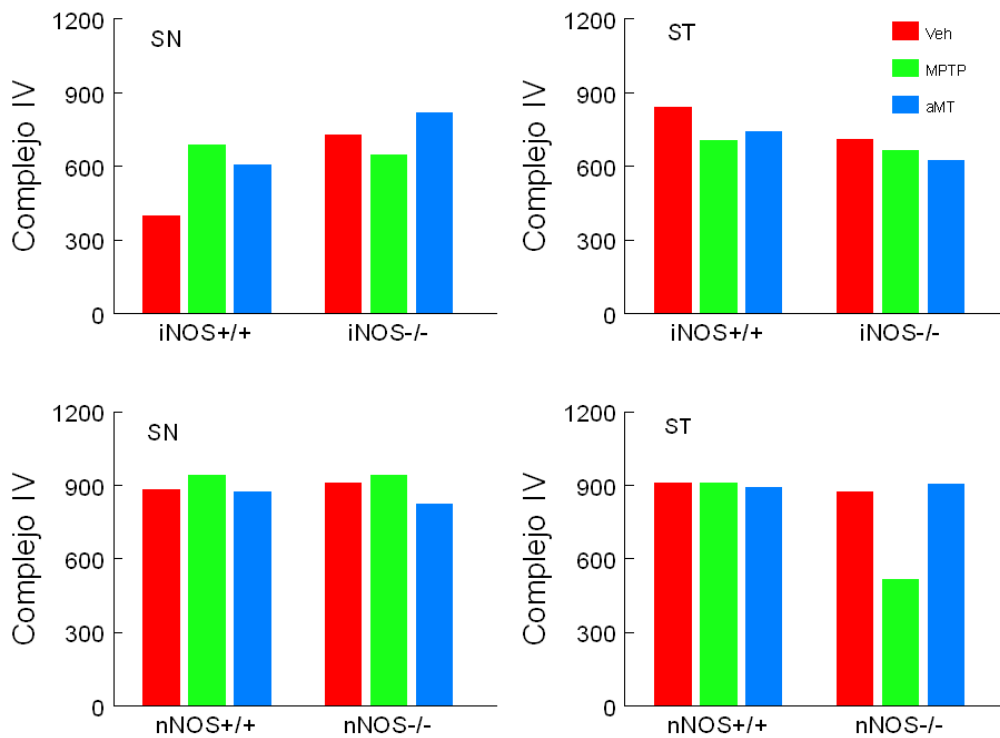


Figura 47. Análisis de la densitometría obtenida de las bandas de complejo IV en ratones $iNOS^{+/+}$, $iNOS^{-/-}$, $nNOS^{+/+}$ y $nNOS^{-/-}$ comparando grupo control con MPTP y tratado con aMT.

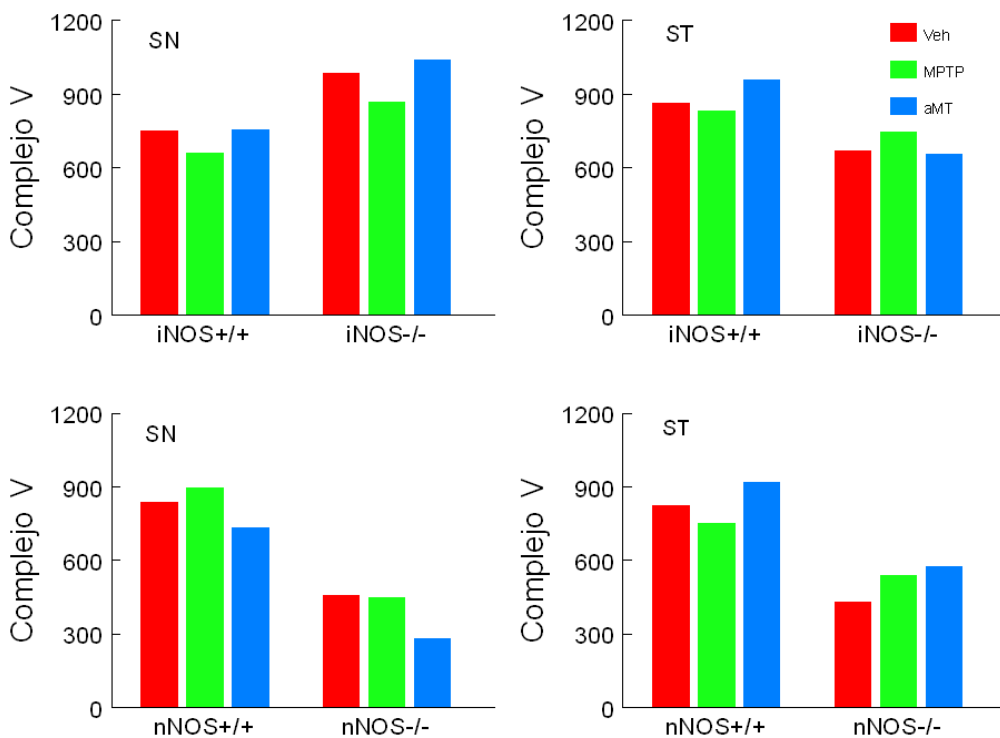


Figura 48. Análisis de la densitometría obtenida de las bandas de complejo IV en ratones $iNOS^{+/+}$, $iNOS^{-/-}$, $nNOS^{+/+}$ y $nNOS^{-/-}$ comparando grupo control con MPTP y tratado con aMT.

3.4 Daño al DNA mitocondrial.

Tras el análisis por RT-PCR para cuantificar DNA nuclear (nDNA) y DNA mitocondrial (mtDNA) se calculó el cociente mtDNA/nDNA como indicador de daño genómico mitocondrial y consecuente implicación en la biogénesis de la organela. El estudio se realizó en las tres cepas de ratones control, iNOS^{-/-} y nNOS^{-/-}, para evaluar el efecto de la presencia/ausencia de las isoformas constitutiva e inducible de la NOS.

En la figura 50 están representados los cocientes mtDNA/nDNA en ST y SN de ratones control. En ésta podemos observar como el tratamiento con MPTP reduce de forma significativa el cociente mtDNA/nDNA en SN (1.07 ± 0.07 versus 0.872 ± 0.06) y la tendencia de la melatonina a contrarrestar esta disminución aunque no de forma significativa. En el ST se observa la misma tendencia con el MPTP pero no de forma significativa y la melatonina en este caso parece no tener ningún efecto.

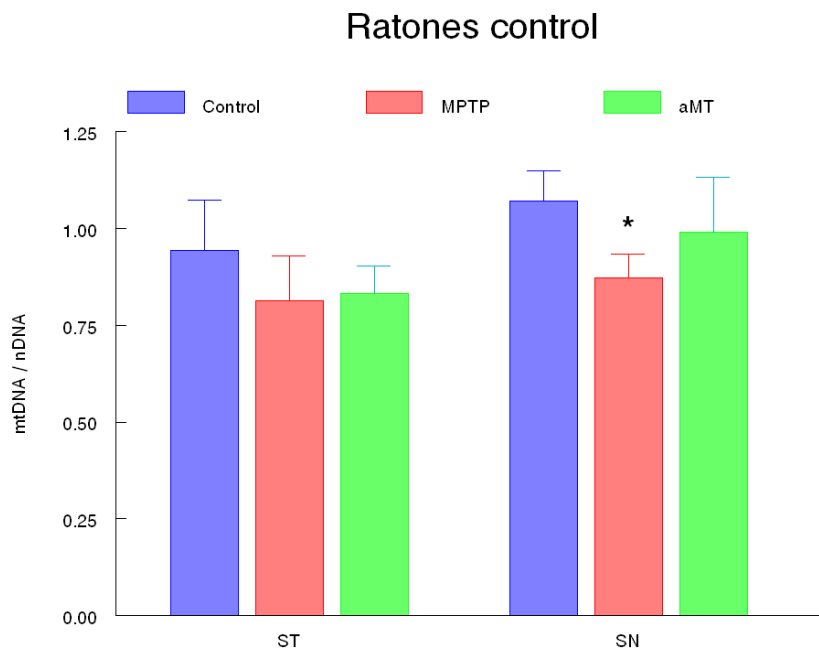


Figura 50. Cociente mtDNA/nDNA en ST y SN de ratones control tratados con MPTP y aMT. * $P < 0.05$

En la figura 51 están representados los cocientes mtDNA/nDNA en ST y SN de ratones deficientes en iNOS (iNOS^{-/-}). En ésta podemos observar como ni tratamiento con MPTP ni la administración de melatonina tienen ningún efecto sobre el cociente mtDNA/nDNA tanto en ST (1.067 ± 0.14 en control, 1.1 ± 0.06 en MPTP y 1.088 ± 0.094 en aMT) como en SN (1.363 ± 0.096 en control, 1.347 ± 0.095 en MPTP y 1.377 ± 0.087 en aMT)

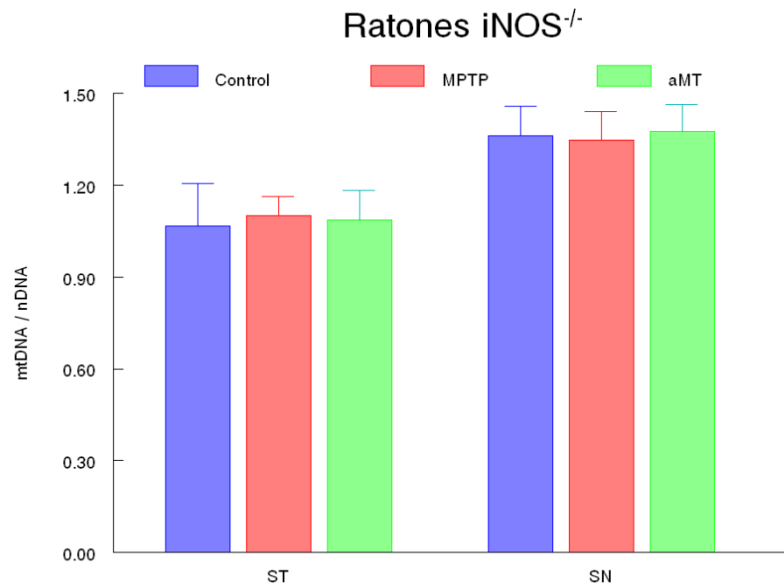


Figura 51. Cociente mtDNA/nDNA en ST y SN de ratones iNOS^{-/-} tratados con MPTP y aMT. * $P < 0.05$

Por último, en la figura 52 están representados los cocientes mtDNA/nDNA en ST y SN de ratones deficientes en nNOS (nNOS^{-/-}). En ésta podemos observar como el tratamiento con MPTP reduce el cociente mtDNA/nDNA en ambos tejidos (1.34 ± 0.02 versus 1.207 ± 0.04 en ST; 1.28 ± 0.04 versus 1.09 ± 0.091 en SN), aunque de forma más acusada en SN, y como la melatonina tiende a recuperar en ésta última.

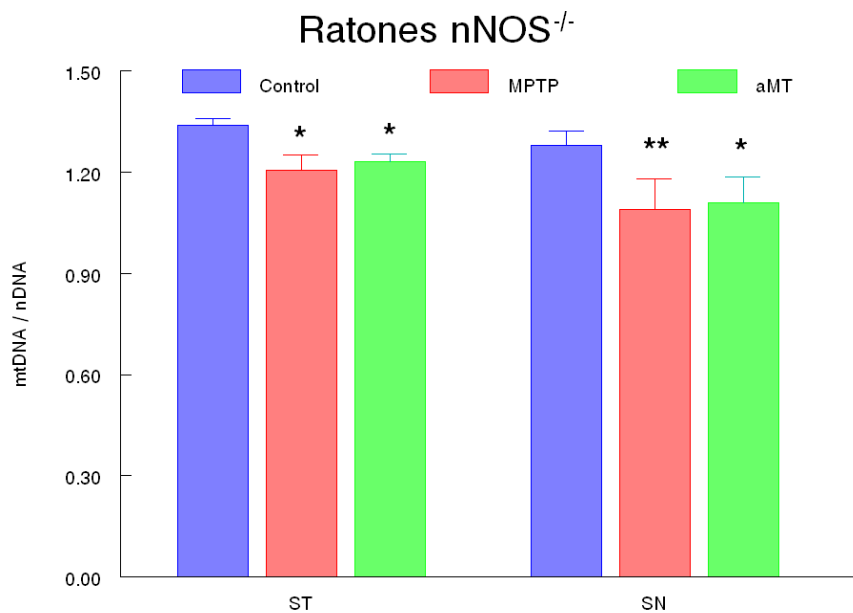


Figura 52. Cociente mtDNA/nDNA en ST y SN de ratones nNOS^{-/-} tratados con MPTP y aMT. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Trabajo 2

Melatonin and Its Brain Metabolite N¹-Acetyl-5-Methoxykynuramine Prevent Mitochondrial Nitric Oxide Synthase Induction in Parkinsonian Mice

Víctor Tapias,¹ Germaine Escames,¹ Luis C. López,¹ Ana López,¹ Encarnación Camacho,² María D. Carrión,² Antonio Entrena,² Miguel A. Gallo,² Antonio Espinosa,² and Darío Acuña-Castroviejo^{1,3*}

¹Centro de Investigación Biomédica, Instituto de Biotecnología, Universidad de Granada, Granada, Spain

²Departamento de Química Farmacéutica y Orgánica, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, Granada, Spain

³Servicio de Análisis Clínicos, Hospital Universitario San Cecilio, Granada, Spain

Melatonin prevents mitochondrial failure in models of sepsis through its ability to inhibit the expression and activity of both cytosolic (iNOS) and mitochondrial (i-mtNOS) inducible nitric oxide synthases. Because Parkinson's disease (PD), like sepsis, is associated with iNOS induction, we assessed the existence of changes in iNOS/i-mtNOS and their relation with mitochondrial dysfunction in the MPTP model of PD, which also displays increased iNOS expression. We also evaluated the role of melatonin (aMT) and its brain metabolite, N¹-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), in preventing i-mtNOS induction and mitochondrial failure in this model of PD. Mitochondria from substantia nigra (SN) and, to a lesser extent, from striatum (ST) showed a significant increase in i-mtNOS activity, nitrite levels, oxidative stress, and complex I inhibition after MPTP treatment. MPTP-induced i-mtNOS was probably related to mitochondrial failure, because its prevention by aMT and AMK reduced oxidative/nitrosative stress and restored complex I activity. These findings represent the first experimental evidence of a potential role for i-mtNOS in the mitochondrial failure of PD and support a novel mechanism in the neuroprotective effects of aMT and AMK. © 2009 Wiley-Liss, Inc.

Key words: MPTP; mitochondria; nitric oxide synthase; Parkinson's disease; melatonin

The participation of factors such as oxidative/nitrosative stress, excitotoxicity, inflammation, and mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of sporadic Parkinson's disease (PD) may be studied in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) model of PD. The active glial metabolite of MPTP, 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺), is taken up into the dopaminergic neurons through the dopamine transporter, and it accumulates in the mitochondria of the substantia nigra pars compacta (SNpc; Przedborski et al.,

2004). Here, MPP⁺ binds to and inhibits complex I of the electron transport chain (ETC; Greenamyre et al., 2001), which in turn increases the production of reactive oxygen species (ROS), leading to a sustained oxidative damage to the ETC, ATP reduction, and nigral cell death (Rego and Oliveira, 2003; Przedborski et al., 2004; Tretter et al., 2004). MPP⁺ also induces microglia activation and iNOS expression in the SN of mice (Liberatore et al., 1999), producing large amounts of NO· and neuronal death (Liberatore et al., 1999; Brown and Bal-Price, 2003). In the striatum (ST), however, the damage induced by MPP⁺ depends on the nNOS activation and excitotoxicity (Liberatore et al., 1999). NO· enhances the MPP⁺ inhibition of complex I (Cleeter et al., 2001), favoring the production of superoxide anion (O₂^{·-}). Here, NO· rapidly reacts with O₂^{·-} generating the highly toxic peroxynitrite (ONOO⁻), which impairs the mitochondria as a result of the irreversible inhibition of all ETC complexes (Brown and Borutaite, 2004), contributing to the neuronal death (Muravchick and Levy, 2006; Zhang et al., 2006).

The presence of both constitutive (mtNOS) and inducible (i-mtNOS) NOS isoforms in the mitochondria of several tissues has recently been proposed (Tatoyan

Contract grant sponsor: ISCIII (Spain); Contract grant number: PI02-1447; Contract grant number: RD06/0013/0008 (RETICEF); Contract grant sponsor: Ministerio de Educación (Spain); Contract grant number: SAF2005-07991-C02-01-02; Contract grant sponsor: Junta de Andalucía (Spain); Contract grant number: P06-CTS-01941.

*Correspondence to: Darío Acuña-Castroviejo PhD, Centro de Investigación Biomédica, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Universidad de Granada, Avenida del Conocimiento, s/n, E-18100 Armilla, Granada, Spain. E-mail: dacuna@ugr.es

Received 25 February 2009; Revised 30 March 2009; Accepted 4 April 2009

Published online 12 May 2009 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/jnr.22123

and Giulivi, 1998; Escames et al., 2003). A correlation between i-mtNOS expression and mitochondrial failure during inflammation has been reported (Escames et al., 2003, López et al., 2006). In turn, iNOS mutant mice are protected against MPTP toxicity (Dehmer et al., 2000) and sepsis (López et al., 2006), an effect related to the lack of mitochondrial impairment in absence of i-mtNOS. These data further support the inflammatory pathway in the pathogenesis of PD and suggest a role for i-mtNOS in the mitochondrial dysfunction.

