

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias



**Análisis Comparativo del Estrés Oxidativo y la Fluidez de Membranas
Celulares y Mitocondriales de Hepatocitos de Ratón C57/Bl6 Después de
la administración de 1-metil-4-fenil 1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP),
Aceite de Pescado y Melatonina.**

TESIS

Para obtener el grado de

Licenciado en Biología

Presenta

Catalina Ivone Chávez Medrano

Director de tesis

Dr. Genaro Gabriel Ortiz

Co-Director de Tesis

Dr. Fermín Pacheco Moisés



Universidad de Guadalajara

**Centro Universitario de Ciencias Biológicas y
Agropecuarias**

*Coordinación de Titulación y Carrera de Licenciatura
en Biología*

749/ C. C. BIOLOGÍA

**C. CATALINA IVONE CHÁVEZ MEDRANO
PRESENTE**

Manifestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de: **Tesis e Informes** opción **Tesis** con el título: **“Análisis comparativo del Estrés Oxidativo y la Fluidez de Membranas Celulares y Mitocondriales de Hepatocitos de Ratón C57/ B16 Después de la Administración de 1-metil- 4-fenil 1,2,3,6- tetrahidropiridina (MPTP), Aceite de Pescado y Melatonina”** para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director / a de dicho trabajo el/la: **DR. GENARO GABRIEL ORTÍZ** Y el Asesor/a es el/la: **DR. FERMÍN P. PACHECO MOISÉS.**

Sin más por el momento, le envío un caluroso saludo.

**ATENTAMENTE
“PIENSA Y TRABAJA”**

Las Agujas, Zapopan., 20 de Julio del 2006.

**“2006. Año del Bicentenario del natalicio del Benemérito de las Américas.
Don Benito Juárez García”**

**DR. CARLOS ÁLVAREZ MOYA
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**



COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

**DRA. LAURA GUADALUPE MEDINA CEJA
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

C.c.p. DR. GENARO GABRIEL ORTÍZ - Director del trabajo

Dr. Carlos Álvarez Moya.
 Presidente del Comité de Titulación.
 Carrera de Licenciado en Biología.
 CUCBA.
 Presente

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad de Tesis, con el título: **“Análisis Comparativo del Estrés Oxidativo y la Fluidez de Membranas Celulares y Mitocondriales de Hepatocitos de Ratón C57/BI6 Después de la administración de 1-metil-4-fenil 1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), Aceite de Pescado y Melatonina “** que realizó la pasante Catalina Ivone Chávez Medrano con número de código 397167125 consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

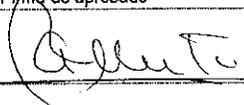
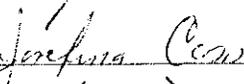
Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente

Guadalajara, Jal. 27 de julio de 2006.



Dr. Genaro Gabriel Ortiz
 Director del trabajo

Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Alberto Morales Villagrán		16/ Agosto/06
Cinthya Guadalupe Temores Ramírez		27/VII/06
Josefina Casas Solís		27/VII/06
Silvia Josefina López Pérez		14/VII/06

*La B.
 CUCBA.
 16/Ago/06.*

AGRADECIMIENTOS

A Dios: Por permitir mi asistencia.

A mis padres: Juan Antonio Chávez y María Teresa Medrano quienes me infundieron la ética y el rigor que guían mi transitar por la vida.

A mis hermanos: Juan Antonio y Mayra Lizette por confiar en mí.

Al Dr. Genaro Gabriel Ortiz y al Dr. Fermín Pacheco Moisés: por darme la oportunidad de trabajar con ellos por su asesoramiento científico y estímulo para seguir creciendo intelectualmente.

A mi amor y a mis amigos: por quererme.

Análisis Comparativo del Estrés Oxidativo y la Fluidez de Membranas Celulares y Mitocondriales de Hepatocitos de Ratón C57/BI6 Después de la administración de 1-metil-4-fenil 1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), Aceite de Pescado y Melatonina.

Presenta:

Catalina I Chávez- Medrano

Director de tesis

Dr. en C. Genaro G. Ortiz

Centro de Investigación Biomédica de Occidente (CIBO), Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). Guadalajara, Jalisco. México.

Co-Director

Dr. en C. Fermín Paul Pacheco Moisés

Departamento de Química, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingeniería. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jalisco. México.

Este trabajo se llevó al cabo en el Laboratorio de Estrés Oxidativo y Enfermedades Degenerativas, División de Neurociencias. Centro de Investigación Biomédica de Occidente (CIBO), Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). Guadalajara, Jalisco. México.

ÍNDICE

1. Introducción	1
2. Antecedentes	2
2.1 La enfermedad de Parkinson	2
2.2 Modelo del MPTP	3
2.3 Estrés oxidativo	9
2.4 Melatonina	11
2.4.1 Acciones como antioxidante directo	12
2.4.2 Acciones como antioxidante indirecto	16
2.5 El aceite de pescado	19
2.6 La Mitocondria	22
2.6.1 Anatomía de la mitocondria	22
2.7 Membranas biológicas	24
2.7.1 Fluidez membranal	26
2.7.2 Las Bicapas lipídicas son fluidos bidimensionales	28
2.7.3 Técnicas para la cuantificación de la fluidez membranal	29
3. Justificación	33
4. Planteamiento del problema	34
5. Hipótesis	35
6. Objetivo general	36
6.1 Objetivos particulares	36
7. Metodología	37
7.1 Tratamiento de los animales	37
7.2 Aislamiento de membranas mitocondriales	38
7.3 Aislamiento de membranas totales	39
7.4 Determinación de lipoperóxidos	39
7.5 Determinación de nitratos/nitritos	40
7.6 Determinación de la fluidez membranal	40
8. Análisis estadístico	42
9. Resultados	43
10. Discusión	55
11. Conclusiones	59
12. Bibliografía	60

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno neurodegenerativo de patogénesis incierta caracterizado por síntomas como son: anormalidades motoras inhabilitantes, que incluye temblores, rigidez muscular, pausa en los movimientos voluntarios e inestabilidad postural (Fahn y Przedborski, 2000).

La característica neuropatológica es la pérdida de neuronas dopaminérgicas nigroestriatales, cuyos cuerpos celulares se encuentran en la sustancia nigra *pars compacta* y nervios terminales en el núcleo estriado (Przedborski y col., 2003a).

La disminución de dopamina es el resultado de una degeneración de las vías dopaminérgicas nigroestriatales, que normalmente inhiben la actividad de una subpoblación de neuronas estriatales (Otero-Siliceo, 1996).

La enfermedad de Parkinson puede imitarse mediante el empleo del modelo del 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) en donde existe un incremento de la ciclooxigenasa-2 (COX-2), la cual se ha asociado a la neurodegeneración presente en esta enfermedad así como en la enfermedad de Alzheimer, etc. Conforme a estos hechos, se utilizó el MPTP para reproducir los efectos neuroquímicos que se presentan en la enfermedad de Parkinson en humanos; esto con el propósito de relacionar la actividad de peroxidasa de la COX-2 con la enfermedad y a la vez determinar si la melatonina y los ácidos grasos pueden disminuir los daños causados por el MPTP.

2. ANTECEDENTES

2.1 La enfermedad de Parkinson

La Enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno neurodegenerativo, crónico y progresivo caracterizado por la combinación variable de bradicinesia, rigidez y temblor, en relación a una disminución del contenido de dopamina a nivel del en el circuito nigroestriado (Przedborski y col., 2003a). La enfermedad que lleva su nombre, fue descrita por un observador médico y geólogo inglés llamado James Parkinson en 1817.

La presencia de la EP se incrementa con la edad. La edad media de comienzo es de 62.4 años, es muy rara por debajo de los 30 años, y solo el 4-10 % de los casos aparecen antes de los 40 años. Su incidencia es de 18-20.5 por 100.000 habitantes /año siendo esperable un incremento en los próximos años (Rajput y col., 1984).

No existen diferencias por sexos, razas, entre otros factores, atribuyendo la discordancia en las cifras recogidas a cuestiones puramente metodológicas (Jiménez-Jiménez y col., 1993). Factores como traumatismos, estrés, personalidad depresiva, estreñimiento, contacto con metales, consumo de agua de pozo, residencia en ámbito rural, uso de herbicidas y otros, aumentan el riesgo de padecer la enfermedad. Por el contrario, y sin establecer claramente la relación, se ha demostrado que el consumo de café, tabaco y alcohol, reducen el riesgo de padecerla (Koller y col., 2003).

En México no existe un marco de referencia preciso que determine la prevalencia de la enfermedad de Parkinson; estimaciones señalan una cifra de 40 a 50 casos por cada 100,000 habitantes, es decir, alrededor de 50,000 pacientes con Parkinson idiopático en todo el país (Otero-Siliceo, 1996).

La mayoría de los casos de Parkinson son esporádicos, pero se ha determinado que aproximadamente un 10 % de estos casos presentan una herencia familiar. Se ha encontrado que en 5 cromosomas existen 10 genes que se han relacionado con la enfermedad, de entre los cuales sobresalen los genes de las siguientes proteínas: α -sinucleína, parkin, hidrolasa L-1 del C-terminal de ubiquitina, DJ-1; los tres últimos están relacionados con el sistema de degradación de proteínas ubiquitina/proteosomal (Fahn y Sulzer, 2004).

Actualmente no se han encontrado los mecanismos responsables de la muerte neuronal en la enfermedad de Parkinson, sin embargo, se ha sugerido que la muerte neuronal en la sustancia nigra *pars compacta* puede ser por apoptosis (Burke, 1998), pero esto no se ha aceptado universalmente (Kosel y col., 1997). Entre los factores que han sido implicados en la degeneración neuronal son: la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo, las excitotoxinas, los factores inmunes y factores neurotróficos.