Melatonin (aMT) exerts important antioxidant and antiinflammatory actions. Antioxidant actions involve direct scavenging of both ROS and reactive nitrogen species (RNS) (Tan et al., 2000; Acuña-Castroviejo et al., 2001) and indirect up-regulation of antioxidant enzymes (Antolín et al., 1996). Antiinflammatory actions of aMT depend on its inhibition of the expression of iNOS and, here, i-mtNOS (Crespo et al., 1999; Escames et al., 2003). It was recently reported that the brain aMT metabolite N¹-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK) (Hirata et al., 1974) is a better antioxidant than its precursor AFMK (Ressmeyer et al., 2003), and it is a highly efficient NO scavenger, which forms a stable product that does not easily redonate NO (Hardeland et al., 2007). AMK was more potent than aMT in inhibiting *in vitro* and *in vivo* striatal NOS activity (León et al., 2006), and both compounds, aMT and AMK, easily cross the brain-blood barrier after their administration, reaching neuronal and glial cells (Borlongan et al., 2000; Baydas et al., 2002; León et al., 2006).

Previous reports showed that aMT prevents dopamine autooxidation (Khaldy et al., 2000) and exerts neuroprotective properties in different models of neurodegeneration, including MPTP-induced PD (Acuña-Castroviejo et al., 1997; Khaldy et al., 2003; Thomas and Mohanakumar, 2004). However, the effect of aMT and/or AMK on MPTP-induced mitochondrial dysfunction *in vivo* has not been examined to date. Moreover, the participation of i-mtNOS in the mitochondrial dysfunction and nigrostriatal degeneration during PD is unknown. Thus, we considered it worthwhile to examine, in the MPTP model of PD in mice, 1) the presence and activity of mitochondrial NOS isoforms in SN and ST, 2) their relation to mitochondrial oxidative damage, and 3) the effects of aMT and AMK administration on i-mtNOS activity and mitochondrial dysfunction.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

L-arginine, L-citrulline, L-tryptophan, ascorbate, methylene blue, catalase, HEPES, 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid (MOPS), DL-dithiothreitol (DTT), leupeptin, aprotinin, pepstatin, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), hypoxanthine-9-beta-D-ribofuranosid (inosine), EGTA, BSA, Dowex-50W (50x8-200) resin, FAD, NADPH, 5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterin dihydrochloride (H₄-biopterin), bovine brain CaM (98% SDS-PAGE), trichloroacetic acid, decylubi-

quinone, and aMT, were obtained from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). [³H]L-arginine (58 Ci/mmol) was obtained from Amersham (GE Healthcare España, Barcelona, Spain). Tris HCl and calcium chloride were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). The synthesis of AMK has been described elsewhere (Entrena et al., 2005). All other chemicals of the purest available grade were obtained from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain) unless otherwise specified.

Animals and Treatments

Adult male C57/Bl6 mice weighing 28–30 g (3–4 months old) were obtained from the University of Granada's facility and housed in clear plastic cages maintained at 22°C ± 2°C and 40% humidity, with a 12-hr light/dark cycle. Mice were fed with tap water and a standard diet *ad libitum*. All experiments were performed according to the Spanish Government guide and the European Community guide for animal care. Mice were divided into the following groups: 1) control group, injected with vehicle (ethanol/saline); 2) MPTP group; 3) MPTP + aMT group; and 4) MPTP + AMK group. Four doses of 15 mg/kg MPTP dissolved in 30 µl saline were injected (*s.c.*) on the first day with 2-hr intervals between them, and 24 hr later three additional doses of the same MPTP concentration were injected following the same protocol. aMT and AMK [20 mg/kg dissolved in 30 µl of 2.5% ethanol/saline (*v/v*) solution] were injected (*s.c.*) 1 hr before the first dose of MPTP. Thirty-two hours after starting treatments, the animals were sacrificed by cervical dislocation, their brains were removed, and fresh SN and ST were dissected for subsequent mitochondria preparation. Because of the amount of tissue necessary to prepare a highly pure mitochondrial fraction from SN and ST, 96 mice were used in each experimental group. Eight SN and ST (corresponding to four mice) were mixed and processed together to obtain one sample of pure mitochondria for analytical purposes. Mitochondrial pellets were stored at –80°C until assays.

Isolation of Cytosol and Pure Mitochondria

Mitochondrial and cytosolic fractions of ST and SN were prepared as described elsewhere (Rice and Lindsay, 1997), with minor modifications. All procedures were carried out at 0–4°C. Briefly, ST and SN were dissected, weighed, washed with saline, placed into ice-cold buffer (25 mM Tris, 0.5 mM DTT, 10 µg/ml aprotinin, 10 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml pepstatin, 1 mM PMSF, pH 7.6) and homogenized (10%, *w/v*) at 700 rpm in a Teflon pestle. The homogenates were centrifuged twice at 1,300g for 3 min, and the supernatants were mixed and centrifuged at 21,200g for 10 min, yielding the crude mitochondrial (pellet) and cytosol fraction. The supernatants of this second centrifugation, which correspond to the crude cytosolic fraction, were diluted (0.1 g/ml) in ice-cold buffer (25 mM Tris, 0.5 mM DTT, 10 µg/ml aprotinin, 10 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml pepstatin, 1 mM PMSF, pH 7.6) and centrifuged at 1,000g for 5 min at 4°C, and the supernatants were processed for subsequent determinations (see below). The crude mitochondrial pellets were suspended in 15% *v/v* Percoll prepared in isolation buffer (0.32 M sucrose, 1 mM EDTA-K⁺, 10 mM Tris-HCl, pH

7.4), in a proportion of 1 g original brain homogenate/10 ml Percoll. Then, 0.85 ml of this mixture were carefully layered onto a discontinuous Percoll density gradient consisting in 1 ml of 23% (v/v) Percoll layered onto 1 ml of 40% (v/v) Percoll. The samples were centrifuged at 28,200g for 12 min in an angle-fixed rotor. The bands in the interface between 15% and 23% Percoll layers were aspirated with a syringe, carefully diluted 1:1 with isolation medium, and centrifuged at 16,800g for 10 min. The pellet was resuspended in a total volume of 1 ml isolation buffer, centrifuged at 7,200g for 10 min at 4°C to remove the Percoll, and washed again with a high-ionic-strength solution of KCl 150 mM to yield a highly pure mitochondrial preparation without contaminating organelles and broken mitochondria (López et al., 2006). Pure mitochondrial fractions were homogenized (0.1 g/ml) in ice-cold buffer (25 mM Tris, 0.5 mM DTT, 10 µg/ml pepstatin, 10 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml aprotinin, 1 mM PMSF, pH 7.6) at 0.4°C. The crude homogenates were centrifuged at 2,500g for 5 min, and aliquots of the supernatant were used immediately for NOS activity determination.

Assay of Cytosolic and Mitochondrial NOS Activity

The cytosol and mitochondrial samples were either stored at -80°C for total protein determination (Lowry et al., 1951) or used immediately for NOS activity assays, monitoring the conversion of L-[³H]arginine to L-[³H]citrulline (Bredt and Snyder, 1992). The final incubation volume was 100 µl and comprised 10 µl cytosol or mitochondrial samples added to a buffer to give a final concentration of 25 mM Tris, 1 mM DTT, 30 µM H₄-biopterin, 10 µM FAD, 50 nM L-[³H]arginine, 10 µM L-arginine, 0.5 mg/ml BSA, 0.5 mM inosine, and 0.1 mM CaCl₂, pH 7.6. The reaction was started by the addition of 10 µl NADPH (0.75 mM final concentration) and continued for 30 min at 37°C. Control incubations were performed in absence of NADPH. To determine the Ca²⁺-independent NOS activity, 10 mM EDTA was added to the reaction medium. The reaction was stopped by the addition of 400 µl cold 0.1 M Hepes containing 10 mM EGTA, 1 mM L-citrulline, pH 5.5. The reaction mixture was decanted into a 2-ml column packed with Dowex-50W ion exchange resin (Na⁺ form) and eluted with 1.2 ml distilled water. L-[³H]citrulline was quantified by liquid scintillation spectroscopy. The retention of L-[³H]arginine by the column was greater than 98%. Specific enzyme activity was determined by subtracting the control value, which usually amounted less than 1% of the radioactivity added. NOS activity was expressed as pmol of L-[³H]citrulline/min/mg protein.

Nitrite Assay

Cytosol and mitochondrial fractions were thawed, and mitochondrial aliquots were suspended in ice-cold distilled water and immediately sonicated to break mitochondrial membranes. Aliquots of these samples were either stored at -80°C for total protein determination (Lowry et al., 1951) or used to calculate nitrite levels. The amount of nitrite was measured following the Griess reaction (Green et al., 1981) by incubating 100-µl samples with 100 µl Griess reagent [0.1% N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride; 1% sulfanila-

mide in 5% phosphoric acid; 1:1] at room temperature for 20 min. The absorbance at 550 nm was measured, and nitrite concentrations were calculated by comparison with the absorbance of a standard solution of known sodium nitrite concentration and expressed as nmol nitrite/mg protein.

Lipid Peroxidation Assay

For lipid peroxidation (LPO) measurements, cytosolic aliquots were thawed and treated with ice-cold 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing 1 mM EDTA-K⁺, whereas mitochondrial fractions were thawed, suspended in ice-cold 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4, containing 0.32 M sucrose and 1 mM EDTA-K⁺, and sonicated to break mitochondrial membranes. Aliquots of these samples were either stored at -80°C for total protein determination (Lowry et al., 1951) or used for LPO assay. For this purpose, a commercial LPO assay kit able to determine both malondialdehyde (MDA) and 4-hydroxyalkenals (4HDA) was used (Bioxytech LPO-568 assay kit; OxisResearch, Portland, OR; Esterbauer and Cheeseman, 1990). LPO concentration is expressed in nmol/mg protein.

Complex I (NADH:Ubiquinone Oxidoreductase) Assay

To prepare submitochondrial particles, mitochondrial pellets were frozen and thawed twice, suspended in 160 µl of the incubation medium, and sonicated. Complex I activity (NADH CoQ oxidoreductase) was measured in the presence of decylubiquinone and succinate as the rotenone-sensitive decrease in NADH (Barrientos, 2002). Briefly, an aliquot of the submitochondrial suspension (0.5 mg protein/ml, final concentration) was added to the reaction mixture (final incubation volume 500 µl) containing 0.25 M sucrose, 50 mM KH₂PO₄, pH 7.4, 1 mM KCN, 10 µg/ml antimycin A, and 50 µM decylubiquinone. After preincubation for 3 min at 25°C, the reaction was initiated by the addition of NADH (100 µM, final concentration), and the rate of decrease in the absorbance was monitored at 340 nm for 1.5 min. That NADH oxidase activity measured with this method corresponds to complex I was further confirmed insofar as incubation in the presence of 1 µM rotenone completely abolished the enzyme activity. The complex I activity was expressed as nmol of NADH oxidized/min/mg protein.

Statistical Analysis

Eight SN and ST (corresponding to four mice) were mixed and processed together as one sample to obtain a minimal amount of mitochondria for analytical purposes. Thus, the data represent the mean ± SEM of six experiments (corresponding to 24 mice) performed in triplicate. One-way ANOVA I followed by Student-Newman-Keuls multiple-comparisons test was used for statistical purposes. *P* < 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

aMT and AMK Prevent iNOS/i-mtNOS Activity Induced by MPTP

The cytosol and mitochondrial NOS activities in SN of mice are shown in Figure 1. In cytosol (Fig. 1A),

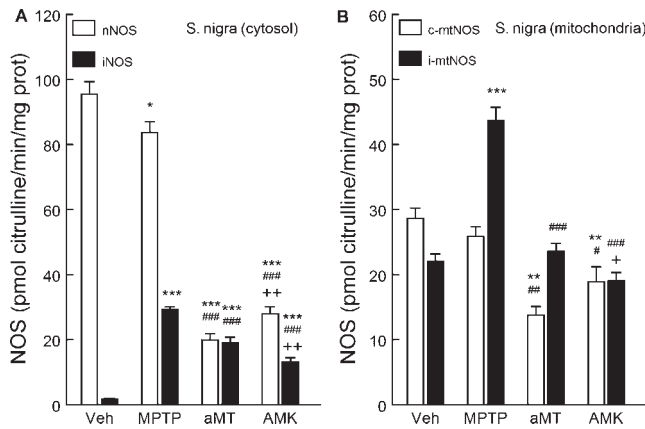


Fig. 1. Changes in NOS activities in SN. **A:** MPTP significantly induced iNOS and reduced nNOS activities in SN cytosol. Treatment with aMT and AMK reduced significantly iNOS and nNOS activities. **B:** MPTP significantly induced i-mtNOS without changes in c-mtNOS in SN mitochondria. Treatment with aMT and AMK reduced i-mtNOS to control values, and only aMT further reduced c-mtNOS somewhat. The effect of AMK was significantly greater than that of aMT in terms of iNOS and i-mtNOS reduction, but its effect on nNOS and c-mtNOS was smaller than that of aMT. The values represent mean \pm SEM from $n = 6$ measurements/group (each measurement was made in SN and ST mitochondria obtained from four animals and processed together; thus, in total 24 animals were used). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ vs. vehicle-treated mice; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, and ### $P < 0.001$ vs. MPTP-treated mice; † $P < 0.05$ and †† $P < 0.01$ vs. aMT.

iNOS activity was almost undetectable in control mice, but it increased significantly after MPTP administration ($P < 0.001$). Administration of aMT or AMK significantly reduced the iNOS activity stimulated by MPTP ($P < 0.001$), although the effect of AMK was significantly greater than that of aMT ($P < 0.01$). MPTP administration also reduced slightly the activity of nNOS in cytosol of SN ($P < 0.05$), whereas administration of aMT or AMK further reduced it ($P < 0.001$).

In control mitochondria of SN (Fig. 1B), two different activities corresponding to a Ca^{2+} -dependent (c-mtNOS) and a Ca^{2+} -independent (i-mtNOS) NOS were detected. The mitochondrial NOS activities correspond to the constitutive and inducible mitochondrial NOS isoforms, respectively, described elsewhere (Escames et al., 2003; López et al., 2006). MPTP administration significantly increased the activity of i-mtNOS ($P < 0.001$) without affecting c-mtNOS activity. Treatment with aMT and, mainly, AMK restored the basal activity of i-mtNOS in ($P < 0.001$), with minor effects on c-mtNOS activity.

Figure 2 shows the changes found in ST cytosol and mitochondria NOS activities. MPTP and aMT or AMK treatments did not modify iNOS activity (Fig. 2A). MPTP, however, increased cytosol nNOS activity ($P < 0.05$), which was significantly reduced after aMT or AMK administration ($P < 0.001$). In ST mitochondria (Fig. 2B), MPTP significantly induced

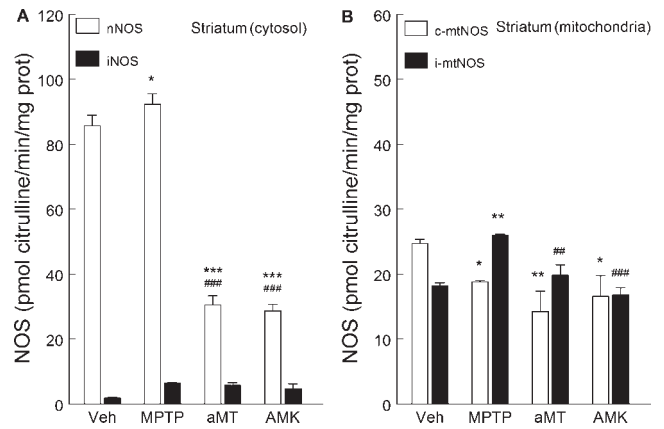


Fig. 2. Changes in NOS activities in ST. **A:** MPTP did not affect significantly iNOS activity but increased nNOS in ST cytosol. aMT and AMK administration did not affect iNOS and decreased nNOS activity. **B:** In ST mitochondria, MPTP increased i-mtNOS activity that was counteracted by aMT and AMK administration. MPTP also reduced slightly c-mtNOS, whereas aMT and AMK did not further affect it. The values represent mean \pm SEM from $n = 6$ measurements/group (each measurement was made in SN and ST mitochondria obtained from four animals and processed together; thus, in total 24 animals were used). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ vs. vehicle-treated mice; ## $P < 0.01$ and ### $P < 0.001$ vs. MPTP-treated mice.

i-mtNOS ($P < 0.01$), which was prevented by aMT ($P < 0.01$) or AMK ($P < 0.001$) treatments. MPTP also reduced slightly the activity of c-mtNOS ($P < 0.05$), but treatment with aMT or AMK did not further affect it.

In comparing the effects of MPTP on SN and ST, the main differences between them are 1) the lack of effect of MPTP on iNOS activity in ST cytosol and the effect of the neurotoxin on i-mtNOS activity in SN mitochondria, where the percentage of increase of i-mtNOS was significantly higher than in ST mitochondria (198% vs. 142%, respectively; $P < 0.001$). aMT and mainly AMK significantly prevented the effects of MPTP on i-mtNOS activities, with minor effects on c-mtNOS.

aMT and AMK Prevent the Increase in Nitrite Levels Induced by MPTP

Figure 3 shows the levels of nitrite in cytosol and mitochondria of SN and ST. MPTP increased the nitrite levels in the cytosol of both brain nuclei ($P < 0.001$), although this effect was significantly greater in SN (Fig. 3A) than in ST (Fig. 3B; $P < 0.001$). These changes were counteracted after aMT or AMK administration ($P < 0.001$). The effects of MPTP were also observed in SN and ST mitochondria, where the neurotoxin increases the levels of nitrite ($P < 0.001$). In addition, the increase in mitochondrial nitrites caused by MPTP was significantly greater in SN than in ST ($P < 0.001$). aMT and AMK administration returned the nitrite levels to control values ($P < 0.001$).