2.2 Modelo del MPTP

El modelo del 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) se descubrió accidentalmente cuando en 1982 un grupo de drogadictos jóvenes del norte de California presentaron un síndrome parkinsoniano severo después de la inyección intravenosa de una "heroína sintética" nueva que se vendía en las calles; posteriormente se descubrió que el agente causante del síndrome era el MPTP, el cual es un subproducto de la síntesis del análogo de la meperidina (figura 1), el 1-metil-4-fenil-4-propionoxipiperidina (MPPP) (Davis y col., 1979).

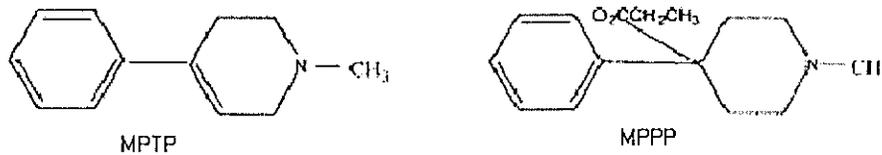


Figura 1 Semejanza entre el MPTP y el MPPP.

A la fecha los animales más frecuentemente empleados son los monos, ratones y ratas. La administración del MPTP varía notablemente dependiendo de los regímenes de dosificación que conlleven al desarrollo de distintos modelos, caracterizados cada uno por distintos rasgos bioquímicos y del comportamiento; el desarrollo del modelo se basa en la administración de tal manera que cause un daño severo y al mismo tiempo estable en la *sustancia nigra pars compacta* con el menor número de efectos indeseables como la muerte, la deshidratación y la desnutrición. A pesar de que la administración del compuesto puede hacerse de muchas maneras, la manera de obtener las lesiones más comunes y reproducibles se obtienen a través de la administración sistémica, por ejemplo, subcutánea, intravenosa, intraperitoneal e intramuscular.

En humanos y en primates no humanos, dependiendo del régimen empleado el MPTP produce un síndrome parkinsoniano severo e irreversible que asemeja casi todas las características de la enfermedad de Parkinson en humanos, incluyendo el temblor, la rigidez, la lentitud de movimiento, la inestabilidad de la postura e incluso el "congelamiento"; en primates no humanos, los temblores característicos sólo han sido demostrados eficazmente en el mono verde africano (Tetrud y col., 1986).

Se cree que el proceso neurodegenerativo de la enfermedad de Parkinson tiene lugar durante varios años, mientras que la fase aguda de la neurodegeneración se completa en unos pocos días después de la administración del MPTP (Jackson-Lewis y col., 1995); sin embargo, datos recientes sugieren que la neurodegeneración causada por el MPTP puede continuar silenciosamente durante varias décadas, al menos en humanos que lo han ingerido (Langston y col., 1999).

Solamente existen cuatro casos humanos (Langston y col., 1999) en los cuales se ha podido estudiar, por lo que la mayoría de la información disponible acerca del modelo es a través del estudio en primates no humanos (Forno y col., 1993).

Los datos neuropatológicos muestran que la administración del MPTP causa un daño en las vías dopaminérgicas nigroestriatales de forma idéntica a la enfermedad de Parkinson (Przedborski y col., 2002).

El metabolismo del MPTP es un proceso complejo y de múltiples pasos (Przedborski y Jackson-Lewis, 1998); después de su administración sistémica, el MPTP, atraviesa rápidamente la barrera hematoencefálica. Una vez en el cerebro, entra a las células gliales y es convertido por la monoamino-oxidasa B a 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridinium (MPDP⁺), se convierte a 1-metil-4-fenil-piridinium (MPP⁺) (figura 2) (Przedborski y Vila, 2003). Ya que el MPP⁺ es una molécula polar, no puede entrar libremente a las células, por lo que depende de los acarreadores de la membrana plasmática, y tiene una alta afinidad por los transportadores de dopamina de la membrana plasmática (Mayer y col., 1986), así como los transportadores de norepinefrina y serotonina (Przedborski y Vila, 2003).

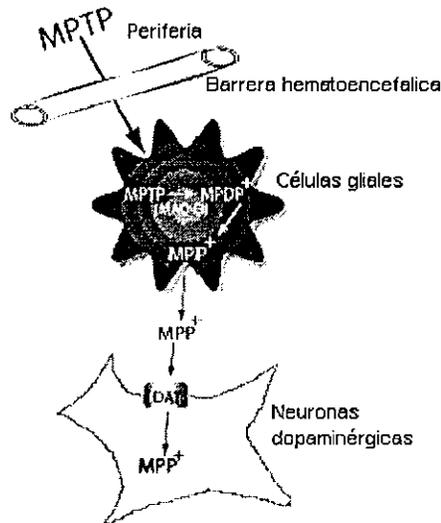


Figura 2 Diagrama del metabolismo del MPTP.

Este paso en el proceso neurotóxico se ha confirmado a través del bloqueo de los transportadores de dopamina con el mazindol (Javitch y col., 1985) o por la eliminación del gen en ratones mutantes en donde se previene completamente la toxicidad del MPTP y de forma inversa, los ratones transgénicos con un incremento en la expresión de los transportadores de dopamina son más sensibles al daño del MPTP (Donovan y col., 1999).

Una vez que el MPTP se encuentra en el interior de las neuronas dopaminérgicas puede seguir tres rutas: 1) se puede unir a los transportadores vesiculares de monoaminas, y ser traslocado a los sinaptosomas (Liu y col., 1992); 2) se puede concentrar en las mitocondrias (Ramsay y Singer, 1986) o 3) puede permanecer en el citosol e interactuar con diferentes enzimas (Klaidman y col., 1993). El destino del MPP^+ en cada una de las rutas depende probablemente de la concentración intracelular y de la afinidad por cada una de ellas.

La importancia del secuestro del MPP⁺ se observó debido a que las células transfectadas para expresar una gran densidad de los transportadores vesiculares de monoaminas convirtieron a las células sensibles al MPP⁺ en células resistentes al mismo (Liu y col., 1992). De manera inversa, los ratones mutantes con un 50 % menos de dichos transportadores son más sensibles al daño neurotóxico del MPTP comparado con los ratones normales (Takahashi y col., 1997). Estos hechos demuestran claramente una relación inversamente proporcional entre la capacidad de secuestro del MPP⁺ y la magnitud del daño neurotóxico del MPTP.

En el interior de las neuronas dopaminérgicas, el MPP⁺ se puede concentrar dentro de las mitocondrias (Ramsay y Singer, 1986) en donde inhibe el complejo I de la cadena respiratoria (óxidoreductasa de NADH-ubiquinona) (Ramsay y col., 1987), a través de su unión en o cerca del sitio de unión del veneno mitocondrial rotenona (Higgins y Greenamyre, 1996). Por lo que la inhibición de este complejo, no sólo trae como consecuencia la disminución de los niveles de trifosfato de adenosina (ATP), sino también la producción de radicales superóxido así como la peroxidación lipídica (Kang y col., 1983).

Actualmente se cree que durante el proceso neurotóxico del MPTP consiste en una serie de eventos tempranos, tardíos así como daño de neuronal.

Tan pronto entra el MPP⁺ a la neurona dopaminérgica, se une al complejo I, e interrumpe el flujo de electrones, por lo que disminuye la síntesis de ATP como se mencionó anteriormente. Se cree que la actividad del complejo 1 disminuye > 70 % para causar una severa deficiencia de ATP en mitocondrias no sinápticas (Davey y Clark, 1996). En experimentos *in vivo* se ha observado una disminución de 20 % del ATP en mesencéfalo (Chan y col., 1991). Otra

consecuencia de la inhibición del complejo I es el incremento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), especialmente el superóxido (Cleeter y col., 1992); también se ha observado la producción de ERO debido a la autooxidación de la dopamina, ya que el MPP⁺ induce una liberación masiva de las vesículas hacia al citosol.

La importancia de la producción de ERO por parte del MPTP se ha demostrado por estudios en ratones transgénicos que sobreexpresan a las enzimas antioxidantes como la SOD Cu/Zn y la SOD Mn. En estos ratones hay una gran disminución de la toxicidad del MPTP (Klivenyi y col., 1998; Przedborski y col., 1992). De manera inversa la deficiencia de enzimas como la glutatión peroxidasa, la SOD Cu/Zn y la SOD Mn aumenta la toxicidad. (Andreassen y col., 2001; Zhang y col., 2000). Parece que el oxidante crítico es el peroxinitrito, que se forma por la reacción química de un radical NO y un radical de O₂; la 3-nitrotirosina, un marcador del daño causado por el peroxinitrito, se incrementa en el modelo del MPTP (Schulz y col., 1995) así como en cerebros de pacientes con la enfermedad de Parkinson (Good y col., 1998). Sin embargo, existe mucha evidencia que indica que los ERO ejercen muchos o la mayoría de efectos tóxicos junto con otras especies reactivas como óxido nítrico (NO), (Schulz y col., 1995) produciéndose en cerebro por las dos isoformas de la sintasa del óxido nítrico como son la neuronal y la inducible (Przedborski y col., 1996).

Como respuesta tardía a la disminución de ATP y la producción de ERO, las señales de muerte pueden activar las vías apoptóticas en las neuronas dopaminérgicas; solamente en regímenes de administración prolongada de dosis bajas a moderadas se han determinado neuronas apoptóticas

morfológicamente bien definidas (Tatton y Kish, 1997). Se ha demostrado que después de la administración del MPTP, la proteína proapoptótica Bax desempeña un papel importante en este modelo (Vila y col., 2001); al mismo tiempo se ha observado que la caspasa-8 se activa durante este modelo (Hartmann y col., 2001).

La presencia de microglia activada en muestras post-mortem de individuos intoxicados con el MPTP décadas atrás (Langston y col., 1999) muestra un proceso degenerativo real y cambia la idea de que el MPTP causa un daño único. Lo que sugiere que un solo ataque por parte del MPTP inicia una cascada de eventos autosostenidos con efectos tóxicos de larga duración (Langston y col., 1999).

2.3 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es una condición anormal que resulta de una inadecuada eliminación de las especies reactivas de oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN) por los sistemas antioxidantes intracelulares, debido al envejecimiento o a una enfermedad. Las células durante la evolución han desarrollado sistemas de defensa y reparación para controlar el estrés oxidativo y el daño asociado a éste, excepto en ciertas condiciones como la enfermedad de Parkinson, dichos sistemas se encuentran disminuidos.

En la enfermedad de Parkinson las neuronas dopaminérgicas nigroestriales son expuestas a un gran estrés oxidativo debido a que durante el metabolismo de la dopamina se generan moléculas que pueden actuar como toxinas endógenas si no se manejan adecuadamente (Lotharius y Brundin, 2002).

La dopamina se puede auto-oxidar a pH normal a dopamino-quinonas, radicales superóxido y H_2O_2 de igual forma puede desaminarse por la enzima mono-amino oxidasa (MAO-B) para formar el ácido 3,4-dihidroxifenilacético (no tóxico) y H_2O_2 (Maker y col., 1981). El superóxido es una molécula muy reactiva que se puede transformar en peroxinitrito en presencia de nitritos. El H_2O_2 se puede transformar en un radical muy tóxico, el radical hidroxilo, a través de la reacción de Fenton en presencia de fierro, cuyo nivel es elevado en la sustancia nigra en comparación de otras regiones del cerebro (Lotharius y Brundin, 2002).

En pacientes con la enfermedad de Parkinson las neuronas nigroestriatales están sometidas a un gran estrés oxidativo, por ejemplo, los niveles de malondialdehído y de lipoperóxidos, marcadores de estrés oxidativo, se encuentran 10 veces por encima de su valor normal en la sustancia nigra (Dexter y col., 1989), otro ejemplo es la 8-hidroxiguanosina, la cual aumentó como marcador de ADN y ARN oxidado en la misma región (Zhang y col., 1999), así como los carbonilos proteicos, indicadores de la oxidación de proteínas, aumentaron dos veces más en la sustancia nigra que en otras áreas del cerebro (Floor y Wetzel, 1998).

También se ha observado una disminución de los niveles de glutatión en la sustancia nigra, incluso dentro de las neuronas dopaminérgicas en ésta región del cerebro (Pearce y col., 1997). La disminución del glutatión (GSH) y el aumento del glutatión oxidado (GSSG) es el primer indicador bioquímico de la neurodegeneración de la sustancia *nigra pars compacta* y la magnitud de la disminución del mismo es proporcional a la severidad de la enfermedad; aunque parece que hay una disminución de la actividad enzimática de la

catalasa y de la glutatión peroxidasa en la enfermedad de Parkinson. Además se ha observado un aumento preferencial de la actividad de la superóxido dismutasa (Marttila y col., 1988); aunado a esto, los niveles de hierro, los cuales son mayores en la sustancia *nigra pars compacta* mas que en otras regiones del cerebro debido a su alta afinidad por neuromelanina, se han encontrado elevados en sustancia nigra (Mecocci y col., 1993).

Las anormalidades genéticas así como la exposición a toxinas ambientales pueden generar un estrés oxidativo que dañe específicamente a las neuronas dopaminérgicas, las cuales se mencionó anteriormente son muy sensibles al estrés oxidativo; por ejemplo, la disminución de la ingesta de vitamina E en ratas da lugar a la pérdida de un 33 % de neuronas positivas a la tirosina hidroxilasa en la sustancia *nigra* pero no en otras regiones del cerebro (Dexter y col., 1994).

También se ha encontrado que la noradrenalina y la serotonina (5-hidroxitriptamina) tienen un alto potencial de oxidación y que puede promover el estrés oxidativo (Lotharius y Brundin, 2002).

2.4 Melatonina

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) es un producto de la glándula pineal de los vertebrados (figura 3), y a pesar de que fue descubierta hace más de 40 años, no fue reconocida como una molécula eliminadora de radicales libres muy poderosa (Tan y col., 2002) así como un antioxidante indirecto (Rodríguez y col., 2004). Se creía que la melatonina estaba relacionada solamente con los ritmos circadianos reproductivos, pero se ha observado que sus acciones modulan la función inmune y la fisiología de la retina neuronal

(Reiter y col., 2000) Posee propiedades antineoplásicas, regula la transcripción genética (Blask y col., 1999) y además de esto, posee características preventivas contra el daño oxidativo en una amplia variedad de condiciones experimentales (Crespo y col., 1999).

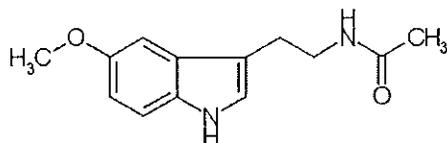


Figura 3 Estructura molecular de la melatonina.

A pesar del desconocimiento acerca del mecanismo mediante el cual elimina los radicales libres y sus productos relacionados, no hay duda de su habilidad para resarcir el daño molecular causado por las especies reactivas de oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN) (Acuña-Castroviejo y col., 2002).

2.4.1 Acciones como antioxidante directo

El radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) se considera muy tóxico para las células debido a su alta reactividad con cualquier molécula que se encuentre, es decir, lípidos, ADN, proteínas o carbohidratos. El primer indicio que demostró la capacidad de la melatonina para neutralizar al radical $\cdot\text{OH}$ apareció hace más de 10 años (Tan y col., 1993), y a partir de esta fecha se confirmó la acción de la melatonina y se ha identificado a la 3-hidroximelatonina cíclica como el producto potencial de la interacción de la melatonina con el radical $\cdot\text{OH}$ (Tan y col., 1998); se propuso que el mecanismo mediante el cual la melatonina ejerce su actividad para eliminar radicales $\cdot\text{OH}$ (figura 4) es a través de la formación

de un radical indólico, el cual elimina otro radical $\cdot\text{OH}$ para dar lugar a la formación de 3-hidroximelatonina cíclica, y es eliminado por medio por la orina (humanos y rata).

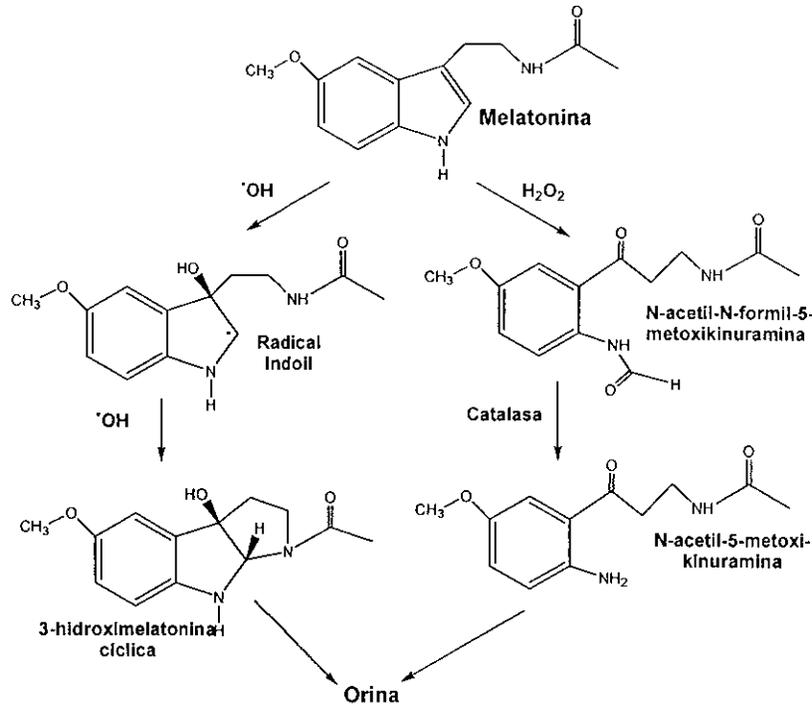


Figura 4 Mecanismo de eliminación de los radicales libres por la melatonina. La eliminación del radical $\cdot\text{OH}$ es a través de la formación de la 3-hidroximelatonina, la cual elimina un segundo radical $\cdot\text{OH}$ para generar la 3-hidroximelatonina cíclica y su posterior eliminación a través de la orina. La eliminación de $\text{O}_2^{\cdot-}$ y de H_2O_2 es a través de la formación de (AFMK), la cual al ser incubada en presencia de catalasa, y convertida en enzima a N-acetil-5-metoxikinuramina (AMK). Tomada de Tan y col., 2000).

Tal cantidad del subproducto es proporcional a la cantidad de melatonina administrada al animal así como al grado de estrés oxidativo del mismo (Tan y col., 1998). También se ha demostrado que la 3-hidroximelatonina cíclica tiene la capacidad de eliminar radicales libres (Lopez-Burillo y col., 2003).

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que es un ERO no radicalario, se genera *in vivo* por varios sistemas enzimáticos, y también se produce intracelularmente

por la acción de la superóxido dismutasa a partir del radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$). El H_2O_2 es un agente oxidante y reductor débil, el cual al no tener carga eléctrica puede atravesar las membranas celulares y acceder a lugares muy distantes de su generación. Al ser muy poco reactivo como se mencionó anteriormente, su toxicidad deriva de la reacción con un metal de transición (por lo general Fe), conocida como reacción de Fenton o través de la reacción de Haber-Weiss para dar lugar al radical $\cdot OH$ (Reiter y col., 2003).