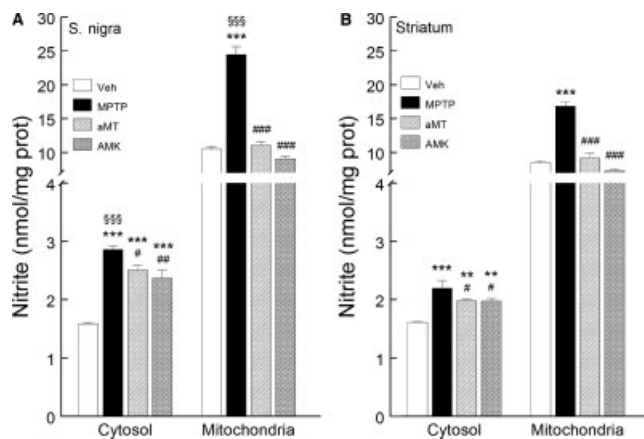


Fig. 3. Levels of nitrite in SN and ST. **A:** After MPTP administration, the levels of nitrite increased significantly in cytosol and mitochondria of SN. Administration of aMT and AMK counteracted the effect of MPTP. **B:** MPTP also increased nitrite levels in cytosol and mitochondria of ST, an effect counteracted by aMT and AMK. These changes in nitrites parallel those reported for i-mtNOS shown in Figures 1 and 2; i.e., nitrites were significantly higher in SN than in ST. The values represent mean \pm SEM from $n = 6$ measurements/group (each measurement was made in SN and ST mitochondria obtained from four animals and processed together; thus, in total 24 animals were used). $**P < 0.01$ and $***P < 0.001$ vs. vehicle-treated mice; $\#P < 0.05$, $\##P < 0.01$, and $\###P < 0.001$ vs. MPTP-treated mice; $\$P < 0.001$ vs. ST.

aMT and AMK Prevent the Oxidative Stress Induced by MPTP

Changes in LPO levels in SN and ST are shown in Figure 4. In SN, MPTP significantly increased LPO levels in cytosol ($P < 0.01$) and mitochondria ($P < 0.001$; Fig. 4A). Administration of aMT ($P < 0.05$) and AMK ($P < 0.01$) counteracted the effects of MPTP in cytosol. In SN mitochondria, both compounds counteracted the effects of MPTP ($P < 0.001$), although the effect of AMK was higher than that of aMT ($P < 0.05$). In ST, MPTP also increased both cytosolic ($P < 0.05$) and mitochondrial ($P < 0.001$) nitrite levels. In addition, aMT and AMK reduced nitrites to control values in cytosol ($P < 0.05$) and mitochondria ($P < 0.001$). In parallel with the changes observed in iNOS/i-mtNOS and nitrite, the effect of MPTP administration on LPO levels was significantly greater in SN than in ST cytosol and mitochondria ($P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively).

aMK and aMT Prevent the Inhibition of the Complex I Resulting From MPTP

Figure 5 shows the typical reduction in complex I activity following MPTP administration. The inhibition induced by MPTP was more important in SN (50%) than in ST (29%) mitochondria. Treatment with aMT or AMK counteracted the effects of MPTP in both brain nuclei, increasing complex I activity above the control values in SN ($P < 0.001$) and ST ($P < 0.05$) mitochondria.

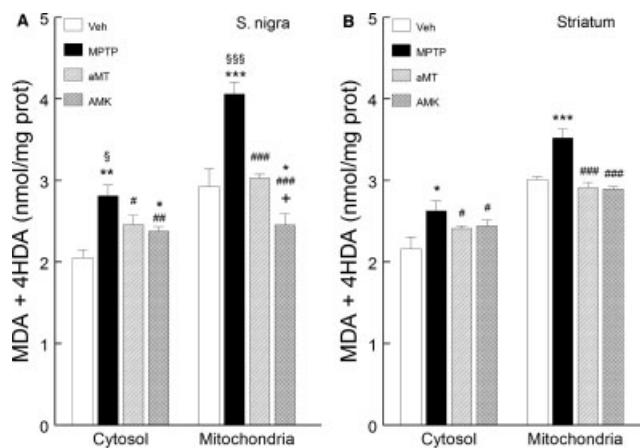


Fig. 4. LPO levels as assessed by malondialdehyde (MDA) and 4-hydroxynonenal (4HDA) measurements in SN and ST. **A:** MPTP treatment induced a significant increase in LPO levels in cytosol and mitochondria from SN. The changes in LPO resulting from MPTP were counteracted by aMT and AMK administration. In this case, AMK effect was significantly greater than aMT in SN mitochondria. **B:** MPTP also increased nitrite levels in cytosol and mitochondria from ST, although to a lesser extent than in SN. The administration of aMT and AMK restored nitrites to control values. The changes in LPO parallel those of i-mtNOS and nitrites (Figs. 1–3); i.e., LPO was significantly greater in SN than in ST. The values represent mean \pm SEM from $n = 6$ measurements/group (each measurement was made in SN and ST mitochondria obtained from four animals and processed together; thus, in total 24 animals were used). $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, and $***P < 0.001$ vs. vehicle-treated mice; $\#P < 0.05$, $\##P < 0.01$, and $\###P < 0.001$ vs. MPTP-treated mice; $\dagger P < 0.05$ vs. aMT; $\$P < 0.05$ and $\$P < 0.001$ vs. ST.

DISCUSSION

The current report presents the first evidence in support of a role for i-mtNOS in the pathophysiology of PD. Specifically; our results demonstrate that, after MPTP administration, i-mtNOS is induced in the mitochondria of SN, leading to a high production of NO \cdot . In contrast, i-mtNOS was only slightly induced by MPTP in ST mitochondria. These differences in i-mtNOS induction between SN and ST correlated with the mitochondrial damage found in these brain nuclei. In fact, complex I inhibition, NO \cdot production, and LPO levels were significantly higher in SN than in ST after treatment with MPTP. Our data also show for the first time that treatment with AMK, a brain metabolite of aMT, was as efficient as aMT treatment in counteracting i-mtNOS induction, oxidative stress, and mitochondrial dysfunction induced by MPTP.

Biochemical abnormalities relevant to the pathogenesis of PD include mitochondrial dysfunction, free radical-mediated damage, excitotoxicity, and inflammation (Bogaerts et al., 2008; Schapira, 2008). The direct relation between mitochondrial dysfunction and PD came from the post-mortem description of complex I deficiency in the SN of patients with PD (Schapira et al., 1989). The cause of the complex I deficiency is

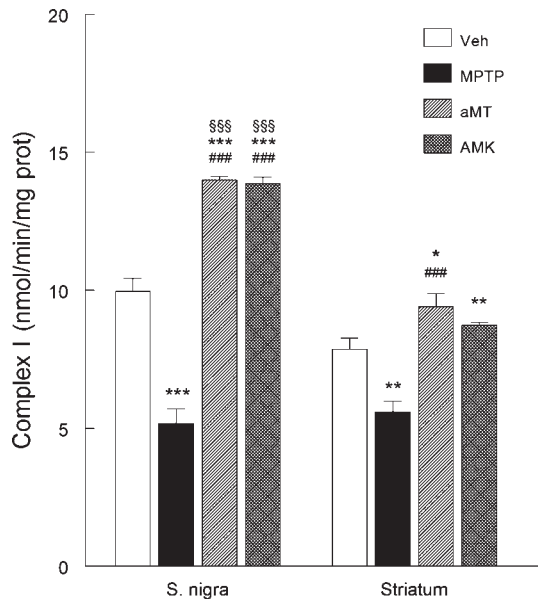


Fig. 5. Changes in the activity of complex I in SN and ST mitochondria. MPTP administration reduced significantly the activity of complex I in SN mitochondria and, to a lesser extent, in ST mitochondria. The administration of aMT and AMK restored complex I activity in SN from MPTP-treated mice, increasing it above the control. Both compounds, i.e., aMT and AMK, also restored complex I activity in ST of parkinsonian mice, and they increased the activity of the enzyme above the control values. The values represent mean \pm SEM from $n = 6$ measurements/group (each measurement was made in SN and ST mitochondria obtained from four animals and processed together; thus, in total 24 animals were used). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ vs. vehicle-treated mice; #### $P < 0.001$ vs. MPTP-treated mice; \$\$\$ $P < 0.001$ vs. SN.

unknown, although it lowers the threshold of apoptosis mediated by mitochondria mainly due to a decrease in ATP production and by the generation of ROS/RNS (Pathak and Davey, 2008). Together with complex I deficit, the NO \cdot derived from iNOS-expressing activated microglia plays a pivotal role in the cascade of deleterious events leading to SN dopaminergic neuronal death in the MPTP mouse model of PD (Zhang et al., 2006). Our results further support previous data showing a differential pattern of iNOS/nNOS activation (Liberatore et al., 1999). Thus, whereas SN showed a significant induction of iNOS and NO \cdot production after MPTP administration, ST, however, showed increased activity of nNOS instead of iNOS, with less NO \cdot production and damage.

Changes in iNOS expression induced by MPTP would be reflected in changes in mitochondrial NOS activity. Increasing evidence supports the presence of constitutive (c-mtNOS) and inducible (i-mtNOS) NOS isoforms in the mitochondria (Tatoyan and Giulivi, 1998; Kanai et al., 2001; Escames et al., 2003), which produce NO \cdot for regulatory purposes (Valdez et al., 2005; López et al., 2006). During inflammation, the expression and activity of i-mtNOS increase in parallel to cytosolic

iNOS, yielding high amounts of mitochondrial NO \cdot that produce a concentration-dependent inhibition of the respiratory complexes, ATP depletion, and cell death (Lisdero et al., 2005; López et al., 2006; Acuña-Castroviejo et al., 2007).

These data led us to explore the presence of i-mtNOS in the MPTP model of PD. In our hands, MPTP caused a significant increase in i-mtNOS activity in the mitochondria of SN and a lesser increase in ST mitochondria. Changes in mitochondrial NO \cdot level in both brain nuclei parallels those of i-mtNOS, and they depended on the i-mtNOS activity, because c-mtNOS remained unchanged or slightly decreased after MPTP. Thus, cytosolic changes in SN and ST during MPTP-induced inflammation are reflected in the mitochondria, at least in terms of i-mtNOS activity and NO \cdot production. The elevation of NO \cdot levels may, in turn, enhance MPP $^{+}$ -induced inhibition of complex I (Cleeter et al., 2001), which increases O $_2\cdot^{-}$ production and ONOO $^{-}$ formation. Moreover, the depletion of GSH, a main scavenger of mitochondrial ONOO $^{-}$, and other antioxidants that occur in the SN after MPTP (Jenner, 2003; Andersen, 2004) enhances the nitrosative stress causing an irreversible damage to critical cellular and mitochondrial enzymes such as complex I (Schapira et al., 1989; Foxton et al., 2007) and inducing dopaminergic cell death (Acuña-Castroviejo et al., 2001; Tretter et al., 2004; Shang et al., 2005). Alternatively, in the presence of transition metals such as Fe $^{2+}$ or Cu $^{2+}$ a reaction of O $_2\cdot^{-}$ with H $_2$ O $_2$ results in the production of hydroxyl radical (HO \cdot), probably the most reactive and harmful of all ROS. This pathway probably explains the higher levels of LPO found in SN mitochondria compared with ST, because of the high content of iron in the former.

Independently of whether mitochondrial dysfunction is a cause or consequence of neurodegeneration (Sun et al., 2007; Bogaerts et al., 2008), our results suggest that inflammation-induced i-mtNOS is probably related to mitochondrial failure in the MPTP model of PD (Przedborski et al., 2004). In fact, MPTP reduced complex I activity by 48% and 29% in SN and ST, respectively, and this different degree of inhibition agrees well with the different i-mtNOS activity and oxidative/nitrosative stress observed in SN and ST mitochondria of mice treated with MPTP. Thus, therapeutic approaches to reduce the progression of mitochondrial dysfunction in this model of PD should address three important targets: 1) to recover complex I activity to normalize ATP production, 2) to reduce/scavenge ROS generation by these mitochondria to prevent further oxidative damage, and 3) to reduce i-mtNOS activity and NO \cdot production.

In previous reports, we showed that aMT administration counteracted nigrostriatal damage induced by MPTP in mice, restoring locomotor activity (Acuña-Castroviejo et al., 1997; Khaldy et al., 2003). Neuroprotection by aMT against MPTP-induced neuronal injury was partially related to its ability to scavenge the HO \cdot produced during DA autooxidation (Reiter, 1998;

Khaldy et al., 2000). There is now evidence that the antioxidant capacity of aMT not only is based on a direct radical detoxification but includes manifold effects, such as the increase of antioxidant enzymes GPx and GRd (Antolin et al., 1996; Velkov et al., 2009). Moreover, several of the aMT metabolites, in addition to AMK, and including 3-hydroxymelatonin, and AFMK are likewise free radical scavengers (Tan et al., 2007; Peyrot and Ducrocq, 2008). With regard to the anti-inflammatory effects of aMT, the most important feature is its inhibition of iNOS expression (Crespo et al., 1999). Moreover, aMT administration also prevented i-mtNOS induction in sepsis, avoiding respiratory chain dysfunction and preserving ATP production (Acuña-Castroviejo et al., 2001; Escames et al., 2003; López et al., 2006). The indoleamine also increases the activity of the respiratory complexes, counteracts the oxidative stress, and maintains the mitochondrial GSH pool under different experimental conditions both in vivo and in vitro (Martín et al., 2000). These antioxidant and anti-inflammatory properties of aMT are relevant in mitochondrial physiology, and they may play a neuroprotective role in PD (Bogaerts et al., 2008). To evaluate further the mechanism(s) involved in the neuroprotective role of aMT in PD, we analyzed here the effects of aMT on mitochondrial damage and i-mtNOS induction in the same experimental paradigm. We also evaluated the effects of AMK, a brain metabolite of aMT that exerts some of the actions previously attributed to aMT, including the inhibition of NOS activity (León et al., 2000, 2006).

When administered, aMT and AMK reduced iNOS induction in SN and prevented the increase in both i-mtNOS activity and NO \cdot levels in SN and ST mitochondria of mice treated with MPTP. The effects of AMK were significantly greater than those of aMT, mainly in SN mitochondria. With regard to nNOS/c-mtNOS, aMT and AMK reduced nNOS activity in SN and ST, and they decreased c-mtNOS activity in mitochondria from SN and ST, although this reduction was significantly smaller than in the case of i-mtNOS. The nitrosative/oxidative stress reduction after the therapeutic intervention with aMT and its metabolite in MPTP-treated mice further prevented the mitochondrial damage in these mice, which was reflected in the decreased LPO levels. In this case, AMK was also more efficient than aMT in SN, the area showing higher LPO levels. The greater oxidative stress in mitochondria of SN compared with ST in the MPTP group also correlated with a greater inhibition of the complex I activity in the former. In this case, aMT and AMK administration not only counteracted the complex I deficit resulting from MPTP but increased its activity above control values. This phenomenon probably depends on the dose of the two compounds used, because a dose-dependent effect of aMT on complex I activity was described elsewhere (Martín et al., 2002). It is interesting to note that a typical finding in the SN of post-mortem PD patients was a decrease in complex I proteins (Mizuno et al., 1989).

The recovery of the complex I activity after aMT administration shown here may also be accompanied by the increase in complex I protein reported elsewhere (Martín et al., 2002).

In summary, our results show for the first time the existence of an i-mtNOS increase in SN and, to a lesser extent, in ST in the MPTP model of PD that was related, at least in part, to an oxidative/nitrosative mitochondrial stress and functional impairment. The results also show for the first time that AMK is a potent inhibitor of i-mtNOS activity and a more efficient NO scavenger than its precursor aMT (Hardeland et al., 2007). These data confirm recent observations suggesting that AMK is a brain metabolite of aMT that exerts some of the actions of the indoleamine (León et al., 2006). Our results further support the iNOS induction in SN and nNOS induction in ST of mice treated with MPTP (Liberatore et al., 1999). Given the effects of aMT and AMK in our MPTP model, as well as previously described effects in different models of sepsis (Escames et al., 2003), it is reasonable to predict their efficacy in other neurodegenerative diseases characterized by inflammation and mitochondrial impairment. Moreover, the recent report showing that mitochondria take up aMT in a concentration- and time-dependent manner (López et al., 2009) further supports a specific role for the indoleamine and its metabolite in this organelle. In conclusion, we provide here the first evidence of a therapeutic benefit of i-mtNOS inhibition by aMT and AMK in PD and, by logical extension, the clinical need for more selective i-mtNOS antagonists.

ACKNOWLEDGMENTS

V.T. and L.C.L. are postdoctoral fellow from the Ministerio de Educación (Spain).

REFERENCES

- Acuña-Castroviejo D, Coto-Montes A, Gaia Monti M, Ortiz GG, Reiter RJ. 1997. Melatonin is protective against MPTP-induced striatal and hippocampal lesions. *Life Sci* 60: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* 30:65-74.
- Acuña-Castroviejo D, Escames G, Rodríguez MI, López LC. 2007. Melatonin role in the mitochondrial function. *Front Biosci* 12:947-963.
- Barrientos A. 2002. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med* 10:18-25.
- Antolín I, Rodríguez C, Saínz RM, Mayo JC, Uría H, Kotler ML, Rodríguez-Colunga MJ, Tolivia D, Menéndez-Peláez A. 1996. Neurohormone melatonin prevents cell damage: effect on gene expression for antioxidant enzymes. *FASEB J* 10:882-890.
- Barrientos A. 2002. In vivo and in organello assessment of OXPHOS activities. *Methods* 26:307-316.
- Baydas G, Reiter RJ, Nedzvetskii VS, Yasar A, Tuzcu M, Ozveren F, Canatan H. 2003. Melatonin protects the central nervous system of rats against toluene-containing thinner intoxication by reducing reactive gliosis. *Toxicol Lett* 137:169-174.
- Bogaerts V, Theuns J, van Broeckhoven C. 2008. Genetic finding in Parkinson's disease and translation into treatment: a loading role for mitochondria? *Genes Brain Behav* 7:129-151.