El mecanismo de eliminación de $O_2^{\cdot-}$ y de H_2O_2 (figura 4) es a través de la formación de N¹-acetil-N²-formil-5-metoxikinuramina (AFMK), la cual al ser incubada en presencia de catalasa, es convertida a N-acetil-5-metoxikinuramina (AMK) (Tan y col., 2000). Recientemente se ha sugerido que la AFMK posee la capacidad para eliminar radicales al ser capaz de donar dos electrones. Además la kinuramina es capaz de reducir el daño lipídico y al ADN en presencia de altas concentraciones de radicales libres y disminuir la muerte neuronal cuando las células son expuestas a H_2O_2 , glutamato o β -amiloide (Tan y col., 2001).

El radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) se forma durante la respiración en la mitocondria cuando se pierden electrones de la cadena transportadora de electrones y en la respiración de las células fagocíticas. Este radical posee una baja toxicidad con respecto al radical $\cdot OH$, pero se acopla rápidamente con el óxido nítrico ($NO\cdot$) para producir el anión peroxinitrito ($ONOO^-$), el cual es tan tóxico como el $\cdot OH$ (Reiter y col., 2003).

La eficacia de la melatonina para neutralizar al $O_2^{\cdot-}$ no se ha reportado con precisión, pero se ha propuesto que puede neutralizar al mismo en un sistema meramente químico de hipoxantina/xantina (Marshall y col., 1996); también se

ha mencionado que puede atrapar al $O_2^{\cdot-}$ a través de la señal de resonancia de espín del electrón producida por el aducto óxido de 5,5-dimetilpirrolina: $O_2^{\cdot-}$ (Zhang y col., 1998). A pesar de esto, la capacidad *in vivo* de la melatonina para neutralizar al $O_2^{\cdot-}$ es incierta.

La eficacia de la melatonina para eliminar los radicales peroxilo (LOO^{\cdot}) es aún contradictoria; el primer estudio indicó que la melatonina era el doble de eficaz para eliminar radicales que la vitamina E, al interferir en la propagación de la peroxidación lipídica (Pieri y col., 1994, Reiter y col., 1998), sin embargo, posteriormente se reportó que la melatonina no era un antioxidante eficaz para eliminar los radicales peroxilo (Livrea y col., 1997).

La melatonina puede interactuar con los radicales peroxilo para evitar la peroxidación lipídica (Reiter y col., 1998). Y esto puede deberse a que elimina los radicales que inician la oxidación de los lípidos ($\cdot OH$, $ONOO^{\cdot}$) más que a su actividad directa contra los radicales peroxilo.

El monóxido de nitrógeno (NO^{\cdot}) es una molécula que se produce normalmente en los mamíferos y tiene distintas funciones fisiológicas es un radical libre muy débil. El acoplamiento de esta molécula con el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) da lugar a la formación del anión peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$), que aunque no es un radical, es un oxidante muy destructivo, y daña a cualquier biomolécula cercana (Reiter y col., 2003). La melatonina puede reaccionar a pH fisiológico contra el ácido peroxinitroso ($ONOOH$) o su forma activada ($ONOOH^*$); el producto inicial de esta reacción es el radical melatonil y que un producto final es la 6-hidroxi-melatonina (Zhang y col., 1998), que es el mismo metabolito formado cuando la melatonina es metabolizada en el hígado; sin embargo, la forma en

la cual la melatonina interactúa con las especies reactivas de nitrógeno aún no se ha establecido.

2.4.2 Acciones como antioxidante indirecto

Aparte de acciones como un antioxidante directo se ha visto que la melatonina posee actividades indirectas a través de las cuales puede disminuir el estrés oxidativo, aunque la importancia relativa de los procesos antioxidantes directos e indirectos *in vivo* se desconocen (Reiter y col., 2003).

Las enzimas antioxidantes son la principal defensa contra el daño de los radicales libres, los cuales son convertidos a especies menos reactivas o a productos no tóxicos. Las enzimas que se han estudiado con relación a la melatonina son la superóxido dismutasa (SOD) (las dos, MnSOD y la CuZnSOD), la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPx), la glutatión reductasa (GRd).

La SOD se considera una enzima crítica, ya que transforma al $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 y evita el acoplamiento del $O_2^{\cdot-}$ con el NO^{\cdot} . Se observó que niveles farmacológicos y posiblemente fisiológicos de melatonina estimulan la expresión genética de las enzimas o incrementan su actividad, ya que los niveles de RNAm de ambas enzimas, Mn SOD y Cu/Zn SOD, se incrementaron en un 35 y 51 % respectivamente (Antolin y cols., 1997). También se ha observado que la actividad de la enzima se incrementa en el cerebro de los fetos de ratas después de inyectarle a la madre la melatonina (Okatani y col., 1998) con lo que se confirma la estimulación de la actividad de la enzima por parte de la melatonina así como la habilidad de la misma para cruzar de la

circulación de la madre al feto en cantidades suficientes como para ejercer cambios fisiológicos.

La GPx reduce el daño oxidativo debido a que transforma el H_2O_2 (y otros peróxidos) a H_2O , pero en el proceso el glutatión (GSH) se oxida a su disulfuro (GSSG), el cual se convierte a GSH por la GRd. Los primeros indicios de la estimulación de melatonina sobre la GPx aparecieron hace ya 10 años cuando se demostró que dosis farmacológicas de melatonina dadas a ratas *in vivo* mostraron un incremento de la actividad de esta enzima (Barlow-Walden col., 1995). La habilidad de la melatonina para mantener el balance GSH/GSSG modulando la actividad de ambas enzimas parece ser en un sitio de unión nuclear (Pablos y col., 1997).

La GRd necesita como cofactor al NADPH, el cual se produce por la enzima G6PD, a pesar de que hay poca información, se reportó que también es estimulada por la melatonina (Pierrefiche y Laborit, 1995), por lo que cantidades insuficientes de NADPH limitaría la actividad de la GRd así como la homeostasis del glutatión dentro de las células.

La CAT es otra enzima que elimina al H_2O_2 dentro de las células, se encuentra en casi todos los organismos aeróbicos y se localiza regularmente en los peroxisomas; en los mamíferos los niveles cerebrales de CAT son por lo general más bajos que en otros tejidos (Harris, 1992). La actividad de esta enzima así como otras enzimas antioxidantes es baja en presencia de un gran estrés oxidativo, por lo que esta disminución puede ser contrarestanda por la melatonina (Montilla y col., 2000).

La melatonina también tiene efectos sinérgicos *in vivo* con los antioxidantes clásicos (Gitto y col., 2001) y es más efectiva para reducir el daño oxidativo que las vitaminas mismas (Tan y col., 2002).

La melatonina incrementa la eficacia de la fosforilación oxidativa, es decir, incrementa las actividades de los complejos I y IV de la cadena de transporte de electrones *in vivo* en hígado y cerebro (Martin y col., 2000); además puede revertir el efecto inhibitor sobre estos complejos por parte del MPTP (Absi y col., 2000) así como del rojo de rutenio (Martin y col., 2000). Adicionalmente la administración a largo plazo de la melatonina incrementa el número de mitocondrias en las células (Decaer y Quay, 1982). Por otra parte, experimentos con melatonina radioactiva sugieren la existencia de su unión a la mitocondria (Poon y Pang, 1992).

Por lo anteriormente descrito, la melatonina no solamente protege a las células del daño oxidativo sino que también una vez dañada la célula puede promover indirectamente su reparación.

El tratamiento con melatonina previene la toxicidad del MPP⁺ (metabolito de la MPTP) de distintas maneras: por prevención de la peroxidación lipídica, la inhibición de la sintasa de óxido nítrico (NOS) y a nivel mitocondrial incrementa la eficiencia de la fosforilación oxidativa (Absi y col., 2000) así como la disminución de la fragmentación de DNA y la reducción de la apoptosis celular (Ortiz y col., 2001). Es decir, las acciones antioxidantes de la melatonina explican presumiblemente su habilidad de reducir la toxicidad del MPTP (Reiter y col., 2000).

2.5 El aceite de pescado

Entre los lípidos se incluyen grasas y aceites ordinarios, ceras y compuestos relacionados que se encuentran en los alimentos y en el cuerpo humano. En su mayor parte (95%) están compuestos por triacilglicéridos (TG) que contienen una molécula de glicerol (un alcohol) y tres ácidos grasos. Desde el punto de vista químico, los ácidos grasos son cadenas de hidrocarburos que terminan en un grupo carboxilo en un extremo y en un grupo metilo en el otro. La forma más común de clasificar a los AG es:

- 1) Por su grado de saturación se dividen en saturados e insaturados (monoinsaturados y poliinsaturados).
- 2) Por la longitud de su cadena se clasifican como de cadena corta (4-6 carbonos), media (8-12 carbonos), larga (14-18 carbonos) o muy larga (20 o más carbonos).