- Borlongan CV, Yamamoto M, Takei N, Kumazaki M, Ungsuparkorn C, Hida H, Sanberg PR, Nishino H. 2000. Glial cell survival is enhanced during melatonin-induced neuroprotection against cerebral ischemia. *FASEB J* 14:1307–1317.
- Bredt DS, Snyder SH. 1992. NO mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:9030–9033.
- Brown GC, Bal-Price A. 2003. Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide, glutamate, and mitochondria. *Mol Neurobiol* 27:325–355.
- Brown GC, Borutaite V. 2004. Inhibition of mitochondrial respiratory complex I by nitric oxide, peroxynitrite and S-nitrosothiols. *Biochim Biophys Acta* 1658:44–49.
- Cleeter MW, Cooper JM, Schapira AH. 2001. Nitric oxide enhances MPP⁺ inhibition of complex I. *FEBS Lett* 504:50–52.
- 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* 13:1537–1546.
- Dehmer T, Lindenau J, Haid S, Dichgan J, Schulz JB. 2000. Deficiency of inducible nitric oxide synthase protects against MPTP toxicity in vivo. *J Neurochem* 74:2213–2216.
- Entrena A, Camacho ME, Carrión MD, López-Cara LC, Velasco G, León J, Escames G, Acuña-Castroviejo D, Tapias V, Gallo MA, Vivó A, Espinosa A. 2005. Kynurenamines as neural nitric oxide synthase inhibitors. *J Med Chem* 48:8174–8181.
- Escames G, León J, Macías M, Khaldy H, Acuña-Castroviejo D. 2003. Melatonin counteracts lipopolysaccharide-induced expression and activity of mitochondrial nitric oxide synthase in rats. *FASEB J* 17:932–934.
- Esterbauer H, Cheeseman KH. 1990. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 186:407–421.
- Foxton RH, Land JM, Heales SJR. 2007. Tetrahydrobiopterin availability in Parkinson's disease and Alzheimer's disease; potential pathogenic mechanisms. *Neurochem Res* 32:751–756.
- Green LC, Ruiz de Luzuriaga K, Wagner DA, Rand W, Istfan N, Young VR, Tannenbaum SR. 1981. Nitrate biosynthesis in man. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:7764–7768.
- Greenamyre JT, Sherer TB, Betarbet R, Panov AV. 2001. Complex I and Parkinson's disease. *IUBMB Life* 52:135–141.
- Hardeland R, Backhaus C, Fadavi A. 2007. Reactions of the NO redox forms BO⁺, *NO and HNO (protonated NO⁻) with the melatonin metabolite B1-acetyl-5-methoxykynurenamine. *J Pineal Res* 43:382–388.
- Hirata F, Hayaishi O, Tokuyama T, Seno S. 1974. In vitro and in vivo formation of two new metabolites of melatonin. *J Biol Chem* 249:1311–1313.
- Jenner P. 2003. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 53:S26–S36.
- Kanai AJ, Pearce LL, Clemens PR, Birder LA, VanVibber MM, Choi SY, de Groat WC, Peterson J. 2001. Identification of a neuronal nitric oxide synthase in isolated cardiac mitochondria using electrochemical detection. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:14126–14131.
- 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* 29:100–107.
- Khaldy H, Escames G, León J, Bijkdaouene L, Acuña-Castroviejo D. 2003. Synergistic effects of melatonin and deprenyl against MPTP-induced mitochondrial damage and DA depletion. *Neurobiol Aging* 24:491–500.
- León J, Macías M, Escames G, Camacho E, Khaldy H, Martín M, Espinosa A, Gallo MA, Acuña-Castroviejo D. 2000. Structure-related inhibition of calmodulin-dependent neuronal nitric-oxide synthase activity by melatonin and synthetic kynurenines. *Mol Pharmacol* 58:967–975.
- León J, Escames G, Rodríguez MI, López LC, Tapias V, Entrena A, Camacho E, Carrión MD, Gallo MA, Espinosa A, Tan DX, Reiter RJ, Acuña-Castroviejo D. 2006. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase activity by N¹-acetyl-5-methoxykynurenamine, a brain metabolite of melatonin. *J Neurochem* 98:2023–2033.
- Liberatore GT, Jackson-Lewis V, Vukosavic S, Mandir AS, Vila M, McAuliffe WG, Dawson VL, Dawson TM, Przedborski S. 1999. Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. *Nat Med* 5:1403–1409.
- Lisdero CL, Carreras MC, Meulemans A, Melani M, Aubier M, Boczkowski J, Poderoso JJ. 2004. The mitochondrial interplay of ubiquinol and nitric oxide in endotoxemia. *Methods Enzymol* 382:67–81.
- López A, García JA, Escames G, Venegas C, Ortiz F, López LC, Acuña-Castroviejo D. 2009. Melatonin protects the mitochondria from oxidative damage reducing oxygen consumption, membrane potential, and superoxide anion production. *J Pineal Res* 46:188–198.
- López LC, Escames G, Tapias V, Utrilla P, León J, Acuña-Castroviejo D. 2006. Identification of an inducible nitric oxide synthase in diaphragm mitochondria from septic mice. Its relation with mitochondrial dysfunction and prevention by melatonin. *Int J Biochem Cell Biol* 38:267–278.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275.
- Martín M, Macías M, Escames G, León J, Acuña-Castroviejo D. 2000. Melatonin but not vitamins C and E maintains glutathione homeostasis in t-butyl hydroperoxide-induced mitochondrial oxidative stress. *FASEB J* 14:1677–1679.
- 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* 34:348–357.
- Mizuno Y, Ohta S, Tanaka M, Takamiya S, Suzuli K, Sato T, Oya H, Ozawa T, Kagawa Y. 1989. Deficiencies in complex I subunits of the respiratory chain in Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 163:1450–1455.
- Muravchick S, Levy RJ. 2006. Clinical implications of mitochondrial dysfunction. *Anesthesiology* 105:819–837.
- Pathak RU, Davey GP. 2008. Complex I and energy thresholds in the brain. *Biochim Biophys Acta* 1777:777–782.
- Peyrot F, Ducrocq C. 2008. Potential role of tryptophan derivatives in stress responses characterized by the generation of reactive oxygen and nitrogen species. *J Pineal Res* 45:235–246.
- Przedborski S, Tieu K, Perier C, Vila M. 2004. MPTP as a mitochondrial neurotoxic model of Parkinson's disease. *J Bioenerg Biomembr* 36:375–379.
- Rego AC, Oliveira CR. 2003. Mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species in excitotoxicity and apoptosis: implications for the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Neurochem Res* 28:1563–1574.
- Reiter RJ. 1998. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Prog Neurobiol* 56:359–384.
- Ressmeyer AR, Mayo JC, Zelosko V, Sainz RM, Tan DX, Poeggeler B, Antolín I, Szisik BK, Reiter RJ, Hardeland R. 2003. Antioxidant properties of the melatonin metabolite N¹-acetyl-5-methoxykynurenamine (AMK): scavenging of free radicals and prevention of protein destruction. *Redox Rep* 8:205–213.
- Rice JE, Lindsay JG. 1997. Subcellular fractionation of mitochondria. In: Graham JM, Rickwood D, editors. *Subcellular fractionation*. New York: Oxford University Press. p 107–142.
- Schapira AHV. 2008. Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Lancet* 7:97–109.

- Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Jenner P, Clark JB, Marsden CD. 1989. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Lancet* 1:12–69.
- Shang T, Kotamraju S, Zhao H, Kalivendi SV, Hillard CJ, Kalyanaraman B. 2005. Sepiapterin attenuates 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced apoptosis in neuroblastoma cells transfected with neuronal NOS: role of tetrahydrobiopterin, nitric oxide, and proteasome activation. *Free Radic Biol Med* 39:1059–1074.
- Sun K, Johnson BS, Gunn TM. 2007. Mitochondrial dysfunction precedes neurodegeneration on *mahogunin* (*Mgml*) mutant mice. *Neurobiol Aging* 28:1840–1852.
- Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi WB, Karbownik M, Calvo JR. 2000. Significance of melatonin in antioxidative defense system: reactions and products. *Biol Signals Recept* 9:137–159.
- Tan DX, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ, Reiter RJ. 2007. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J Pineal Res* 42:28–42.
- Tatoyan A, Giulivi C. 1998. Purification and characterization of a nitric-oxide synthase from rat liver mitochondria. *J Biol Chem* 273:11044–11048.
- Thomas B, Mohanakumar PK. 2004. Melatonin protects against oxidative stress caused by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in the mouse nigrostriatum. *J Pineal Res* 36:25–32.
- Tretter L, Sipos I, Adam-Vizi V. 2004. Initiation of neuronal damage by complex I deficiency and oxidative stress in Parkinson's disease. *Neurochem Res* 29:569–577.
- Valdez LB, Zaobornyj T, Boveris A. 2005. Functional activity of mitochondrial nitric oxide synthase. *Methods Enzymol* 396:444–455.
- Velkov ZA, Velkov YZ, Galunska BT, Paskalev DN, Tadjer AV. 2009. Melatonin: quantum-chemical and biochemical investigation of antioxidant activity. *Eur J Med Chem* doi: 10.1016/j.ejmech.2008.12.017.
- Zhang L, Dawson VL, Dawson TM. 2006. Role of nitric oxide in Parkinson's disease. *Pharmacol Ther* 109:33–41.

Discusión

1. Daños provocados por el MPTP.

En el presente estudio se ha empleado la neurotoxina MPTP para inducir un modelo de Parkinson en ratones controles para la iNOS (C57/Bl6) y la nNOS (B6.129SF2/J) así como ratones deficientes en iNOS (B6.129S4-Nos1^{tm1Plh}/J) y nNOS (B6.129P2-Nos2^{tm1Lau}/J). Este modelo reproduce las características bioquímicas y fisiopatológicas más importantes encontradas en pacientes de Parkinson, lo que, entre otros aspectos, nos permite estudiar la disfunción mitocondrial.

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

Los somas de las neuronas dopaminérgicas se hayan principalmente localizados en la SNpc y proyectan sus axones hacia el ST (Dauer & Przedborski, 2003). Según su mecanismo farmacológico, el MPP+, metabolito tóxico del MPTP, es recaptado selectivamente por las neuronas dopaminérgicas. El metabolismo de la DA por la MAOB y la autooxidación no enzimática de la misma supone un extra oxidativo en las neuronas dopaminérgicas ya que también conducen a la formación de radicales tóxicos (Liu *et al.*, 2002).

El daño oxidativo mitocondrial es la principal característica fisiopatológica en la EP, y constituye la vía final común de muchos de los procesos que concurren en la EP y llevan a la inhibición del complejo I. Por ejemplo, durante la excitotoxicidad producida por la activación del receptor NMDA, que conlleva a una producción excesiva de NO• y daño oxidativo/nitrosativo NMDA (Atlante *et al.*, 2001), y que se reproduce con la administración de MPTP. Se han encontrado evidencias que indican que el MPP+ es el responsable de la síntesis de OH• en el cerebro de ratón, el radical libre más activo y tóxico (Acuna-Castroviejo *et al.*, 1995; Tretter *et al.*, 2004). Un incremento en la producción de ROS produce una depleción de las defensas antioxidantes celulares, lo que conduce a su vez a un aumento general del estrés oxidativo y del daño mediado por radicales en la célula. Por ello, los depuradores de radicales libres podrían ser de gran interés en el tratamiento de esta patología, lo que podría traducirse en una mejora en la actividad del complejo I.

La CTE en la mitocondria es el lugar donde mayor cantidad de ROS se generan, concretamente en el complejo I y III, debido al ciclo redox de la ubiquinona (Acuna-Castroviejo *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2002), donde se origina la fuga de electrones y formación de ROS. Estos ROS incluyen O₂^{•-}, OH• y H₂O₂, debido a la reducción parcial del oxígeno por uno, dos y tres electrones, respectivamente (Adam-Vizi *et al.*, 2006). Altos niveles de O₂^{•-} favorecen su reacción con el NO y la producción de ONOO⁻, generando consecuentemente un mayor daño a la CTE (Boczkowski *et al.*, 1999; Brown, 2001; Germaine Escames *et al.*, 2003).

Por otro lado, el $O_2^{\bullet-}$ formado por la fuga de electrones puede dismutarse a H_2O_2 por acción de la Mn-SOD en la mitocondria o por la CuZn-SOD en el citosol. En presencia de metales de transición, la reacción del $O_2^{\bullet-}$ con el H_2O_2 da lugar a OH^{\bullet} , probablemente el más reactivo y perjudicial de todas las ROS (Acuna-Castroviejo *et al.*, 1995;Tretter *et al.*, 2004). El H_2O_2 también puede generarse en el citosol por la MAO. El enzima se encuentra en la membrana externa de la mitocondria y es especialmente importante para la formación de ROS en las neuronas, donde hay disponibilidad de monoaminas.

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

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

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

El MPP+ es un inhibidor selectivo del complejo I, lo que a su vez genera ROS que amplifican dicho daño. De todas formas, se desconoce si la inhibición del complejo I mitocondrial es el primer mecanismo por el cual el MPP+ condiciona la muerte de las neuronas dopaminérgicas en el modelo agudo de Parkinson inducido por MPTP. Existen amplias evidencias que indican que cuando la deficiencia en el complejo I persiste durante un extenso período de tiempo, la acumulación de ROS puede ser significativa, y la disfunción del complejo I podría ser fundamental en la patogénesis de la EP ya que incrementa el estrés oxidativo y hace vulnerables a las células a agresiones por excitotoxicidad (Atlante *et al.*, 2001;Sherer *et al.*, 2002). A su vez, estos radicales libres podrían acumularse en estas células,

dañando la mitocondria y creando un círculo vicioso. La SNpc también contiene altos niveles de hierro el cual es un cofactor necesario en la formación de OH^\bullet a través de la reacción de Fenton, lo que induce la producción de OH^\bullet en neuronas dopaminérgicas y el consiguiente daño (Speciale, 2002).

Este círculo vicioso existente entre la deficiencia del complejo I y la producción de ROS en la cadena respiratoria puede intensificar el estrés oxidativo hasta que se produzca un daño irreversible mitocondrial y de otros componentes celulares y así causar la pérdida selectiva de neuronas dopaminérgicas (Jenner, 2003;Tretter *et al.*, 2004). Incluso un aumento relativamente pequeño en la concentración de ROS, si persiste, podría ser crítico para iniciar una cascada de eventos que conducen a la muerte celular. Además, la inhibición sistémica del complejo I podría dañar la respiración y la síntesis de ATP (Leon *et al.*, 2004).

Como mecanismo patogénico añadido, la disminución del ATP causada por inhibición del complejo I podría aumentar la toxicidad por glutamato mediante la liberación del bloqueo por Mg^{2+} en el receptor NMDA. Tiene lugar entonces un flujo de Ca^{2+} el cual podría activar la NOS neuronal y por tanto, la producción de NO^\bullet , incrementando la inhibición del complejo I (Brown *et al.*, 2006;Escames *et al.*, 2004).

Podemos deducir que la NOS citosólica y la mitocondrial (tanto sus componentes constitutivos como inducibles) están implicadas en el desarrollo de la EP y que el NO^\bullet producido por estas enzimas puede ser responsable, al menos en parte, del daño oxidativo que se genera en dicho modelo. En este estudio comprobamos que la administración de MPTP provoca un incremento del 256.5 % de la actividad NOS total en SN y un 192.9 % en ST, en ambos casos a expensas del aumento de la actividad del componente inducible, especialmente de la isoforma mitocondrial. Queda demostrado así el efecto del MPTP en el aumento de la i-mtNOS y, por tanto, de la producción mitocondrial de NO^\bullet . Prueba de ello son los resultados obtenidos en ratones deficientes para la iNOS, carentes de la actividad inducible, donde la actividad NOS total no se ve modificada. Existen datos que apoyan que el elevado NO^\bullet mitocondrial conduce a la muerte de las neuronas dopaminérgicas por daño oxidativo/nitrosativo (Zhang *et al.*, 2006). Al propio mecanismo para aumentar la iNOS/i-mtNOS derivado del MPTP, el proceso de excitotoxicidad glutamatérgica puede también contribuir al aumento de la actividad de la mtNOS, debido a la captación del Ca^{2+} por parte de las mitocondrias que se encuentran localizadas cerca de los receptores NMDA (Escames *et al.*, 2004).

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

En nuestro estudio se ha observado que durante la EP inducida por MPTP tiene lugar una inhibición de la actividad de la CTE, concretamente del complejo I, tanto en ST (26%) y, en mayor grado (66%), en la SN, en ratones controles. Asimismo, en animales deficientes en nNOS e iNOS, los valores de inhibición de la actividad del complejo I son similares a los encontrados

en ratones normales, con una reducción del 37% en ST y del 61% en SN en los primeros, y del 43.18% en ST y 73.37% en SN en el segundo. Ello indica que, si bien el proceso inflamatorio en la EP puede ser importante para la viabilidad neuronal y disfunción mitocondrial, en nuestro modelo de Parkinson inducido por MPTP la deficiencia en iNOS/i-mtNOS no afecta a la actividad del complejo I, que sigue inhibida. Probablemente se debe a que la inhibición mantenida por el MPP+ solapa el efecto beneficioso que la ausencia de iNOS pueda tener.

Junto a esta disfunción en la CTE debido a la inhibición de la actividad del complejo I, se observa un daño oxidativo a macromoléculas, en este caso a lípidos (observado por la inducción de la LPO). Este aumento de LPO se produce tanto en ST como en SN, aunque el daño es mayor en esta última, donde la inducción de la i-mtNOS es máxima y probablemente responsable de ese aumento de LPO. La

Al medir los niveles de MDA y 4HDA en mitocondrias, estamos cuantificando la LPO de las membranas mitocondriales, aunque la interna contiene sólo un 25% de lípidos en su composición, siendo la mayor parte proteínas (Ardail *et al.*, 1990). La LPO puede dar lugar a una reducción de la densidad de los receptores integrados en las membranas y además alterar la fluidez de las mismas, afectando al mecanismo de acoplamiento en el caso de la membrana mitocondrial interna. Este aumento de LPO, que también muestran los pacientes con EP, puede constituir parte de los mecanismos relacionados con la degeneración progresiva de las neuronas dopaminérgicas (Dexter *et al.*, 1989).