De acuerdo a la posición del primer doble enlace de la cadena, denominado *omega*, contando a partir del extremo metilo, existen tres familias de AG poliinsaturados Ω -3, Ω -6 y Ω -9. Algunos AG grasos se clasifican como "ácidos grasos esenciales" (Tabla I) porque no pueden ser sintetizados por el cuerpo humano y además son necesarios para funciones vitales, éstos son los de las familias Ω -6 y Ω -3, conocidos comúnmente como omega 6 y omega 3 (Chow, 1992)

TABLA I
NOMENCLATURA DE LOS ÁCIDOS GRASOS ESENCIALES

Nombre común	Nombre sistemático	Abreviatura	Fórmula
<i>Familia Ω-6:</i>			
Linoleico	Cis-9,12, -octadecatrienoico (LA)	18:2 Ω -6	$C_{18}H_{32}O_2$
γ - Inolénico	Cis-6,9,12 -undecatrienoico	18:3 Ω -6	$C_{18}H_{30}O_2$
Dihomoglinolénico	Cis-8,11,14 -eicosatrienoico	20:3 Ω -6	$C_{20}H_{36}O_2$
Arquidónico (AA)	Cis-5,8,11,14-eicosatetraenoico	20:4 Ω -6	$C_{20}H_{34}O_2$
Adrenico	Cis-7,10,13,16-docosatetraenoico	22:4 Ω -6	$C_{22}H_{40}O_2$
Osmond	Cis-4,7,10,13,16-docosapentaenoico	22:5 Ω -6	$C_{22}H_{38}O_2$
<i>Familia Ω-3:</i>			
α -linolénico	Cis-9,12,15-octadecatrienoico (ALA)	18:3 Ω -3	$C_{18}H_{32}O_2$
Estearidónico	Cis-6,9,12,15-octadecatetraenoico	18:4 Ω -3	$C_{18}H_{30}O_2$
Timnodónico	Cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoico (EPA)	20:5 Ω -3	$C_{20}H_{30}O_2$
Clupmodónico	Cis-7,10,13,16,19-docosapentaenoico (DPA)	22:5 Ω -3	$C_{22}H_{38}O_2$
Cervónico	Cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico (DHA)	22:6 Ω -3	$C_{22}H_{36}O_2$

Fuente: Dupont, 1999.

Las fuentes de AG Ω -3 predominantes en la mayoría de las dietas son los aceites vegetales y el pescado. A excepción de las dietas del Mediterráneo y las de los esquimales de Alaska y Canadá, cuyas fuentes principales de Ω -3 son los aceites de oliva y pescados y grasas de mamíferos marinos respectivamente. Los pescados son la mayor fuente de EPA y DHA, mientras que los aceites vegetales lo son del ácido α -linolénico (conocido como ALA). Otras fuentes de Ω -3 que contribuyen colectivamente en la dieta son algunas nueces y semillas, vegetales, yema de huevo, pollo y carne de rumiantes y cerdos (Ackman, 1992; Chow, 1992, Dupont, 1999; Kris-Etherton y col., 2000; Simopoulos, 1998).

Los ácidos grasos poliinsaturados Ω -3 de origen marino se forman en el cloroplasto de las plantas marinas, microalgas o microalgas que forman parte de la dieta alimenticia de los peces, los cuales concentran EPA y DHA como triacilglicéridos, principalmente en el tejido adiposo y en la grasa del músculo y vísceras (Uauy y Valenzuela, 1992).

Algunos peces, especialmente aquellos de carne roja u oscura, son muy buenas fuentes de EPA y DHA, pero se requieren grandes cantidades para proporcionar una dosis efectiva de Ω -3. El patrón de dieta de los esquimales y el amplio uso de complementos de aceite de pescado sugieren que los Ω -3 marinos son seguros. Dosis de 3-6g de EPA + DHA son seguros y efectivos en la mayoría de los usos clínicos (Uauy y Valenzuela, 1992). En la Tabla II se presenta la composición de ácidos grasos de aceites de pescado comerciales.

TABLA II
 ACIDOS GRASOS Ω -3 EN ACEITES DE PESCADO (g/100g)¹

Aceite de pescado	20:5 Ω -3	22:6 n3	Ω -3 total
Abadejo	1,0	12,7	7,9
Salmón	1,0	8,8	11,1
MaxEPA, concentrados de cuerpo de pez ²	17,8	11,6	
Arenque	0,6-1,6	7,1-9	4,3
Sardina	1,6	10	
Anchoveta	1,1	10	
Arenque	5	6	
Hígado bacalao	0,7-1,1	9-1,2	9,5
Hígado bacalao ³ (mg/cápsula)	173	120	
Cápsulas** (g/cápsula) ⁴			1,84

* cápsulas de aceite de pescado producidas por Pharma Nord Denmark ⁵
 Fuentes: ¹Uauy y Valenzuela, 1992, ²Mahan y Escott, 1998, ³Kris-Etherton *et al.*, 2000, ⁴Deutch *et al.*, 2000

La dieta de nuestros ancestros era mucho menor en grasa total (aprox. 21% de la energía) y grasa saturada (7-8% de energía) que la actual. Aquella contenía aproximadamente las mismas cantidades de ácidos grasos omega 6 (Ω -6) y omega 3 (Ω -3) y se cree que la proporción era de 1:1 ó 1:2. Las fuentes de los Ω -6 y de los Ω -3 eran plantas silvestres, animales y pescados. Con la llegada de la revolución industrial hubo un marcado cambio en la proporción Ω -6/ Ω -3 en la dieta; el consumo de Ω -6 se incrementó a expensas de los Ω -3. Este cambio fue un reflejo del advenimiento de la industria de aceites vegetales así como de un incremento en el uso de granos cerealeros para el ganado doméstico, aunado todo esto a un menor consumo de pescado (Simopoulos, 1999).

Esto ha dado como resultado que una dieta occidental común tenga un alto contenido de Ω -6 debido al uso indiscriminado de aceites vegetales (ricos en Ω -6) en sustitución de las grasas saturadas (cebo, manteca), para reducir las

concentraciones de colesterol sérico, y debido a un bajo consumo de productos marinos; obteniéndose en la dieta una proporción Ω -6/ Ω -3 de 12:1. Esto ha contribuido a incrementar el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares y otros padecimientos de orden común (Simopoulos, 2000).

2.6 La Mitocondria

Las mitocondrias son organelos granulares y filamentosos que se encuentran en el citoplasma de todas las células eucariotas y es el sitio donde se lleva a cabo la respiración celular. (Figura 5). Estos organelos varían en tamaño y forma dependiendo de la fuente y el estado metabólico, pero a menudo son elipsoides de aproximadamente 5 μ m de diámetro y 1 μ m de largo. Una célula eucarionte típica contiene más de 2000 mitocondrias, lo que ocupa alrededor de la quinta parte del volumen celular; esta cantidad es necesaria para satisfacer la demanda energética de la célula. Los tejidos de mamíferos que contienen más mitocondrias son corazón y cerebro.

2.6.1 Anatomía de la mitocondria

Las mitocondrias son organelos de doble membrana: la membrana mitocondrial externa, contiene porinas, que son proteínas que forman poros no específicos que permiten la entrada por libre difusión de moléculas mayores a 10 kD; y la membrana interna, que contiene aproximadamente 75 % de proteína y 25% de lípidos en peso. A través de la membrana interna únicamente son permeables CO_2 , O_2 y H_2O . El paso de metabolitos como el ATP, ADP, piruvato, Ca^{2+} y fosfato, es regulado por proteínas transportadoras

específicas. Esta permeabilidad controlada permite la generación de gradientes iónicos y resulta en la compartimentalización de funciones metabólicas entre el citoplasma y la mitocondria. En la membrana mitocondrial interna se alojan los componentes de la cadena respiratoria y el complejo enzimático responsable de la síntesis de ATP. La membrana interna esta dispuesta en forma de crestas, esto le confiere una gran área superficial, una sola mitocondria puede tener más de 10000 conjuntos de sistemas de transferencia de electrones (cadenas respiratorias) y de moléculas de ATP sintasa distribuidas en toda la superficie de la membrana interna.

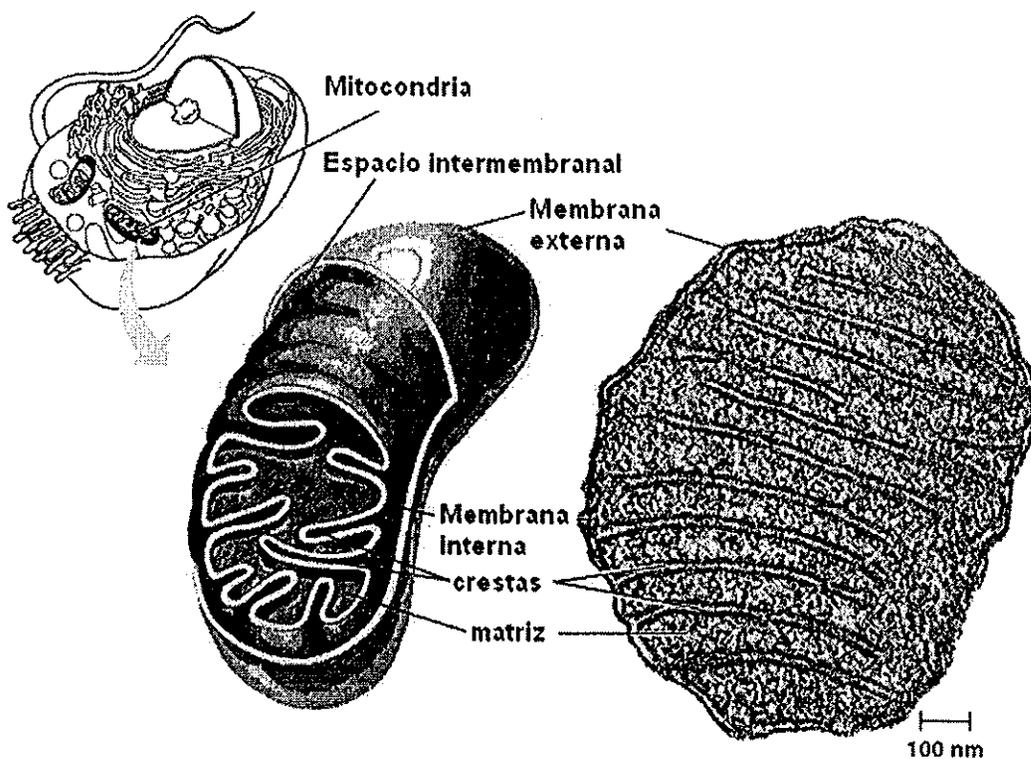


Figura 5. Anatomía Bioquímica de la mitocondria.