Pero el estrés oxidativo resultante del aumento en la producción de radicales libres no sólo daña a los lípidos, sino también a otras macromoléculas como son las proteínas y el ADN. El estrés oxidativo también puede activar la poli ADP-ribosa sintetasa (PARS), enzima nuclear que interviene en los procesos de reparación del ADN, añadiendo unidades de ADP-ribosa a proteínas nucleares como las histonas (Strosznajder *et al.*, 2005).

Siendo la mitocondria la principal fuente de ROS y al mismo tiempo, diana de todo el proceso neurodegenerativo, sería lógico pensar en un posible daño al genoma mitocondrial. Tratando de estudiar este daño provocado por el MPTP, se evaluó el índice DNA mitocondrial/DNA nuclear, como indicador de la depleción del material genético de la mitocondria. Se usaron para el estudio los valores obtenidos en ratones controles, deficientes en iNOS y deficientes en nNOS. Los principales cambios se observaron a nivel de la SN en ratones controles y deficientes en nNOS, con un incremento significativo de la depleción de mtDNA, lo que podría resultar en actividades reducidas del complejo I de la CTE. Este aumento, en cambio, no se aprecia en los ratones deficientes en iNOS, probablemente más protegidos del daño nitrosativo.

En función de los resultados obtenidos acerca del daño provocado por el MPTP, se podría actuar sobre tres puntos clave para reducir o disminuir la progresión de la EP: 1) restaurando la actividad del complejo I; 2) inhibiendo la formación de ROS en la mitocondria, y 3) reduciendo la producción de NO*.

2. Efectos de la melatonina en el modelo de EP con MPTP

La melatonina presenta determinadas propiedades que la hacen una molécula interesante a ensayar en modelos en los que coexisten el estrés oxidativo y las alteraciones en la función mitocondrial, como es el caso de la EP:

- es hidro- y lipofílica, y cruza fácilmente la barrera hematoencefálica (Borlongan *et al.*, 2000; Baydas *et al.*, 2003; Acuna-Castroviejo *et al.*, 2003), lo que hace que ST y SN sean accesibles tras la administración sistémica de la indoleamina.

- es un depurador directo de radicales libres [OH[•], peroxilo (ROO[•]), O₂^{•-}, NO[•], ONOO⁻, ácido peroxinitroso (ONOOH) y O₂] (Zang *et al.*, 1998; Reiter *et al.*, 2000), y también posee un efecto antioxidante indirecto (Tan *et al.*, 2000a; Poeggeler *et al.*, 1994).

La melatonina actúa como un antioxidante fisiológico y farmacológico, y parece ser que sus mecanismos antioxidantes son de mayor complejidad que los que presentan los antioxidantes clásicos. Depura radicales libres de forma directa por diferentes vías como pueden ser la donación de electrones, la captación de electrones o del propio radical libre, reacciones de adición y sustitución. El AFMK y el AMK, dos metabolitos de la melatonina, también presentan una importante capacidad para depurar radicales libres y por tanto propiedades neuroprotectoras (Acuna-Castroviejo *et al.*, 2003; Guenther *et al.*, 2005). La melatonina contrarresta la producción de radicales OH[•] durante la autooxidación de la DA *in vitro* (Miller *et al.*, 1996; Khaldy *et al.*, 2000) donando un electrón para transformarse en el catión radical indolilo (aMT^{•+}), que a su vez, reacciona con el anión O₂^{•-} para formar un producto estable, el AFMK. La melatonina depura también el H₂O₂ para formar igualmente AFMK (Tan *et al.*, 2000b), e incluso puede depurar dos moléculas de OH[•] para formar 3-hidroximelatonina cíclica (3-OHaMT) (Tan *et al.*, 1998). Además se ha demostrado que el AMK tiene un efecto inhibitor sobre la actividad nNOS en condiciones fisiológicas (Leon *et al.*, 2006).

La mayoría de los estudios publicados utilizan multidosas inyectadas de MPTP en pocas horas y se ha demostrado que se trata de tiempo suficiente para causar neurotoxicidad (Ma *et al.*, 2009; Morgan & Nelson, 2001). Entre las acciones descritas de la melatonina en el cerebro, se encuentra también la inhibición de la excitación de los receptores NMDA y ello podría estar en conexión con su actividad antiexcitotóxica (Escames *et al.*, 2004), importante en la EP (Mayo *et al.*, 2005). Además, la melatonina previene la autooxidación de la DA (Khaldy *et al.*, 2000), reduciendo el estrés oxidativo nigroestriatal. Adicionalmente, la melatonina también induce una disminución del transportador de DA (down-regulation), impidiendo de la entrada de MPTP y dando lugar a una menor toxicidad (Lin *et al.*, 2008).

Por otro lado, la melatonina aumenta la eficiencia de la CTE mitocondrial, potenciando la actividad de los cuatro complejos respiratorios de forma dosis dependiente (Lopez *et al.*, 2009), y contrarresta la inhibición del complejo I inducida por MPTP (Khaldy *et al.*, 2003; Srinivasan *et al.*, 2005; Tapias *et al.*, 2009), un efecto que preserva la producción de ATP y la supervivencia celular (Acuna-Castroviejo *et al.*, 2001). En nuestro estudio, la administración de melatonina contrarresta el efecto del MPTP sobre el complejo I, tanto en la SN como en el

ST, y este efecto ha sido independiente de la cepa de animal usado. Por tanto, el efecto neuroprotector de la melatonina a nivel del complejo I mitocondrial parece ser directo, no interviniendo su actividad antioxidante frente a los radicales libres de oxígeno y de nitrógeno dependientes de la iNOS/i-mtNOS.

Atendiendo a los resultados de expresión de los distintos complejos respiratorios, los ratones deficientes en iNOS presentan un comportamiento similar en la expresión del complejo I en SN y ST tras el tratamiento con MPTP, que refleja un intento de contrarrestar la inhibición de su actividad por el MPTP. De hecho el mayor aumento en SN puede indicar el mayor grado de inhibición de la actividad de dicho complejo por la neurotoxina. Por el mismo motivo, la melatonina aumenta más la expresión en SN que en ST.

Los resultados en los ratones deficientes en iNOS arrojan nuevas expectativas. La expresión basal en SN y ST es más baja que en sus ratones control, siendo los efectos del MPTP y la melatonina también más discretos. Esto podría llevar a pensar en una posible relación entre el NO[•] derivado de la iNOS y el control de la expresión del complejo I. Sin embargo, en los ratones deficientes en nNOS, la expresión del complejo I apenas se ve modificada en la SN aunque muestran una expresión basal mayor que también es visible de manera similar en el ST. Así pues, parece que la ausencia de NO[•] derivado de la iNOS inhibe la expresión del complejo I, mientras que la falta de NO[•] derivado de la nNOS aumenta dicha expresión, abriendo nuevas vías de regulación que deben analizarse.

En cuanto a los resultados encontrados en los complejos III y IV de la CTE, la expresión en los ratones controles y deficientes en iNOS y nNOS es similar, dentro de ciertos límites, no encontrando las grandes diferencias presentes a nivel del complejo I. Con respecto al complejo V, los ratones deficientes en nNOS vuelven a mostrar una expresión más baja que los controles, tanto en SN como en ST.

De todo ello, cabe deducir que el NO[•], proveniente de iNOS o de nNOS, parece controlar la expresión del complejo I y V, no afectando de manera tan significativa a los otros complejos de la CTE. Estos resultados justifican un análisis futuro más detallado de los mecanismos que pueden estar involucrados en dicha regulación, y hacen pensar que la modulación de la actividad de la CTE por el NO[•] va más allá que el simple papel regulatorio directo de este gas sobre los complejos respiratorios.

La melatonina inhibe las isoformas constitutivas de la NOS, tanto la nNOS citosólica como la c-mtNOS de forma dosis dependiente mediante un mecanismo que implica su unión con el complejo Ca²⁺-CAM. La melatonina inhibe también la expresión de la iNOS/i-mtNOS. En consecuencia, la melatonina contrarresta el estrés oxidativo inducido por el daño mitocondrial (Acuna-Castroviejo *et al.*, 2001; Escames *et al.*, 2006; Lopez *et al.*, 2006). Los datos de este estudio muestran cómo la melatonina previene selectivamente el incremento en la actividad NOS inducible en ST y SN de ratones controles y deficientes en nNOS. Sin embargo, no modifica la actividad total en ratones deficientes en iNOS.

El incremento en la masa mitocondrial y el contenido en mtDNA son procesos moleculares tempranos en células humanas en respuesta al estrés oxidativo (Lee *et al.*, 2000).

Existen una serie de mecanismos que controlan el sistema genético mitocondrial y relaciones intergenómicas que han sido recientemente resumidos (Garesse & Vallejo, 2001). Defectos en el metabolismo mitocondrial pueden estar asociados también a alteraciones del mtDNA o del nDNA, ya sea en los procesos de transcripción, translación o replicación (Schapira, 1998) con alteraciones de la LPO, enzimas del ciclo de Krebs y del sistema de fosforilación oxidativa como resultado final. La melatonina también previno la depleción de mtDNA inducida por el MPTP en aquellos casos donde fue detectada, principalmente a nivel de la SN en ratones control y deficientes en nNOS, probablemente gracias a su capacidad antioxidante, tanto directa como indirecta, potenciadora de la CTE y protectora de la función mitocondrial. En diversos experimentos se ha demostrado que la melatonina, tanto 'in vivo' como en mitocondrias incubadas 'in vitro', estimula la transcripción del mtDNA, aumentando la expresión del ácido ribonucleico mensajero (mRNA) correspondiente a las subunidades I, II y III del complejo IV de la CTE que están codificados por el mtDNA (Escames *et al.*, 2006).

Entre otros efectos, la melatonina es capaz de contrarrestar la inducción de LPO (Khalidy *et al.*, 2003; Leon *et al.*, 2004; Escames *et al.*, 2006); reduce la gliosis ya que neutraliza esos radicales libres (Baydas *et al.*, 2006); es capaz de modular la actividad y expresión de varios enzimas antioxidantes, incluyendo la SOD y la GPx, y a la vez inhibe el daño al DNA (Antolin *et al.*, 1996; Reiter *et al.*, 2000) protegiendo así a la neurona de la apoptosis (Leon *et al.*, 2004).

Estos resultados avalan el uso terapéutico neuroprotector de la indolamina en pacientes con la EP como cotratamiento con terapias convencionales, ya que la melatonina es una sustancia endógena, no tóxica y antioxidante y lo más importante, sin efectos secundarios conocidos. Adicionalmente, se han llevado a cabo estudios epidemiológicos de individuos que han usado melatonina diariamente; al presentar una toxicidad muy baja y al ser mucho más barata que otros fármacos que se prescriben, podría ser probada frente al desarrollo o progresión de la EP.

3. Efectos de los compuestos sintéticos en el modelo de EP con MPTP.

El siguiente desafío es encontrar fármacos clínicamente útiles que puedan minimizar la producción mitocondrial de ROS y reducir la inflamación, sin afectar al funcionamiento normal mitocondrial. Para ello, es necesario encontrar antagonistas específicos y selectivos para la iNOS/i-mtNOS, y nNOS/c-mtNOS.

En esta línea, hemos estudiado 'in vitro' numerosos análogos sintéticos de la melatonina frente a la iNOS y nNOS recombinantes, de los cuales hemos evaluado 'in vivo', algunos de ellos analizando las actividades de la nNOS e iNOS y también, según su selectividad. Entre los compuestos evaluados, encontramos la pirazolina QFF-124 y los pirroles QFF-205 y QFF-212.

En el estudio 'in vivo' realizado con los diferentes compuestos sintéticos analizados y cuya síntesis ya ha sido publicada (Camacho *et al.*, 2002; Camacho *et al.*, 2004; Carrion *et*

al., 2004; Entrena *et al.*, 2005), hemos encontrado diferencias significativas; de esta manera, podríamos resumir que:

- Todos los compuestos recuperan el nivel control de la actividad del complejo I inhibido por el tratamiento con MPTP en ratones, tanto en el ST como en la SN, siendo especialmente llamativo el efecto de la pirazolina QFF-124.

- En cuanto al estudio de la NOS, el citosol de ST apenas muestra cambios en el componente inducible, ya que como se ha demostrado en varios trabajos, prácticamente no se produce daño a nivel de iNOS, pero sí existe una inhibición de la nNOS por parte el pirrol QFF-212 y, muy significativamente, por la pirazolina QFF-124. En el citosol de la SN, que es donde realmente se produce el daño, los mismos compuestos que inhibían la nNOS, van a presentar el mismo comportamiento, aunque cabe matizar que la proporción de inhibición es mayor que en el caso del ST; incluso el QFF-205 (pirrol) inhibe la nNOS. Nuevamente, la pirazolina QFF-124 es el compuesto más eficaz inhibiendo la nNOS por lo que podría considerarse un antagonista 'in vivo' de dicha isoforma.

Pero el estudio de mayor interés se encuentra en la mitocondria, donde el comportamiento de estos compuestos presenta modificaciones respecto del citosol; en el caso de la c-mtNOS de la SN, donde apenas se encuentran cambios tras el tratamiento con MPTP, destacamos los pirroles QFF-205 y más significativamente el QFF-212, como inhibidores de esta actividad constitutiva, reduciéndola por debajo de los niveles control. Con respecto a la c-mtNOS estriatal, estos mismos dos compuestos vuelven a destacar con una inhibición similar a la encontrada en SN. Finalmente, todos los compuestos, QFF-124, QFF-205 y QFF-212, muestran capacidad para inhibir la i-mtNOS en ST, del mismo modo que en el citosol. Por otro lado, del estudio del comportamiento de los compuestos frente a la i-mtNOS de la SN, concluimos que los más eficaces son los pirroles QFF-205 y QFF-212 mientras que la pirazolina QFF-124 reduce los valores de actividad inducible hasta recuperar los valores control.

- Finalmente analizamos la LPO como marcador de estrés oxidativo. En el caso del citosol (ST y SN), se puede observar que todos los compuestos QFF-124 disminuyen la LPO, siendo los pirroles QFF-205 y QFF-212 más eficaces recuperando los valores control o incluso mejorándolos en el caso del ST. Ya, en la mitocondria (tanto de ST como de SN), todos los compuestos inhiben la LPO, presentando menor eficacia la pirazolina QFF-124, especialmente en mitocondria de ST, y siendo nuevamente más eficaces los pirroles QFF-205 y QFF-212, que sitúan dichos niveles de LPO por debajo de los valores controles.

En consecuencia, hemos analizado 'in vitro' una serie de compuestos que muestran actividad biológica 'in vivo', y de los resultados obtenidos puede derivarse la síntesis de nuevas estructuras con actividad neuroprotectora más potente y susceptibles de ser usados en la clínica.

Conclusiones

De los resultados obtenidos se deducen las siguientes conclusiones:

1. Además de inhibir el complejo I, la administración de MPTP induce la iNOS citosólica y mitocondrial, paralelo al aumento de los niveles de NO• y de LPO. Todos estos fenómenos reproducen la fisiopatología de la EP y confirman la existencia de un proceso oxidativo e inflamatorio en esta enfermedad neurodegenerativa.
2. Las mitocondrias de SN y ST poseen una mtNOS con un componente constitutivo (c-mtNOS) y otro inducible (i-mtNOS). Fundamentalmente la i-mtNOS se induce como consecuencia de la administración de MPTP en la SN.
3. Los resultados en ratones deficientes en iNOS y nNOS muestran que el complejo I sigue inhibido tras la administración de MPTP. Ello indica que, si bien el proceso inflamatorio puede ser importante para la viabilidad neuronal y disfunción mitocondrial en la EP, en nuestro modelo de parkinson inducido por MPTP la deficiencia en iNOS/i-mtNOS no afecta a la actividad del complejo I, que sigue inhibida. Probablemente se debe a que el MPP• sigue presente, solapando el efecto beneficioso que la ausencia de iNOS y/o nNOS pueda tener.
4. La melatonina contrarresta los efectos neurotóxicos del MPTP, recuperando la actividad del complejo I, e inhibiendo la actividad de la iNOS/i-mtNOS, reduciendo la producción de NO•. Además, la melatonina normaliza el status redox mitocondrial, impidiendo la depleción de DNA mitocondrial. Estos resultados avalan de una manera más concreta las propiedades neuroprotectoras de la melatonina.
5. La administración de melatonina contrarresta el efecto del MPTP sobre el complejo I, tanto en la SN como en el ST, y este efecto ha sido independiente de la presencia o ausencia de iNOS o nNOS. Por tanto, el efecto de la melatonina a este nivel parece ser directo, no interviniendo su actividad antioxidante frente a los radicales libres de oxígeno y de nitrógeno dependientes de la iNOS/i-mtNOS.
6. Los cambios encontrados en la expresión de los complejos respiratorios indican que el NO•, proveniente de iNOS o de nNOS, parece controlar la expresión del complejo I y V, no afectando de manera tan significativa a los otros complejos de la CTE. Estos resultados justifican un análisis futuro más detallado de los mecanismos que pueden estar involucrados en dicha regulación, y hacen pensar que la modulación de la actividad de la CTE por el NO• va más allá que el simple papel regulatorio directo de este gas sobre los complejos respiratorios.
7. Los estudios con los análogos sintéticos de la melatonina nos han proporcionado una serie de compuestos con actividad selectiva *in vitro* frente a la iNOS/nNOS. Los resultados de los compuestos ensayados *in vivo* muestran capacidad neuroprotectora en el modelo aquí utilizado. Esos resultados abren una nueva línea en la búsqueda de nuevos agentes farmacológicos que puedan ser usados en la clínica de la EP.

From the obtained results the following conclusions are deduced:

1. Besides complex I inhibition, MPTP administration increases the inducible NOS isoform in cytosol and mitochondria, with a parallel increase in NO• and LPO levels. All these phenomena reproduce the physiopathology of Parkinson disease and confirm the existence of an inflammatory process in this neurologic degeneration.
2. The mitochondria from ST and SN possess a mtNOS with a constitutive (c-mtNOS) and inducible (i-mtNOS) components. The administration of MPTP mainly increases the inducible form.
3. The results found in iNOS and nNOS ko mice suggest that complex I activity remains low after the MPTP administration. Thus, although the inflammatory process can be important for the neuronal viability and mitochondrial dysfunction in PD, we cannot detect any improvement in complex I activity in NOS deficient mice, probably due to the presence of MPP+, which maintains the inhibition of the complex I.
4. Melatonin administration counteracts the deleterious effects of MPTP, recovering the activity of complex I, inhibiting the activity of iNOS/i-mtNOS, and, therefore, diminishing the production of NO•. Moreover, melatonin administration also normalizes the mitochondrial redox status, preventing the mitochondrial depletion of DNA. These results supports the neuroprotective properties of melatonin.
5. Melatonin administration counteracts the effect of the MPTP on complex I activity in both SN and ST; this effect was similar in both iNOS/nNOS wild-type and mutant mice. Therefore, the effect of melatonin on complex I seems to be direct, independently of the antioxidative properties against oxygen and nitrogen free radicals derived from iNOS/i-mtNOS.
6. The changes found in the expression of the respiratory complexes indicate that NO• seems to control, at some extent, the expression of complex I and V, without affecting the other respiratory complexes. These results further support that the modulation of the CTE by NO• goes beyond the simple direct regulatory paper of this gas on the activity of the complex IV.
7. The data obtained from the studies with the synthetic melatonin analogues have provided a series of compounds with selective activity against iNOS/nNOS *“in vitro”*. The results of *“in vivo”* studies show the neuroprotective capacity of some of them. These results open a new line in the search of new pharmacological agents with neuroprotective properties susceptible against PD.

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**, 40-47.
- Acuna-Castroviejo D, Coto-Montes A, Gaia MM, Ortiz GG, & Reiter RJ (1997). Melatonin is protective against MPTP-induced striatal and hippocampal lesions. *Life Sci* **60**, L23-L29.
- Acuna-Castroviejo D, Escames G, Carazo A, Leon J, Khaldy H, & Reiter RJ (2002). Melatonin, mitochondrial homeostasis and mitochondrial-related diseases. *Curr Top Med Chem* **2**, 133-151.
- Acuna-Castroviejo D, Escames G, Leon J, Carazo A, & Khaldy H (2003). Mitochondrial regulation by melatonin and its metabolites. *Adv Exp Med Biol* **527**, 549-557.
- Acuna-Castroviejo D, Escames G, Lopez LC, Hitos AB, & Leon J (2005). Melatonin and nitric oxide: two required antagonists for mitochondrial homeostasis. *Endocrine* **27**, 159-168.
- Acuna-Castroviejo D, Escames G, Macias M, Munoz HA, Molina CA, Arauzo M, & Montes R (1995). Cell protective role of melatonin in the brain. *J Pineal Res* **19**, 57-63.
- Acuna-Castroviejo D, Lowenstein PR, Rosenstein R, & Cardinali DP (1986). Diurnal variations of benzodiazepine binding in rat cerebral cortex: disruption by pinealectomy. *J Pineal Res* **3**, 101-109.
- Acuna-Castroviejo D, Martin M, Macias M, Escames G, Leon J, Khaldy H, & Reiter RJ (2001). Melatonin, mitochondria, and cellular bioenergetics. *J Pineal Res* **30**, 65-74.
- Acuna-Castroviejo D, Pablos MI, Menendez-Pelaez A, & Reiter RJ (1993). Melatonin receptors in purified cell nuclei of liver. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* **82**, 253-256.
- Acuna-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**, 100-112.
- Adam-Vizi V, Chinopoulos C. Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species (2006). *Trends Pharmacol Sci*; **27**:639-645
- Agid Y (1995). [Aging, disease and nerve cell death]. *Bull Acad Natl Med* **179**, 1193-1203.
- Alam ZI, Daniel SE, Lees AJ, Marsden DC, Jenner P, & Halliwell B (1997a). A generalised increase in protein carbonyls in the brain in Parkinson's but not incidental Lewy body disease. *J Neurochem* **69**, 1326-1329.
- Alam ZI, Jenner A, Daniel SE, Lees AJ, Cairns N, Marsden CD, Jenner P, & Halliwell B (1997b). Oxidative DNA damage in the

- parkinsonian brain: an apparent selective increase in 8-hydroxyguanine levels in substantia nigra. *J Neurochem* **69**, 1196-1203.
- Albin RL, Young AB, & Penney JB (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, DeLong MR, & Strick PL (1986). Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Annu Rev Neurosci* **9**, 357-381.
- Alonso R. (1999). La glándula pineal. In *Fisiología Humana*, ed. McGraw-Hill - Interamericana, pp. 891-901.
- Antolin I, Mayo JC, Sainz RM, del Brio ML, Herrera F, Martín V, & Rodríguez C (2002). Protective effect of melatonin in a chronic experimental model of Parkinson's disease. *Brain Res* **943**, 163-173.
- Antolin I, Rodríguez C, Sainz RM, Mayo JC, Uria H, Kotler ML, Rodríguez-Colunga MJ, Tolivia D, & Menéndez-Peláez A (1996). Neurohormone melatonin prevents cell damage: effect on gene expression for antioxidant enzymes. *FASEB J* **10**, 882-890.
- Anton-Tay F (1974). Melatonin: effects on brain function. *Adv Biochem Psychopharmacol* **11**, 315-324.
- Ardail D, Privat JP, Egret-Charlier M, Levrat C, Lerme F, & Louisot P (1990). Mitochondrial contact sites. Lipid composition and dynamics. *J Biol Chem* **265**, 18797-18802.
- Ariano MA, Stromski CJ, Smyk-Randall EM, & Sibley DR (1992). D2 dopamine receptor localization on striatonigral neurons. *Neurosci Lett* **144**, 215-220.
- Armstrong KJ & Niles LP (2002). Induction of GDNF mRNA expression by melatonin in rat C6 glioma cells. *Neuroreport* **13**, 473-475.
- Atlante A, Calissano P, Bobba A, Giannattasio S, Marra E, & Passarella S (2001). Glutamate neurotoxicity, oxidative stress and mitochondria. *FEBS Lett* **497**, 1-5.
- Balaban RS, Nemoto S, & Finkel T (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* **120**, 483-495.
- Barbeau A, Dallaire 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**, 1529-1538.
- Barcia GC & Herrero Ezquerro MT (2004). [Inflammation and Parkinson's disease]. *Rev Neurol* **38**, 545-553.

- Bates TE, Loesch A, Burnstock G, & Clark JB (1995). Immunocytochemical evidence for a mitochondrially located nitric oxide synthase in brain and liver. *Biochem Biophys Res Commun* **213**, 896-900.
- Baydas G, Ozer M, Yasar A, Koz ST, & Tuzcu M (2006). Melatonin prevents oxidative stress and inhibits reactive gliosis induced by hyperhomocysteinemia in rats. *Biochemistry (Mosc)* **71 Suppl 1**, S91-S95.
- Baydas G, Reiter RJ, Nedzvetskii VS, Yasar A, Tuzcu M, Ozveren F, & Canatan H (2003). Melatonin protects the central nervous system of rats against toluene-containing thinner intoxication by reducing reactive gliosis. *Toxicol Lett* **137**, 169-174.
- Beal MF (2003). Mitochondria, oxidative damage, and inflammation in Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* **991**, 120-131.
- Becker-Andre M, Wiesenberg I, Schaeren-Wiemers N, Andre E, Missbach M, Saurat JH, & Carlberg C (1994). Pineal gland hormone melatonin binds and activates an orphan of the nuclear receptor superfamily. *J Biol Chem* **269**, 28531-28534.
- Benitez-King G, Rios A, Martinez A, & Anton-Tay F (1996). In vitro inhibition of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II activity by melatonin. *Biochim Biophys Acta* **1290**, 191-196.
- Benot S, Molinero P, Soutto M, Goberna R, & Guerrero JM (1998). Circadian variations in the rat serum total antioxidant status: correlation with melatonin levels. *J Pineal Res* **25**, 1-4.
- 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.
- Bergen WG (1971). The in vitro effect of dieldrin on respiration of rat liver mitochondria. *Proc Soc Exp Biol Med* **136**, 732-735.
- Bergman H, Wichmann T, & DeLong MR (1990). Reversal of experimental parkinsonism by lesions of the subthalamic nucleus. *Science* **249**, 1436-1438.
- Bertorello A & Aperia A (1990). Inhibition of proximal tubule Na(+)-K(+)-ATPase activity requires simultaneous activation of DA1 and DA2 receptors. *Am J Physiol* **259**, F924-F928.
- Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, & Greenamyre JT (2000). Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci* **3**, 1301-1306.

- 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**, 34-40.
- Boczkowski J, Lisdero CL, Lanone S, Samb A, Carreras MC, Boveris A, Aubier M, & Poderoso JJ (1999). Endogenous peroxynitrite mediates mitochondrial dysfunction in rat diaphragm during endotoxemia. *FASEB J* **13**, 1637-1646.
- Borlongan CV, Yamamoto M, Takei N, Kumazaki M, Ungsuparkorn C, Hida H, Sanberg PR, & Nishino H (2000). Glial cell survival is enhanced during melatonin-induced neuroprotection against cerebral ischemia. *FASEB J* **14**, 1307-1317.
- Braak H, Braak E, Yilmazer D, de Vos RA, Jansen EN, & Bohl J (1996). New aspects of pathology in Parkinson's disease with concomitant incipient Alzheimer's disease. *J Neural Transm Suppl* **48**, 1-6.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Bredt DS & Snyder SH (1989). Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 9030-9033.
- Brookes PS, Levonen AL, Shiva S, Sarti P, & Darley-Usmar VM (2002). Mitochondria: regulators of signal transduction by reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radic Biol Med* **33**, 755-764.
- Brown GC (2001). Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase. *Biochim Biophys Acta* **1504**, 46-57.
- Brown TP, Rumsby PC, Capleton AC, Rushton L, & Levy LS (2006). Pesticides and Parkinson's disease--is there a link? *Environ Health Perspect* **114**, 156-164.
- Bueler H (2009). Impaired mitochondrial dynamics and function in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Exp Neurol* **218**, 235-246.
- Bus JS & Gibson JE (1984). Paraquat: model for oxidant-initiated toxicity. *Environ Health Perspect* **55**, 37-46.
- Cadenas E & Davies KJ (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med* **29**, 222-230.
- Cagnoli CM, Atabay C, Kharlamova E, & Manev H (1995). Melatonin protects neurons from singlet oxygen-induced apoptosis. *J Pineal Res* **18**, 222-226.
- Camacho E, Leon J, Carrion A, Entrena A, Escames G, Khaldy H, Acuna-Castroviejo D, Gallo MA, & Espinosa A (2002). Inhibition of nNOS activity in rat brain by synthetic kynurenines: structure-

- activity dependence. *J Med Chem* **45**, 263-274.
- Camacho ME, Leon J, Entrena A, Velasco G, Carrion MD, Escames G, Vivo A, Acuna-Castroviejo D, Gallo MA, & Espinosa A (2004). 4,5-dihydro-1H-pyrazole derivatives with inhibitory nNOS activity in rat brain: synthesis and structure-activity relationships. *J Med Chem* **47**, 5641-5650.
- Carlberg C, Hooft van HR, Staple JK, DeLamarter JF, & Becker-Andre M (1994). RZR, a new family of retinoid-related orphan receptors that function as both monomers and homodimers. *Mol Endocrinol* **8**, 757-770.
- Carlberg C & Wiesenberg I (1995). The orphan receptor family RZR/ROR, melatonin and 5-lipoxygenase: an unexpected relationship. *J Pineal Res* **18**, 171-178.
- CARLSON AJ (1955). Science versus life. *J Am Med Assoc* **157**, 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 Aspects Med* **25**, 125-139.
- Carrion MD, Camacho ME, Leon J, Escames G, Tapias V, & Acuna-Castroviejo D (2004). Synthesis and iNOS/nNOS inhibitory activities of new benzoylpyrazoline derivatives. *Tetrahedron* **60**, 4069.
- Cazevielle C, Safa R, & Osborne NN (1997). Melatonin protects primary cultures of rat cortical neurones from NMDA excitotoxicity and hypoxia/reoxygenation. *Brain Res* **768**, 120-124.
- Chen ST, Chuang JI, Hong MH, & Li EI (2002). Melatonin attenuates MPP+-induced neurodegeneration and glutathione impairment in the nigrostriatal dopaminergic pathway. *J Pineal Res* **32**, 262-269.
- Chiba K, Trevor AJ, & Castagnoli N, Jr. (1985). Active uptake of MPP+, a metabolite of MPTP, by brain synaptosomes. *Biochem Biophys Res Commun* **128**, 1228-1232.
- Chinopoulos C & Adam-Vizi V (2006). Calcium, mitochondria and oxidative stress in neuronal pathology. Novel aspects of an enduring theme. *FEBS J* **273**, 433-450.
- Conway S, Drew JE, Mowat ES, Barrett P, Delagrangé P, & Morgan PJ (2000). Chimeric melatonin mt1 and melatonin-related receptors. Identification of domains and residues participating in ligand binding and receptor activation of the melatonin mt1 receptor. *J Biol Chem* **275**, 20602-20609.
- Corrigan FM, Wienburg CL, Shore RF, Daniel SE, & Mann D (2000). Organochlorine insecticides in substantia nigra in Parkinson's disease. *J Toxicol Environ Health A* **59**, 229-234.

- Costello S, Cockburn M, Bronstein J, Zhang X, & Ritz B (2009). Parkinson's disease and residential exposure to maneb and paraquat from agricultural applications in the central valley of California. *Am J Epidemiol* **169**, 919-926.
- Coulom H & Birman S (2004). Chronic exposure to rotenone models sporadic Parkinson's disease in *Drosophila melanogaster*. *J Neurosci* **24**, 10993-10998.
- Crespo E, Macias M, Pozo D, Escames G, Martin M, Vives F, Guerrero JM, & Acuna-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* **13**, 1537-1546.
- Cuzzocrea S & Reiter RJ (2002). Pharmacological actions of melatonin in acute and chronic inflammation. *Curr Top Med Chem* **2**, 153-165.
- 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**, 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.
- Darío Acuña-Castroviejo, Miguel Martín, Manuel Macías, Germaine Escames, Josefa León, Huda Khaldy, & Russel J.Reiter. Melatonin, mitochondria, and cellular bioenergetics. 2001.
Ref Type: Generic
- Dauer W & Przedborski S (2003). Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* **39**, 889-909.
- Davies KJ (1995). Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem Soc Symp* **61**, 1-31.
- Deng WG, Tang ST, Tseng HP, & Wu KK (2006). Melatonin suppresses macrophage cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression by inhibiting p52 acetylation and binding. *Blood* **108**, 518-524.
- Dexter DT, Carter CJ, Wells FR, Javoy-Agid F, Agid Y, Lees A, Jenner P, & Marsden CD (1989). Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. *J Neurochem* **52**, 381-389.
- Dexter DT, Holley AE, Flitter WD, Slater TF, Wells FR, Daniel SE, Lees AJ, Jenner P, & Marsden CD (1994a). Increased levels of lipid hydroperoxides in the parkinsonian substantia nigra: an HPLC and ESR study. *Mov Disord* **9**, 92-97.
- Dexter DT, Sian J, Rose S, Hindmarsh JG, Mann VM, Cooper JM, Wells FR, Daniel SE, Lees AJ, Schapira AH, & . (1994b). Indices of oxidative stress and mitochondrial function in individuals

- with incidental Lewy body disease. *Ann Neurol* **35**, 38-44.
- Di Monte DA (2003). The environment and Parkinson's disease: is the nigrostriatal system preferentially targeted by neurotoxins? *Lancet Neurol* **2**, 531-538.
- Drechsel DA & Patel M (2008). Role of reactive oxygen species in the neurotoxicity of environmental agents implicated in Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med* **44**, 1873-1886.
- Duchen MR (1999). Contributions of mitochondria to animal physiology: from homeostatic sensor to calcium signalling and cell death. *J Physiol* **516** (Pt 1), 1-17.
- Dunigan CD & Shamo AE (1996). Identification of the major transport pathway for the parkinsonism-inducing neurotoxin 1-methyl-4-phenylpyridinium. *Neuroscience* **75**, 37-41.
- Dykens JA (1994). Isolated cerebral and cerebellar mitochondria produce free radicals when exposed to elevated CA²⁺ and Na⁺: implications for neurodegeneration. *J Neurochem* **63**, 584-591.
- Ebadi M, Srinivasan SK, & Baxi MD (1996). Oxidative stress and antioxidant therapy in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* **48**, 1-19.
- Entrena A, Camacho ME, Carrion MD, Lopez-Cara LC, Velasco G, Leon J, Escames G, Acuna-Castroviejo D, Tapias V, Gallo MA, Vivo A, & Espinosa A (2005). Kynurenamines as neural nitric oxide synthase inhibitors. *J Med Chem* **48**, 8174-8181.
- Escames G, Acuna-Castroviejo D, Lopez LC, Tan DX, Maldonado MD, Sanchez-Hidalgo M, Leon J, & Reiter RJ (2006a). Pharmacological utility of melatonin in the treatment of septic shock: experimental and clinical evidence. *J Pharm Pharmacol* **58**, 1153-1165.
- Escames G, Leon J, Lopez LC, & Acuna-Castroviejo D (2004). Mechanisms of N-methyl-D-aspartate receptor inhibition by melatonin in the rat striatum. *J Neuroendocrinol* **16**, 929-935.
- Escames G, Leon J, Macias M, Khaldy H, & Acuna-Castroviejo D (2003). Melatonin counteracts lipopolysaccharide-induced expression and activity of mitochondrial nitric oxide synthase in rats. *FASEB J* **17**, 932-934.
- Escames G, Lopez LC, Tapias V, Utrilla P, Reiter RJ, Hitos AB, Leon J, Rodriguez MI, & Acuna-Castroviejo D (2006b). Melatonin counteracts inducible mitochondrial nitric oxide synthase-dependent mitochondrial dysfunction in skeletal muscle of septic mice. *J Pineal Res* **40**, 71-78.
- Escobar A (2003). Fisiopatología y neuropatología de la enfermedad de parkinson. *Rev Mex Neuroci* **4**, 295-303.
- Entrena A, Camacho ME, Carrion MD, Lopez-Cara LC, Velasco G, Leon J,