La matriz mitocondrial, es el espacio delimitado por la membrana interna y contiene al complejo de la piruvato deshidrogenasa, las enzimas del ciclo del ácido cítrico, de la β -oxidación de ácidos grasos y de la oxidación de aminoácidos. Es decir, la matriz mitocondrial contiene todas las enzimas de las rutas de oxidación de combustibles, excepto las de la glucólisis que tiene lugar en el citosol (Nelson, 2000).

Las membranas mitocondriales externa e interna se separan por centrifugación. Con tal fin, luego de aislar las mitocondrias, se las expone a un medio hipotónico con la consiguiente expansión del volumen mitocondrial (hinchamiento), lo que provoca la ruptura de la membrana externa, y como la membrana interna puede volver a contraerse por exposición a ATP o medio hipertónico, ambas pueden separarse experimentalmente. La membrana externa contiene enzimas características, como la amino-oxidasa, las tioquinasas de los ácidos grasos, y una NADH-citocromo c-reductasa.

La membrana interna es desde el punto de vista funcional, la más importante, pues contiene los componentes de la cadena respiratoria y las proteínas necesarias para la síntesis de ATP. Mediante el uso de colato y desoxicolato es posible fraccionar la membrana mitocondrial interna en complejos característicos y, además, solubilizar las proteínas constituyentes de la cadena respiratoria (Nelson, 2003).

2.7 Membranas biológicas

El contenido de todas las células vivas está rodeado por una membrana delgada llamada membrana plasmática, o celular, que marca el límite entre el

contenido celular y el medio externo. La membrana plasmática es una película continua formada por moléculas de lípidos, proteínas e hidratos de carbono. Los lípidos forman una doble capa y las proteínas se disponen de una forma irregular y asimétrica entre ellos. Estos componentes presentan movilidad, lo que confiere a la membrana un elevado grado de fluidez (cristal líquido), con un espesor entre 8 y 10 nanómetros (nm). Actúa como barrera semipermeable y selectiva regulando la composición química de la célula.

Muchos procesos bioquímicos fundamentales tienen lugar sobre el andamiaje membranoso o en su interior. Por ejemplo, el transporte electrónico y la fosforilación oxidativa, que oxidan nutrientes con la generación concomitante de ATP, están facilitados por una batería organizada de enzimas que son constituyentes de la membrana mitocondrial interna. De igual modo, la fotosíntesis, en la que la energía de la luz permite la combinación química de H_2O y CO_2 para formar glúcidos, tiene lugar en las membranas internas de los cloroplastos.

El tratamiento de la información, tal como los estímulos sensoriales o las comunicaciones intercelulares, es, generalmente, un fenómeno que se realiza en las membranas. Así, los impulsos nerviosos están mediados por las membranas celulares nerviosas y la presencia de ciertas sustancias tales como hormonas y nutrientes se detecta mediante receptores específicos ligados a las membranas.

2.7.1 Fluidez membranal

La fluidez es una de las características más importantes de las membranas biológicas y depende de factores como:

- La temperatura, la fluidez aumenta al aumentar la temperatura.
- La naturaleza de los lípidos, la presencia de lípidos insaturados y de cadena corta favorecen el aumento de fluidez; la presencia de colesterol a bajas concentraciones reduce la fluidez y permeabilidad de la membrana.

Las membranas biológicas deben tener cierta fluidez para que se produzcan los mecanismos de transporte y el reacomodamiento permanente de los componentes de la membrana. Por otra parte, es necesaria cierta estabilidad que mantenga una estructuración de la membrana. Esta estabilidad proviene de las interacciones hidrofóbicas y de las fuerzas de Van der Waals entre las cadenas de los lípidos, y por otra parte, de las fuerzas electrostáticas y las uniones puente hidrógeno entre las cabezas polares de los fosfolípidos y el agua con sus solutos.

La fluidez de las membranas depende de su composición química. Las cadenas de ácidos grasos que constituyen los fosfolípidos y moléculas derivadas de ellos pueden estar saturadas o insaturadas. La relación cadena de ácidos grasos saturados /no saturados influye de manera decisiva en la fluidez de la membrana. La cohesión entre las moléculas de la membrana es mayor en una bicapa con fosfolípidos de ácidos grasos saturados, de cadenas simples, largas y rectas que en una que tenga fosfolípidos con cadenas

insaturadas, que se "quiebran" a la altura de los dobles enlaces, disminuyendo así el efecto hidrofóbico. A su vez, una mayor cohesión determina una menor fluidez.

La molécula de colesterol también juega un papel muy importante en la fluidez de la membrana. Se encuentra en las células eucariontes animales. Se ubica de acuerdo con la afinidad de sus distintas regiones por los componentes polares y no polares de la membrana: su grupo alcohólico se acomoda entre las cadenas carbonadas, en las cabezas polares. Su cadena lateral queda entre las cadenas de los fosfolípidos, pero lejos de sus cabezas polares (Alvira y col., 1998).

La presencia de colesterol presenta un doble efecto. En cierta medida, aumenta la rigidez de la membrana, ya que los anillos rígidos interactúan con las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos, inmovilizándolas parcialmente. Además agrega orden a la bicapa, dejando zonas más rígidas y otras zonas más flexibles que interactúan con las cadenas de carbono de los fosfolípidos. Así es como el colesterol tiende a hacer menos fluidos a los lípidos. Sin embargo, cuando se encuentran en altas concentraciones, como ocurre en la mayoría de las células eucariotas, previene el congelamiento, ya que evita que las cadenas carbonadas se ajusten y se "empaqueten" y vuelvan más rígidas a la membrana. Así es como, a baja temperatura esta disminución del empaquetamiento puede determinar que las membranas no se congelen (BIOQUIMICA DE LEHNINGER).

2.7.2 Las Bicapas lipídicas son fluidos bidimensionales

La fluidez de la bicapa varía con la temperatura, cuando una bicapa lipídica se enfría por debajo de una temperatura de transición característica experimenta un cambio o transición de fase. Por debajo de la temperatura de transición la membrana está en fase gel, esto es, las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos quedan totalmente extendidas y se empaquetan en un ordenamiento hexagonal al igual que las parafinas cristalinas. Por encima de la temperatura de transición de fase la membrana está en fase líquido-cristalino y las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos están torcidas, lo que impide un empaquetamiento eficiente de los mismos (Alvira y col., 1998).

La temperatura de transición de una bicapa aumenta con la longitud de la cadena y el grado de saturación de los restos de los ácidos grasos que la componen por las mismas razones que las temperaturas de fusión de los ácidos grasos aumentan con estos parámetros. Las temperaturas de transición de la mayoría de, membranas biológicas están en el intervalo de 10 a 40 °C, El colesterol, que por sí mismo no forma una bicapa, disminuye la fluidez de la membrana porque su rígido sistema anular esteroide interfiere con los movimientos de las cadenas laterales de los ácidos grasos. También amplía el intervalo de temperaturas de la transición de fase aboliéndola totalmente a altas concentraciones. Este comportamiento tiene lugar porque el colesterol inhibe la cristalización de las cadenas laterales de los ácidos grasos al colocarse entre ellas. De este modo el colesterol actúa como plastificante de la membrana.

La fluidez de las membranas biológicas es uno de sus atributos fisiológicos importantes ya que permite que interaccionen sus proteínas incrustadas en la misma. Las temperaturas de transición de las membranas de mamíferos están muy por debajo de la temperatura corporal por lo que estas membranas tienen un carácter de tipo fluido. Las bacterias y los animales poiquilotermos (de sangre fría) tales como los peces modifican (mediante biosíntesis y degradación de lípidos) la composición en ácidos grasos de sus lípidos de membrana según la temperatura ambiente de modo que se mantenga la fluidez de la membrana. Por ejemplo, la viscosidad de la membrana de *E. coli* a su temperatura de crecimiento permanece constante cuando la temperatura varía de 15 a 43 °C. (Alvira y col., 1998).

2.7.3 Técnicas para la cuantificación de la fluidez membranar

Con el fin de hacer mediciones “cuantitativas” de la fluidez o microviscosidad de las membranas biológicas, se ha implementado el uso de algunos métodos físicos. Por ejemplo se ha empleado la RMN (Nichol y col., 1980). Asimismo se ha usado la polarización (Eisenbach, y col., 1990) y la anisotropía de fluorescencia (Tanji, y col., 1992) para obtener valores relativos de microviscosidad. Otro enfoque con monitores fluorescentes para estudios de microviscosidad membranar involucra, en un proceso bimolecular, la formación de excímeros intermoleculares por la asociación de moléculas aromáticas en el primer estado excitado con moléculas de la misma especie en su estado basal. También se ha propuesto la detección de excímeros intramoleculares con moléculas aromáticas (benceno, naftaleno, antraceno o pireno) generalmente unidas por una cadena de alcano. La principal ventajas de utilizar la formación

de excímeros intramoleculares sobre los intermoleculares, reside primariamente en la posibilidad que ofrece la primera técnica de usar concentraciones muy bajas de monitor fluorescente, del orden de 1×10^{-6} M y aún menores. Esto minimiza la perturbación del medio bajo investigación por la presencia del fluoróforo y evita la formación de agregados de éste, un fenómeno que ha sido reportado que ocurre con el pireno (Galla, y col., 1974). El dipirenilpropano (DPiP) en particular (Figura 6), es muy adecuado para estudios de formación de excímero intramolecular debido a su alta producción cuántica de fluorescencia de excímero y al hecho de que no se ha encontrado que ocurran reacciones fotoquímicas a la formación del mismo.

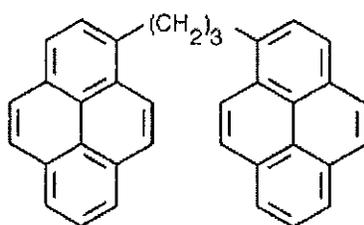


Figura 6. Estructura química del dipirenilpropano.

La formación de excímero intramolecular en medios viscosos, tales como bicapas de fosfolípidos, esta determinada principalmente por el movimiento de los grupos finales a través del medio, es decir, por la fluidez del medio ambiente y no por la constricción resultante en la rotación de las cadenas, lo cual involucra energías de activación considerablemente pequeñas.

Como una primera aproximación para conocer el comportamiento de las fluorescencias del DPiP en un medio con diferentes valores de viscosidad, Mejía-Zepeda, R. disolvió el DPiP en una parafina líquida

espectrofotométricamente transparente conocida comercialmente como parafina viscosa y determinó los espectros de emisión de fluorescencia a diferentes temperaturas (Mejía, y col., 1999).

Mejía-Zepeda, R encontró que a temperatura baja, la emisión de fluorescencia del monómero (379 nm) es alta y disminuye conforme aumenta la temperatura. Contrariamente, la emisión de fluorescencia del excímero (480 nm) es menor a temperaturas bajas que a temperaturas altas. A pesar de que es evidente que la emisión de fluorescencia del monómero disminuye con la temperatura y la emisión del excímero aumenta, estos cambios de excímero y monómero no se corresponden en magnitud, sino que es mucho mayor la magnitud de disminución del monómero que el aumento del excímero. Además a 448 nm se presenta un punto isoemisivo.

De estas lecturas de las Intensidades Relativas de Fluorescencia (IRF) en los picos de emisión máxima, se obtuvo el cociente de fluorescencia de excímero/monómero (I_e/I_m). (Figura 7). Este cociente es menor a temperaturas bajas y aumenta conforme se incrementa la temperatura a la que se encuentra la parafina. Así la viscosidad de la parafina líquida disminuye con la temperatura, mientras que el cociente de fluorescencias I_e/I_m aumenta. De esta forma se hace evidente que la relación de fluorescencias de excímero a monómero refleja aproximadamente la fluidez del medio, lo cual puede considerarse el inverso de la viscosidad.

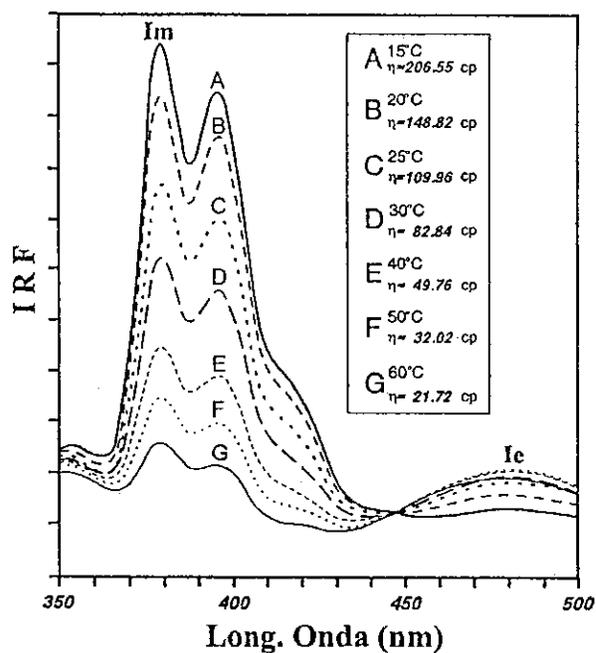


Figura 7. Espectros de emisión de fluorescencia del dipirenilpropano (DpiP) en la parafina líquida a distintas temperaturas. El pico de emisión máxima de monómero (Im) ocurre a 379 nm, en tanto que el excímero (Ie) a 480 nm. Excitación a 329 nm. El punto isoemisivo se presenta a 448 nm. La intensidad relativa de fluorescencia se representa como IRF.

3. JUSTIFICACIÓN

Se menciona que en nuestro país la enfermedad de Parkinson se presenta de 40 a 50 casos por cada 100,000 habitantes, y además, la enfermedad se presenta en un mayor porcentaje de la población conforme se incrementa la edad de la misma. La enfermedad de Parkinson se considera de origen desconocido debido a que no se han podido dilucidar los mecanismos moleculares que conllevan al desarrollo de la misma, de ahí la importancia de resolver la incógnita que rodea el origen de dicha enfermedad. En nuestro estudio se quiere determinar si existe alguna relación entre la cantidad de radicales libres y la fluidez de la membranas de hepatocitos de ratones C57/Bl6 después de la administración del MPTP; si existe protección a la oxidación y la fluidez de membranas con tratamientos previos de aceite de pescado (omega-3) y Melatonina.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Cuando el exceso de radicales libres supera a los antioxidantes naturales se presenta el fenómeno conocido como estrés oxidativo, que se manifiesta en alteraciones que se reflejan en la bioquímica y en la fisiología de las membranas y por ende de toda la célula.

Una de las propiedades de las membranas, es que se modifica por estos radicales libres, es la fluidez de la membrana. La que al perturbarse, más allá de un nivel crítico, induce cambios en numerosos procesos de transporte de iones y moléculas, las actividades enzimáticas de las proteínas integrales pueden detenerse o modificarse y los procesos de transducción de señales se alteran.

El estrés oxidativo se ha asociado a numerosas enfermedades neurodegenerativas, entre ellas la enfermedad de Parkinson. La enfermedad de Parkinson se considera de origen desconocido debido a que no se han podido dilucidar los mecanismos moleculares que conllevan al desarrollo de la misma. Para estudiar con detalle la importancia del estrés oxidativo y de la fluidez de las membranas en la enfermedad de Parkinson, producimos el síndrome parkinsoniano en ratones, con el suministro de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina.

Datos previos de laboratorio muestran que el aceite de pescado y la melatonina disminuyen la actividad de peroxidasa de la ciclooxigenasa 2, en el modelo del MPTP. Con la disminución en esta actividad enzimática se esperaría una disminución en los radicales libres que generaría el MPTP.

5. HIPÓTESIS

El aceite de pescado y la melatonina disminuirá la concentración de lipoperóxidos y óxido Nítrico y regularán las alteraciones en la fluidez de las membranas totales y mitocondriales en forma positiva de los hepatocitos que induce el suministro de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina. Por otra parte existirán diferencias entre el aceite de pescado y la melatonina en donde regularán eficientemente la producción basal de productos del estrés oxidativo y la fluidez de membrana.

6. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el estrés oxidativo en suero y la fluidez de las membranas de hígado de ratones de la cepa C57/Bl6, después de la administración de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina, aceite de pescado y melatonina

6.1 Objetivos particulares

1. Obtener fracciones purificadas de membranas totales y membranas mitocondriales de hígado de ratón por medio de centrifugaciones diferenciales.
2. Determinar en suero el perfil basal de productos del estrés oxidativo celular como son los lipoperóxidos: malonaldehído y 4-hidroxiálquenos, así como los productos indirectos del óxido nítrico como son: los nitratos y los nitritos
3. Determinar la fluidez basal de membranas totales y mitocondriales de hepatocitos de ratones testigo, por espectroscopia de fluorescencia
4. Determinar en suero los productos del estrés oxidativo celular como son los lipoperóxidos: malonaldehído y 4-hidroxiálquenos, así como los productos indirectos del óxido nítrico como son: los nitratos y los nitritos, en muestras de ratones tratados con MPTP, aceite de pescado y melatonina de forma aguda (6 y 24 horas), así como crónica (7 y 15 días).
5. Determinar la fluidez de membranas totales y mitocondriales de hepatocitos de ratones tratados con MPTP, aceite de pescado y melatonina de forma aguda (6 y 24 horas), así como crónica (7 y 15 días).

7. METODOLOGÍA

7.1 Tratamiento de los animales

Se utilizaron ratones de la cepa C57/BL6 los cuales se mantuvieron en jaulas de policarbonato limpias, en ciclos de luz:oscuridad (12:12h), a una temperatura controlada de 22 ± 2 ° C. Los ratones fueron alimentados con alimento estándar y agua *ad libitum*.

Los grupos se separaron de la siguiente manera:

El Grupo I (Testigo) recibió dos inyecciones subcutáneas de solución salina isotónica v/v.

El Grupo II recibió aceite de pescado (proporcionado por la Zona Diet, México; Omega Dr Sears®) vía intragástrica (diariamente durante todo el experimento) a una dosis de 100 µl (0.0368 g EPA; 0.0184 g DHA).

El Grupo III recibió dos inyecciones de melatonina (10 mg/Kg) por vía intraperitoneal (de acuerdo al esquema del MPTP), posteriormente se le administró la melatonina en el agua de beber durante todo el experimento de acuerdo al subgrupo.

El Grupo IV recibió dos inyecciones de MPTP (disuelto en solución salina) vía subcutánea, con una concentración de 20 mg/Kg, con una diferencia de 24 horas entre cada inyección.

El Grupo V recibió MPTP y el aceite de pescado, de la manera antes mencionada.

El Grupo VI recibió MPTP y melatonina, de la manera antes mencionada.

Los ratones así como sus grupos fueron divididos en subgrupos de acuerdo al estudio a realizar pero siempre la N fue igual a 8.

Este estudio se realizó a las 6 y 24 horas (fase aguda), así como a los 7 y 15 días (fase crónica) en los 8 grupos. Los animales fueron decapitados, se obtuvo el hígado el cual se congeló inmediatamente a -25°C y posteriormente a -80°C hasta el momento de realizar los ensayo bioquímicos de fluidez de membranas y de estrés oxidativo (peroxidación lipídica y análisis de catabolitos del óxido nítrico).