- Esterbauer H & Cheeseman KH (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* **186**, 407-421.
- Estornell E, Fato R, Pallotti F, & Lenaz G (1993). Assay conditions for the mitochondrial NADH:coenzyme Q oxidoreductase. *FEBS Lett* **332**, 127-131.
- Fahn S & Sulzer D (2004). Neurodegeneration and neuroprotection in Parkinson disease. *NeuroRx* **1**, 139-154.
- Fariello RG (1988). Experimental support for the implication of oxidative stress in the genesis of parkinsonian syndromes. *Funct Neurol* **3**, 407-412.
- Fedorow H, Tribl F, Halliday G, Gerlach M, Riederer P, & Double KL (2005). Neuromelanin in human dopamine neurons: comparison with peripheral melanins and relevance to Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* **75**, 109-124.
- Finocchiaro LM & Glikin GC (1998). Intracellular melatonin distribution in cultured cell lines. *J Pineal Res* **24**, 22-34.
- 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**, 1309-1315.
- Frandsen U, Lopez-Figueroa M, & Hellsten Y (1996). Localization of nitric oxide synthase in human skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* **227**, 88-93.
- Fujiwara M, Shibata M, Watanabe Y, Nukiwa T, Hirata F, Mizuno N, & Hayaishi O (1978). Indoleamine 2,3-dioxygenase. Formation of L-kynurenine from L-tryptophan in cultured rabbit pineal gland. *J Biol Chem* **253**, 6081-6085.
- Gaal J.C., Smith K.R., & Pearson C.K. (1987). Cellular euthanasia mediated by a nuclear enzyme: a central role for nuclear ADP-ribosylation in cellular metabolism. *Trends Biochem Sci* **12**, 129.
- Garcia JJ, Reiter RJ, Pie J, Ortiz GG, Cabrera J, Sainz RM, & Acuna-Castroviejo D (1999). Role of pinoline and melatonin in stabilizing hepatic microsomal membranes against oxidative stress. *J Bioenerg Biomembr* **31**, 609-616.
- Garesse R & Vallejo CG (2001). Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes. *Gene* **263**, 1-16.
- Gasser T (2005). Genetics of Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol* **18**, 363-369.
- Gerfen CR, Keefe KA, & Gauda EB (1995). D1 and D2 dopamine receptor function in the striatum: coactivation of D1- and D2-dopamine receptors on separate populations of neurons results in potentiated immediate early gene

- response in D1-containing neurons. *J Neurosci* **15**, 8167-8176.
- Germaine Escames, Josefa León, Manuel Macías, Huda Khaldy, & Darío Acuña-Castroviejo. Melatonin counteracts lipopolysaccharide-induced expression and activity of mitochondrial nitric oxide synthase in rats. 2003.
Ref Type: Generic
- Gibbs FP & Vriend J (1981). The half-life of melatonin elimination from rat plasma. *Endocrinology* **109**, 1796-1798.
- Giguere V, Tini M, Flock G, Ong E, Evans RM, & Otulakowski G (1994). Isoform-specific amino-terminal domains dictate DNA-binding properties of ROR alpha, a novel family of orphan hormone nuclear receptors. *Genes Dev* **8**, 538-553.
- Goetz CG, Tanner CM, Stebbins GT, & Buchman AS (1988). Risk factors for progression in Parkinson's disease. *Neurology* **38**, 1841-1844.
- 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.
- Gotz ME, Freyberger A, & Riederer P (1990). Oxidative stress: a role in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* **29**, 241-249.
- Graham DG (1978). Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones. *Mol Pharmacol* **14**, 633-643.
- Graybiel AM (1990). Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. *Trends Neurosci* **13**, 244-254.
- Greenamyre JT, Sherer TB, Betarbet R, & Panov AV (2001). Complex I and Parkinson's disease. *IUBMB Life* **52**, 135-141.
- Gu M, Cooper JM, Taanman JW, & Schapira AH (1998). Mitochondrial DNA transmission of the mitochondrial defect in Parkinson's disease. *Ann Neurol* **44**, 177-186.
- Guenther AL, Schmidt SI, Laatsch H, Fotso S, Ness H, Ressmeyer AR, Poeggeler B, & Hardeland R (2005). Reactions of the melatonin metabolite AMK (N1-acetyl-5-methoxykynuramine) with reactive nitrogen species: formation of novel compounds, 3-acetamidomethyl-6-methoxycinnolinone and 3-nitro-AMK. *J Pineal Res* **39**, 251-260.
- H.Y.CHUNG, J.Y.LEE, J.H.JE, K.J.JUNG, & B.P.YU. Induction of endothelial iNOS by 4-Hydroxyhexenal through NF-kB activation. 2004.
Ref Type: Generic

- Halestrap AP, Gillespie JP, O'Toole A, & Doran E (2000). Mitochondria and cell death: a pore way to die? *Symp Soc Exp Biol* **52**, 65-80.
- Halliwell B (1992). Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* **59**, 1609-1623.
- Halliwell B (1997). What nitrates tyrosine? Is nitrotyrosine specific as a biomarker of peroxynitrite formation in vivo? *FEBS Lett* **411**, 157-160.
- Halliwell B & Gutteridge JM (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* **219**, 1-14.
- Hardeland R & Pandi-Perumal SR (2005). Melatonin, a potent agent in antioxidative defense: actions as a natural food constituent, gastrointestinal factor, drug and prodrug. *Nutr Metab (Lond)* **2**, 22.
- Haynes V, Elfering S, Traaseth N, & Giulivi C (2004). Mitochondrial nitric-oxide synthase: enzyme expression, characterization, and regulation. *J Bioenerg Biomembr* **36**, 341-346.
- Herrera F, Sainz RM, Mayo JC, Martin V, Antolin I, & Rodriguez C (2001). Glutamate induces oxidative stress not mediated by glutamate receptors or cystine transporters: protective effect of melatonin and other antioxidants. *J Pineal Res* **31**, 356-362.
- Hirata F, Hayaishi O, Tokuyama T, & Seno S (1974). In vitro and in vivo formation of two new metabolites of melatonin. *J Biol Chem* **249**, 1311-1313.
- Hirsch E, Graybiel AM, & Agid YA (1988). Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. *Nature* **334**, 345-348.
- HORNYKIEWICZ O (1963). [The tropical localization and content of noradrenalin and dopamine (3-hydroxytyramine) in the substantia nigra of normal persons and patients with Parkinson's disease]. *Wien Klin Wochenschr* **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 Bull* **62**, 55-61.
- 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.
- Hunot S, Dugas N, Faucheux B, Hartmann A, Tardieu M, Debre P, Agid Y, Dugas B, & Hirsch EC (1999). FcepsilonRII/CD23 is expressed in Parkinson's disease and induces, in vitro, production of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in glial cells. *J Neurosci* **19**, 3440-3447.
- Hunot S & Hirsch EC (2003). Neuroinflammatory processes in

- Parkinson's disease. *Ann Neurol* **53 Suppl 3**, S49-S58.
- Iacovitti L, Stull ND, & Johnston K (1997). Melatonin rescues dopamine neurons from cell death in tissue culture models of oxidative stress. *Brain Res* **768**, 317-326.
- Iacovitti L, Stull ND, & Mishizen A (1999). Neurotransmitters, KCl and antioxidants rescue striatal neurons from apoptotic cell death in culture. *Brain Res* **816**, 276-285.
- Ianas O, Olinescu R, & Badescu I (1991). Melatonin involvement in oxidative processes. *Endocrinologie* **29**, 147-153.
- Imam SZ, el-Yazal J, Newport GD, Itzhak Y, Cadet JL, Slikker W, Jr., & Ali SF (2001). Methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity: role of peroxynitrite and neuroprotective role of antioxidants and peroxynitrite decomposition catalysts. *Ann N Y Acad Sci* **939**, 366-380.
- Jain A, Martensson J, Stole E, Auld PA, & Meister A (1991). Glutathione deficiency leads to mitochondrial damage in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 1913-1917.
- Jellinger KA (2004). Lewy body-related alpha-synucleinopathy in the aged human brain. *J Neural Transm* **111**, 1219-1235.
- Jenner P (2003). Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol* **53 Suppl 3**, S26-S36.
- Jin BK, Shin DY, Jeong MY, Gwag MR, Baik HW, Yoon KS, Cho YH, Joo WS, Kim YS, & Baik HH (1998). Melatonin protects nigral dopaminergic neurons from 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+) neurotoxicity in rats. *Neurosci Lett* **245**, 61-64.
- Joo WS, Jin BK, Park CW, Maeng SH, & Kim YS (1998). Melatonin increases striatal dopaminergic function in 6-OHDA-lesioned rats. *Neuroreport* **9**, 4123-4126.
- Josefa León, Darío Acuña-Castroviejo, Rosa M.Sainz, Juan C.Mayo, Dun-Xian Tan, & Russel J.Reiter. Melatonin and mitochondrial function. 2004.
Ref Type: Generic
- Josefa León, Germaine Escames, María I.Rodríguez, Luis C.López, Víctor Tapias, Antonio Entrena, Encarna Camacho, María D.Carrión, Miguel A.Gallo, Antonio Espinosa, Dun-Xian Tan, Russel J.Reiter, & Darío Acuña-Castroviejo. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase activity by N1-acetyl-5-methoxykynuramine, a brain metabolite of melatonin. 2006.
Ref Type: Generic
- Josefa León, Manuel Macías, Germaine Escames, Encarna Camacho, Huda Khaldy, Miguel Martín, Antonio Espinosa, Miguel A.Gallo, & Darío Acuña-Castroviejo. Structure-Related Inhibition of Calmodulin-Dependent

- Neuronal Nitric-Oxide Synthase Activity by Melatonin and Synthetic Kynurenines. 2000.
- Ref Type: Generic
- Jou MJ, Peng TI, Reiter RJ, Jou SB, Wu HY, & Wen ST (2004). Visualization of the antioxidative effects of melatonin at the mitochondrial level during oxidative stress-induced apoptosis of rat brain astrocytes. *J Pineal Res* **37**, 55-70.
- Kapp W (1992). The history of drugs for the treatment of Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* **38**, 1-6.
- Khaldy H, Escames G, Leon J, Bikjdaouene L, & Acuna-Castroviejo D (2003). Synergistic effects of melatonin and deprenyl against MPTP-induced mitochondrial damage and DA depletion. *Neurobiol Aging* **24**, 491-500.
- Khaldy H, Escames G, Leon J, Vives F, Luna JD, & Acuna-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**, 100-107.
- Kim JS, He L, & Lemasters JJ (2003). Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* **304**, 463-470.
- Kim YS, Joo WS, Jin BK, Cho YH, Baik HH, & Park CW (1998). Melatonin protects 6-OHDA-induced neuronal death of nigrostriatal dopaminergic system. *Neuroreport* **9**, 2387-2390.
- Koppenol WH & Traynham JG (1996). Say NO to nitric oxide: nomenclature for nitrogen- and oxygen-containing compounds. *Methods Enzymol* **268**, 3-7.
- Kotler M, Rodriguez C, Sainz RM, Antolin I, & Menendez-Pelaez A (1998). Melatonin increases gene expression for antioxidant enzymes in rat brain cortex. *J Pineal Res* **24**, 83-89.
- Kvetnoy IM, Ingel IE, Kvetnaia TV, Malinovskaya NK, Rapoport SI, Raikhlin NT, Trofimov AV, & Yuzhakov VV (2002). Gastrointestinal melatonin: cellular identification and biological role. *Neuro Endocrinol Lett* **23**, 121-132.
- Langston JW & Ballard PA, Jr. (1983). Parkinson's disease in a chemist working with 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *N Engl J Med* **309**, 310.
- Le Couteur DG, McLean AJ, Taylor MC, Woodham BL, & Board PG (1999). Pesticides and Parkinson's disease. *Biomed Pharmacother* **53**, 122-130.
- Lee HC, Yin PH, Lu CY, Chi CW, & Wei YH (2000). Increase of mitochondria and mitochondrial DNA in response to oxidative stress in human cells. *Biochem J* **348 Pt 2**, 425-432.
- Leon J, Acuna-Castroviejo D, Escames G, Tan DX, & Reiter RJ (2005). Melatonin

- mitigates mitochondrial malfunction. *J Pineal Res* **38**, 1-9.
- Leon J, Acuna-Castroviejo D, Sainz RM, Mayo JC, Tan DX, & Reiter RJ (2004). Melatonin and mitochondrial function. *Life Sci* **75**, 765-790.
- Leon J, Escames G, Rodriguez MI, Lopez LC, Tapias V, Entrena A, Camacho E, Carrion MD, Gallo MA, Espinosa A, Tan DX, Reiter RJ, & Acuna-Castroviejo D (2006). Inhibition of neuronal nitric oxide synthase activity by N1-acetyl-5-methoxykynuramine, a brain metabolite of melatonin. *J Neurochem* **98**, 2023-2033.
- Leon J, Macias M, Escames G, Camacho E, Khaldy H, Martin M, Espinosa A, Gallo MA, & Acuna-Castroviejo D (2000). Structure-related inhibition of calmodulin-dependent neuronal nitric oxide synthase activity by melatonin and synthetic kynurenes. *Mol Pharmacol* **58**, 967-975.
- Leon J, Vives F, Crespo E, Camacho E, Espinosa A, Gallo MA, Escames G, & Acuna-Castroviejo D (1998). Modification of nitric oxide synthase activity and neuronal response in rat striatum by melatonin and kynurenine derivatives. *J Neuroendocrinol* **10**, 297-302.
- Lesage S & Brice A (2009). Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors. *Hum Mol Genet* **18**, R48-R59.
- Liberatore GT, Jackson-Lewis V, Vukosavic S, Mandir AS, Vila M, McAuliffe WG, Dawson VL, Dawson TM, & Przedborski S (1999). Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. *Nat Med* **5**, 1403-1409.
- Liebmann PM, Wolfler A, Felsner P, Hofer D, & Schauenstein K (1997). Melatonin and the immune system. *Int Arch Allergy Immunol* **112**, 203-211.
- Liou HH, Tsai MC, Chen CJ, Jeng JS, Chang YC, Chen SY, & Chen RC (1997). Environmental risk factors and Parkinson's disease: a case-control study in Taiwan. *Neurology* **48**, 1583-1588.
- Liu Y, Fiskum G, & Schubert D (2002). Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem* **80**, 780-787.
- Logroscino G (2005). The role of early life environmental risk factors in Parkinson disease: what is the evidence? *Environ Health Perspect* **113**, 1234-1238.
- Lopez A, Garcia JA, Escames G, Venegas C, Ortiz F, Lopez LC, & Acuna-Castroviejo D (2009). Melatonin protects the mitochondria from oxidative damage reducing oxygen consumption, membrane potential, and superoxide anion production. *J Pineal Res* **46**, 188-198.

- Lopez LC, Escames G, Tapias V, Utrilla P, Leon J, & Acuna-Castroviejo D (2006). Identification of an inducible nitric oxide synthase in diaphragm mitochondria from septic mice: its relation with mitochondrial dysfunction and prevention by melatonin. *Int J Biochem Cell Biol* **38**, 267-278.
- M.Martín, M.Macías, Germaine Escames, Russel J.Reiter, M.T Agapito, Genaro G.Ortiz, & Darío Acuña-Castroviejo. Melatonin-induced increased activity of the respiratory chain complexes I and IV can prevent mitochondrial damage induced by ruthenium red in vivo. 2000.
Ref Type: Generic
- Ma J, Shaw VE, & Mitrofanis J (2009). Does melatonin help save dopaminergic cells in MPTP-treated mice? *Parkinsonism Relat Disord* **15**, 307-314.
- 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**, 832-840.
- Marshall KA, Reiter RJ, Poeggeler B, Aruoma OI, & Halliwell B (1996). Evaluation of the antioxidant activity of melatonin in vitro. *Free Radic Biol Med* **21**, 307-315.
- Mastaloudis A, Leonard SW, & Traber MG (2001). Oxidative stress in athletes during extreme endurance exercise. *Free Radic Biol Med* **31**, 911-922.
- Mattson MP (1998). Modification of ion homeostasis by lipid peroxidation: roles in neuronal degeneration and adaptive plasticity. *Trends Neurosci* **21**, 53-57.
- Mayo JC, Sainz RM, Antoli I, Herrera F, Martin V, & Rodriguez C (2002). Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene expression. *Cell Mol Life Sci* **59**, 1706-1713.
- Mayo JC, Sainz RM, Antolin I, & Rodriguez C (1999). Ultrastructural confirmation of neuronal protection by melatonin against the neurotoxin 6-hydroxydopamine cell damage. *Brain Res* **818**, 221-227.
- Mayo JC, Sainz RM, Tan DX, Antolin I, Rodriguez C, & Reiter RJ (2005). Melatonin and Parkinson's disease. *Endocrine* **27**, 169-178.
- Mayo JC, Sainz RM, Uria H, Antolin I, Esteban MM, & Rodriguez C (1998). Melatonin prevents apoptosis induced by 6-hydroxydopamine in neuronal cells: implications for Parkinson's disease. *J Pineal Res* **24**, 179-192.
- Mayo JC, Tan DX, Sainz RM, Lopez-Burillo S, & Reiter RJ (2003). Oxidative damage to catalase induced by peroxy radicals: functional protection by melatonin and other antioxidants. *Free Radic Res* **37**, 543-553.
- McCord C.P. & Allen F.B. (1917). Evidences associating pineal gland function with alterations in pigmentation. *J Exp Zool* **13**, 207.

- McGeer PL, Itagaki S, Boyes BE, & McGeer EG (1988). Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* **38**, 1285-1291.
- Menendez-Pelaez A & Reiter RJ (1993). Distribution of melatonin in mammalian tissues: the relative importance of nuclear versus cytosolic localization. *J Pineal Res* **15**, 59-69.
- Miguel Martín, Manuel Macías, Germaine Escames, Josefa León, & Darío Acuña-Castroviejo. Melatonin but not vitamins C and E maintains glutathione homeostasis in t-butyl hydroperoxide-induced mitochondrial oxidative stress. 2000.
- Ref Type: Generic
- Miguel Martín, Manuel Macías, Josefa León, Germaine Escames, Huda Khaldy, & Darío Acuña-Castroviejo. Melatonin increases the activity of the oxidative phosphorylation enzymes and the production of ATP in rat brain and liver mitochondria. 2002.
- Ref Type: Generic
- Miller JW, Selhub J, & Joseph JA (1996). Oxidative damage caused by free radicals produced during catecholamine autoxidation: protective effects of O-methylation and melatonin. *Free Radic Biol Med* **21**, 241-249.
- Mogi M, Togari A, Ogawa M, Ikeguchi K, Shizuma N, Fan D, Nakano I, & Nagatsu T (1998). Effects of repeated systemic administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) to mice on interleukin-1beta and nerve growth factor in the striatum. *Neurosci Lett* **250**, 25-28.
- Moncada S, Palmer RM, & Higgs EA (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* **43**, 109-142.
- Moore R.Y. (1978). The innervation of the mammalian pineal gland. *Prog Reprod Biol* **4**, 1-29.
- Morgan WW & Nelson JF (2001). Chronic administration of pharmacological levels of melatonin does not ameliorate the MPTP-induced degeneration of the nigrostriatal pathway. *Brain Res* **921**, 115-121.
- Morrissey P.A. & O'brien N.M. (1998). Dietary antioxidants in health and disease. *Int Dairy J* **8**, 463-472.
- Murer MG, Yan Q, & Raisman-Vozari R (2001). Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* **63**, 71-124.
- Naoi M, Dostert P, Yoshida M, & Nagatsu T (1993). N-methylated tetrahydroisoquinolines as dopaminergic neurotoxins. *Adv Neurol* **60**, 212-217.
- Nicholls DG & Budd SL (2000). Mitochondria and neuronal survival. *Physiol Rev* **80**, 315-360.

- 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.
- Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Rodriguez M, Lanciego JL, Artieda J, Gonzalo N, & Olanow CW (2000). Pathophysiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. *Trends Neurosci* **23**, S8-19.
- Olanow CW (2007). The pathogenesis of cell death in Parkinson's disease--2007. *Mov Disord* **22 Suppl 17**, S335-S342.
- Olney JW, Ho OL, & Rhee V (1971). Cytotoxic effects of acidic and sulphur containing amino acids on the infant mouse central nervous system. *Exp Brain Res* **14**, 61-76.
- Onyango IG (2008). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease. *Neurochem Res* **33**, 589-597.
- Ortiz GG, Crespo-Lopez ME, Moran-Moguel C, Garcia JJ, Reiter RJ, & Acuna-Castroviejo D (2001). Protective role of melatonin against MPTP-induced mouse brain cell DNA fragmentation and apoptosis in vivo. *Neuro Endocrinol Lett* **22**, 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**, 173-177.
- Pablos MI, Reiter 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**, 69-75.
- Parent A, Parent M, & Charara A (1999). Glutamatergic inputs to midbrain dopaminergic neurons in primates. *Parkinsonism Relat Disord* **5**, 193-201.
- Parker WD, Jr., Parks JK, & Swerdlow RH (2008). Complex I deficiency in Parkinson's disease frontal cortex. *Brain Res* **1189**, 215-218.
- Parkkinen L, Kauppinen T, Pirttila T, Autere JM, & Alafuzoff I (2005a). Alpha-synuclein pathology does not predict extrapyramidal symptoms or dementia. *Ann Neurol* **57**, 82-91.
- Parkkinen L, Pirttila T, Tervahauta M, & Alafuzoff I (2005b). Widespread and abundant alpha-synuclein pathology in a neurologically unimpaired subject. *Neuropathology* **25**, 304-314.
- Pellegrini-Giampietro DE, Cherici G, Alesiani M, Carla V, & Moroni F (1990). Excitatory amino acid release and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage. *J Neurosci* **10**, 1035-1041.

- Petrovitch H, Ross GW, Abbott RD, Sanderson WT, Sharp DS, Tanner CM, Masaki KH, Blanchette PL, Popper JS, Foley D, Launer L, & White LR (2002). Plantation work and risk of Parkinson disease in a population-based longitudinal study. *Arch Neurol* **59**, 1787-1792.
- Pieri C, Marra M, Moroni F, Recchioni R, & Marcheselli F (1994). Melatonin: a peroxy radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sci* **55**, L271-L276.
- Pierrefiche G & Laborit H (1995). Oxygen free radicals, melatonin, and aging. *Exp Gerontol* **30**, 213-227.
- Plaitakis A & Shashidharan P (2000). Glutamate transport and metabolism in dopaminergic neurons of substantia nigra: implications for the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neurol* **247 Suppl 2**, II25-II35.
- 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**, 419-420.
- Pozo D, Reiter RJ, Calvo JR, & Guerrero JM (1994). Physiological concentrations of melatonin inhibit nitric oxide synthase in rat cerebellum. *Life Sci* **55**, L455-L460.
- Pramstaller PP, Schlossmacher MG, Jacques TS, Scaravilli F, Eskelson C, Pepivani I, Hedrich K, Adel S, Gonzales-McNeal M, Hilker R, Kramer PL, & Klein C (2005). Lewy body Parkinson's disease in a large pedigree with 77 Parkinson mutation carriers. *Ann Neurol* **58**, 411-422.
- Pryor W. (1976). Free radicals in biology., ed. Academic press, New York.
- Przedborski S (2005). Pathogenesis of nigral cell death in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* **11 Suppl 1**, S3-S7.
- Przedborski S & Ischiropoulos H (2005). Reactive oxygen and nitrogen species: weapons of neuronal destruction in models of Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal* **7**, 685-693.
- Przedborski S, Tieu K, Perier C, & Vila M (2004). MPTP as a mitochondrial neurotoxic model of Parkinson's disease. *J Bioenerg Biomembr* **36**, 375-379.
- Ranjita Betarbet, Timothy Greenamyre, MarkR.Cookson, Gary Klinefelter, Akemi Yagi, Takao Yagi, Byoung Boo Seo, Ron Kopito, NeilF.Bence, Georgia Taylor, Hye-Mee Na, Serena Lund, Jin-Ho Kim, Chris McLendon, Pier G.Mastroberardino, Todd B.Sherer, & Rosa M.Canet-Aviles. Intersecting pathways to neurodegeneration in Parkinson's disease: Effects of the pesticide rotenone on DJ-1 A-synuclein and the ubiquitin-proteasome system. 2006.

Ref Type: Generic

- Reiter RJ (1991). Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev* **12**, 151-180.
- Reiter RJ, Calvo JR, Karbownik M, Qi W, & Tan DX (2000a). Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. *Ann N Y Acad Sci* **917**, 376-386.
- Reiter RJ & Tan DX (2003). What constitutes a physiological concentration of melatonin? *J Pineal Res* **34**, 79-80.
- Reiter RJ, Tan DX, & Burkhardt S (2002). Reactive oxygen and nitrogen species and cellular and organismal decline: amelioration with melatonin. *Mech Ageing Dev* **123**, 1007-1019.
- Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Lopez-Burillo S, Sainz RM, & Mayo JC (2003). Melatonin: detoxification of oxygen and nitrogen-based toxic reactants. *Adv Exp Med Biol* **527**, 539-548.
- Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Pilar TM, Flores LJ, & Koppisepi S (2007). Medical implications of melatonin: receptor-mediated and receptor-independent actions. *Adv Med Sci* **52**, 11-28.
- Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, & Gitto E (2000b). Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. A review. *J Biomed Sci* **7**, 444-458.
- Reiter RJ, Tan DX, Poeggeler B, Menendez-Pelaez A, Chen LD, & Saarela S (1994). Melatonin as a free radical scavenger: implications for aging and age-related diseases. *Ann N Y Acad Sci* **719**, 1-12.
- Reiter RJ, Tan DX, Qi W, Manchester LC, Karbownik M, & Calvo JR (2000c). Pharmacology and physiology of melatonin in the reduction of oxidative stress in vivo. *Biol Signals Recept* **9**, 160-171.
- Ren Y & Feng J (2007). Rotenone selectively kills serotonergic neurons through a microtubule-dependent mechanism. *J Neurochem* **103**, 303-311.
- Rice J.C. & Lindsay J.G. (1997). Subcellular fractionation., ed. Graham J.M., Rickwood.
- Richardson JR, Caudle WM, Guillot TS, Watson JL, Nakamaru-Ogiso E, Seo BB, Sherer TB, Greenamyre JT, Yagi T, Matsuno-Yagi A, & Miller GW (2007). Obligatory role for complex I inhibition in the dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Toxicol Sci* **95**, 196-204.
- Richardson JR, Quan Y, Sherer TB, Greenamyre JT, & Miller GW (2005). Paraquat neurotoxicity is distinct from that of MPTP and rotenone. *Toxicol Sci* **88**, 193-201.
- Rosenstein RE & Cardinali DP (1990). Central gabaergic mechanisms as

- targets for melatonin activity in brain. *Neurochem Int* **17**, 373-379.
- Russel J.Reiter, Dun-Xian Tan, Juan C.Mayo, Rosa M.Sainz, Josefa León, & Zbigniew Czarnocki. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. 2003.
Ref Type: Generic
- Sack RL, Lewy AJ, Erb DL, Vollmer WM, & Singer CM (1986). Human melatonin production decreases with age. *J Pineal Res* **3**, 379-388.
- Sainz RM, Mayo JC, Rodriguez C, Tan DX, Lopez-Burillo S, & Reiter RJ (2003). Melatonin and cell death: differential actions on apoptosis in normal and cancer cells. *Cell Mol Life Sci* **60**, 1407-1426.
- Sanchez-Ramos J.R., Övervik E., & Ames B.M. (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.
- Saran M & Bors W (1990). Radical reactions in vivo--an overview. *Radiat Environ Biophys* **29**, 249-262.
- Scaiano JC (1995). Exploratory laser flash photolysis study of free radical reactions and magnetic field effects in melatonin chemistry. *J Pineal Res* **19**, 189-195.
- Schapira AH (1998). Human complex I defects in neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta* **1364**, 261-270.
- Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P, & Marsden CD (1990). Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem* **54**, 823-827.
- Semchuk KM, Love EJ, & Lee RG (1992). Parkinson's disease and exposure to agricultural work and pesticide chemicals. *Neurology* **42**, 1328-1335.
- Sherer TB, Betarbet R, & Greenamyre JT (2002). Environment, mitochondria, and Parkinson's disease. *Neuroscientist* **8**, 192-197.
- Shults CW (2006). Lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 1661-1668.
- Skulachev VP (1999). Mitochondrial physiology and pathology; concepts of programmed death of organelles, cells and organisms. *Mol Aspects Med* **20**, 139-184.
- Speciale SG (2002). MPTP: insights into parkinsonian neurodegeneration. *Neurotoxicol Teratol* **24**, 607-620.
- Spinazzola A, Viscomi C, Fernandez-Vizarra E, Carrara F, D'Adamo P, Calvo S, Marsano RM, Donnini C, Weiher H, Strisciuglio P, Parini R, Sarzi E, Chan A, DiMauro S, Rotig A, Gasparini P, Ferrero I, Mootha VK, Tiranti V, & Zeviani M (2006). MPV17 encodes an inner mitochondrial membrane protein and is

- mutated in infantile hepatic mitochondrial DNA depletion. *Nat Genet* **38**, 570-575.
- Srinivasan V, Pandi-Perumal SR, Maestroni GJ, Esquifino AI, Hardeland R, & Cardinali DP (2005). Role of melatonin in neurodegenerative diseases. *Neurotox Res* **7**, 293-318.
- Stasica P, Ulanski P, & Rosiak JM (1998). Melatonin as a hydroxyl radical scavenger. *J Pineal Res* **25**, 65-66.
- 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**, 243-247.
- Storch A, Ludolph AC, & Schwarz J (2004). Dopamine transporter: involvement in selective dopaminergic neurotoxicity and degeneration. *J Neural Transm* **111**, 1267-1286.
- Strosznajder RP, Jesko H, & Zambrzycka A (2005). Poly(ADP-ribose) polymerase: the nuclear target in signal transduction and its role in brain ischemia-reperfusion injury. *Mol Neurobiol* **31**, 149-167.
- 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* **40**, 663-671.
- Szmuskowicz AW & Heinzelman RV (1960). Synthesis of N-acetilmethoxytryptamine. *J Org Chem* **25**, 287.
- Tan DX, Chen L.D., Poeggerler B., Manchester LC, & Reiter RJ (1993). Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocr J* **1**, 60.
- 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**, 249-259.
- Tan DX, Manchester LC, Burkhardt S, Sainz RM, Mayo JC, Kohen R, Shohami E, Huo YS, Hardeland R, & Reiter RJ (2001). N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine, a biogenic amine and melatonin metabolite, functions as a potent antioxidant. *FASEB J* **15**, 2294-2296.
- Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Plummer BF, Hardies LJ, Weintraub ST, Vijayalaxmi, & Shepherd AM (1998). A novel melatonin metabolite, cyclic 3-hydroxymelatonin: a biomarker of in vivo hydroxyl radical generation. *Biochem Biophys Res Commun* **253**, 614-620.
- Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Plummer BF, Limson J, Weintraub ST, & Qi W (2000a). Melatonin directly scavenges hydrogen peroxide: a potentially new

- metabolic pathway of melatonin biotransformation. *Free Radic Biol Med* **29**, 1177-1185.
- Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi WB, Karbownik M, & Calvo JR (2000b). Significance of melatonin in antioxidative defense system: reactions and products. *Biol Signals Recept* **9**, 137-159.
- Tan DX, Reiter RJ, Manchester LC, Yan MT, El-Sawi M, Sainz RM, Mayo JC, Kohen R, Allegra M, & Hardeland R (2002). Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr Top Med Chem* **2**, 181-197.
- Tanner CM (1989). The role of environmental toxins in the etiology of Parkinson's disease. *Trends Neurosci* **12**, 49-54.
- Tanner CM, Chen B, Wang W, Peng M, Liu Z, Liang X, Kao LC, Gilley DW, Goetz CG, & Schoenberg BS (1989). Environmental factors and Parkinson's disease: a case-control study in China. *Neurology* **39**, 660-664.
- Tanner CM & Langston JW (1990). Do environmental toxins cause Parkinson's disease? A critical review. *Neurology* **40**, suppl-30.
- Tapias V, Escames G, Lopez LC, Lopez A, Camacho E, Carrion MD, Entrena A, Gallo MA, Espinosa A, & Acuna-Castroviejo D (2009). Melatonin and its brain metabolite N(1)-acetyl-5-methoxykynuramine prevent mitochondrial nitric oxide synthase induction in parkinsonian mice. *J Neurosci Res* **87**, 3002-3010.
- Ted M.Dawson. Molecular Pathways of Neurodegeneration in Parkinson's disease. 2003.
Ref Type: Generic
- Teismann P, Tieu K, Cohen O, Choi DK, Wu DC, Marks D, Vila M, Jackson-Lewis V, & Przedborski S (2003). Pathogenic role of glial cells in Parkinson's disease. *Mov Disord* **18**, 121-129.
- Thomas B & Mohanakumar KP (2004). Melatonin protects against oxidative stress caused by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in the mouse nigrostriatum. *J Pineal Res* **36**, 25-32.
- Tieu K, Ischiropoulos H, & Przedborski S (2003). Nitric oxide and reactive oxygen species in Parkinson's disease. *IUBMB Life* **55**, 329-335.
- Tomas-Camardiel M, Venero JL, de Pablos RM, Rite I, Machado A, & Cano J (2004). In vivo expression of aquaporin-4 by reactive microglia. *J Neurochem* **91**, 891-899.
- Tretiakoff C. Contribution a l'etude de l'anatomie pathologique du locus niger de soemmering avec quelques deductions relatives a pathogenic des troubles du tonus musculaire et de la maladie de Parkinson. 1919. París.
Ref Type: Thesis/Dissertation

- Tretter L, Sipos I, & Adam-Vizi V (2004). Initiation of neuronal damage by complex I deficiency and oxidative stress in Parkinson's disease. *Neurochem Res* **29**, 569-577.
- Turens JF (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* **552**, 335-344.
- Twelves D, Perkins KS, & Counsell C (2003). Systematic review of incidence studies of Parkinson's disease. *Mov Disord* **18**, 19-31.
- 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 Radic Biol Med* **27**, 838-847.
- 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**, 1252-1254.
- Vila M & Przedborski S (2004). Genetic clues to the pathogenesis of Parkinson's disease. *Nat Med* **10 Suppl**, S58-S62.
- Whaley NR, Uitti RJ, Dickson DW, Farrer MJ, & Wszolek ZK (2006). Clinical and pathologic features of families with LRRK2-associated Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* 221-229.
- Wiesenberg I, Missbach M, Kahlen JP, Schrader M, & Carlberg C (1995). Transcriptional activation of the nuclear receptor RZR alpha by the pineal gland hormone melatonin and identification of CGP 52608 as a synthetic ligand. *Nucleic Acids Res* **23**, 327-333.
- Wolozin B & Golts N (2002). Iron and Parkinson's disease. *Neuroscientist* **8**, 22-32.
- Zamzami N & Kroemer G (2001). The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 67-71.
- Zang LY, Cosma G, Gardner H, & Vallyathan V (1998). Scavenging of reactive oxygen species by melatonin. *Biochim Biophys Acta* **1425**, 469-477.
- Zhang L, Dawson VL, & Dawson TM (2006). Role of nitric oxide in Parkinson's disease. *Pharmacol Ther* **109**, 33-41.
- Zhang ZX & Roman GC (1993). Worldwide occurrence of Parkinson's disease: an updated review. *Neuroepidemiology* **12**, 195-208.