7.2 Aislamiento de membranas mitocondriales

El hígado se colocó en el siguiente medio: sacarosa 250 mM, Hepes 25 mM (pH 7.5) y EGTA 1mM en hielo (medio SHE). Se dieron varios tizeretazos al órgano y se enjuagó varias veces hasta que el SHE ya no tenía sangre. Se dejó en volumen mínimo del medio y se trituró con tijeras hasta obtener un homogeneizado, se colocó en un homogenizador con vástago de teflón, en hielo. Se repartió la muestra en cuatro tubos de centrifuga y se aforo cada tubo a 35 ml con SHE. Se centrifugó 395 g durante 10 minutos. Enseguida se decantó el sobrenadante en otros 4 tubos y se centrifugó a 4039 g durante 10 minutos. Posteriormente, se desechó el sobrenadante y se resuspendió cada

pellet con pincel de cerdas finas en albúmina delipidada al 1% final en 1.5 ml de SHE y se incubó con agitación durante 10 minutos. Posteriormente se centrifugó a 5045 g durante 10 minutos y el precipitado se resuspendió en 100 μ l de SHE (34).

7.3 Aislamiento de membranas totales

El hígado se colocó en el siguiente medio: sacarosa 250 mM, Hepes 25 mM (pH 7.5) y EGTA 1mM en hielo (medio SHE). Se dieron varios tizeretazos al órgano y se enjuagó varias veces hasta que el SHE ya no tenía sangre. Se dejó en volumen mínimo del medio se trituró y se colocó en un homogenizador con vástago de teflón, en hielo hasta tener una mezcla. Enseguida el homogenizado se centrifugó a 349 g durante 10 minutos. Al sobrenadante se añadió 5 volúmenes de amortiguador 40 mM Tris-HCl (pH 6.8) y se centrifugó a 9447 g durante 20 minutos. El precipitado se resuspendió en un volumen pequeño de amortiguador Tris-HCl (pH 6.8) y se guardó a -80 °C, hasta su uso.

7.4 Determinación de lipoperoxidos (malondialdehído + 4-hidroxi-alquenos)

Los animales se sacrificaron por decapitación y se recibió la sangre en tubos con EDTA, se centrifugó a 224 g durante 5 minutos para obtener el suero, el cual se congeló a -80 °C hasta el momento del análisis. Cuando se realizó el análisis se descongeló la muestra y se agregó 200 μ L a un tubo y así como 650 μ L del N-metil-2-fenilindol en acetonitrilo diluido, se agitó en vórtex, se agregó 150 μ L de ácido metansulfónico 1.5 M, se mezcló y se tapó el tubo. Se incubó a 45 °C durante 60 minutos, las muestras que se encontraban turbias se

centrifugaron a 685 g durante 10 minutos hasta obtener un sobrenadante claro, posteriormente el sobrenadante se transfirió a la celda del espectrofotómetro y se leyeron a 586 nm. Se empleó como estándar el malondialdehído.

7.5 Determinación de nitratos/nitritos

Los animales se sacrificaron por decapitación y se recibió la sangre en tubos con EDTA, se centrifugó a 224 g durante 5 minutos para obtener el suero, el cual se congeló a -80 °C hasta el momento del análisis. Cuando se realizó el análisis se descongeló la muestra y los nitratos se convirtieron a nitritos mediante la incubación de la muestra con la enzima nitrato reductasa en presencia de NADPH durante 1 hora a 37 °C; posteriormente se utilizó a la enzima lactato deshidrogenasa para eliminar el NADPH. Volúmenes iguales de muestra y de reactivo de Griess se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos y se midió la absorbancia a 550 nm. Se empleó como estándar el nitrito de sodio.

7.6 Determinación de la fluidez membranal

La fluidez de membranas totales y mitocondriales se monitoreo mediante espectroscopia de fluorescencia a 30 °C, mediante el cociente de fluorescencias del excímero a monómero del dipirenilpropano (DPiP) incorporado en estas membranas, como se describe a continuación:

$$I_e/I_m = \frac{\text{Fluorescencia a 480nm DPiP membranas - Fluorescencia a 480nm DPiP membranas} \\ \text{Tiempo a 3 horas}}{\text{Fluorescencia a 480nm DPiP membranas - Fluorescencia a 480nm DPiP membranas} \\ \text{Tiempo a 3 horas}}$$

En donde la fluidez sera directamente proporcional al valor del cociente I_e/I_m . El DPiP se disolvió en etanol absoluto grado espectroscópico para tener una concentración de 0.02 mg/ml. Se añadió un volumen adecuado de DPiP para que quede una relación de molécula fluorescente a fosfolípidos de 1:1400. A continuación se incubaron las membranas con el DPiP durante 4 horas a 4 °C para asegurar la incorporación máxima de la molécula fluorescente a las membranas. Enseguida se efectuó un espectro de emisión de fluorescencia en un espectrofluórometro Perkin-Elmer LS50 B controlado por computadora y equipado con un portaceldas. Las condiciones para el espectro de emisión de fluorescencia son: longitud de onda de excitación 329 nm; registro de emisión de fluorescencia de 350 a 500 nm; aberturas del paso de luz (slit's) de excitación y emisión de 10 nm. Se registraron también las lecturas de los picos de emisión máxima del monómero (I_m) a 379 nm y del pico de emisión máxima de excímero (I_e) a 480 nm.

Se hicieron las lecturas de fluorescencia de las muestras con DPiP y de las muestras control (sin DPiP); los valores obtenidos para estas últimas se restan a los de fluorescencia de las primeras para eliminar la contribución de la dispersión de luz a las mediciones. Así con estos valores se calcula el cociente de fluorescencias I_e/I_m para cada muestra.

8 ANALISIS ESTADÍSTICO

Los datos se analizaron mediante pruebas de varianza de una-vía (ANOVA). Cuando los valores de F son significativos, se usó la prueba de Student-Newman-Keuls para comparar los grupos experimentales con el control. El nivel de significancia será menor de 0.05 para ser aceptado.

9. RESULTADOS

En la figura 8 se muestra el contenido de nitratos/nitritos en suero de ratones después de 6 horas de los tratamientos previamente descritos. Se advierte que la cantidad de los nitratos/nitritos del grupo testigo es semejante al de los grupos tratados con melatonina y aceite de pescado. En tanto que en el MPTP induce un aumento significativo en relación al grupo testigo. Además se observa que tanto el aceite de pescado como la melatonina revierten parcialmente el aumento de los nitratos/nitritos que induce el MPTP.

A las 24 horas del tratamiento (Figura 9) se advierte que el efecto del MPTP se mantiene, pues los nitratos/nitritos se mantienen significativamente más altos que los grupos testigo, melatonina y aceite de pescado. También se advierte que la melatonina y el aceite de pescado revierten parcialmente el efecto del MPTP, sin embargo el efecto de la melatonina es mayor al del aceite de pescado.

Después de 7 días y 15 días (figuras 10 y 11, respectivamente) de iniciados los tratamientos, los nitratos/nitritos en el grupo tratado con MPTP, son todavía significativamente mayores a los grupos testigo y tratados con aceite de pescado y melatonina. Se observa también que la melatonina y el aceite de pescado disminuyen parcialmente el efecto del MPTP.

En la figura 12 se muestran la cantidad de lipoperóxidos cuantificados en suero, después de las 6 horas de iniciado el tratamiento de los ratones. Se muestra que la melatonina disminuye la cantidad basal de lipoperóxidos, esto es, el valor de los lipoperóxidos en el grupo tratado con melatonina, es significativamente menor al del grupo testigo. Además, los lipoperóxidos tienen valores similares en el grupo testigo y tratado con aceite de pescado. El MPTP

induce un aumento significativo en relación con el grupo testigo. (Figura 12-15)
Se observa que la melatonina revierte completamente el efecto del MPTP. Sin embargo el aceite de pescado revierte parcialmente el efecto del MPTP.

Figura 8

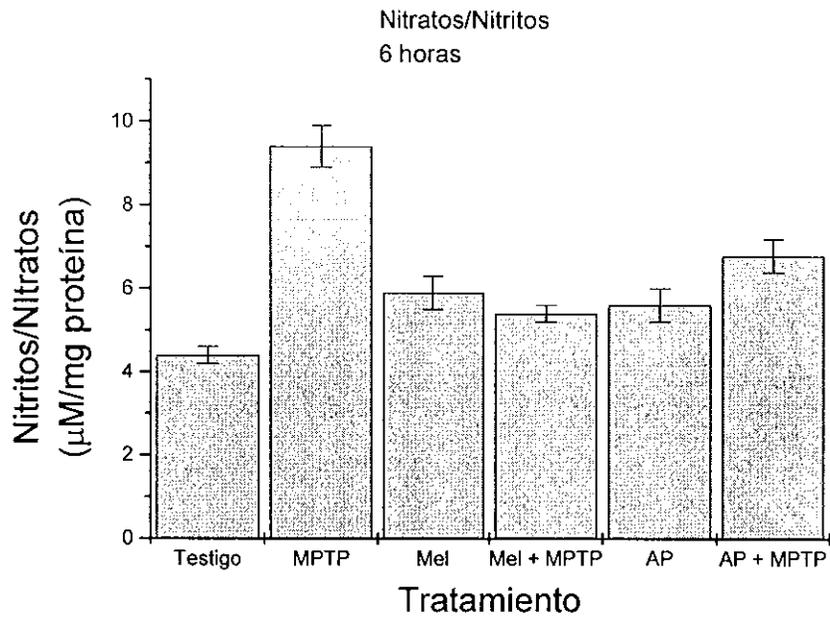


Figura 9

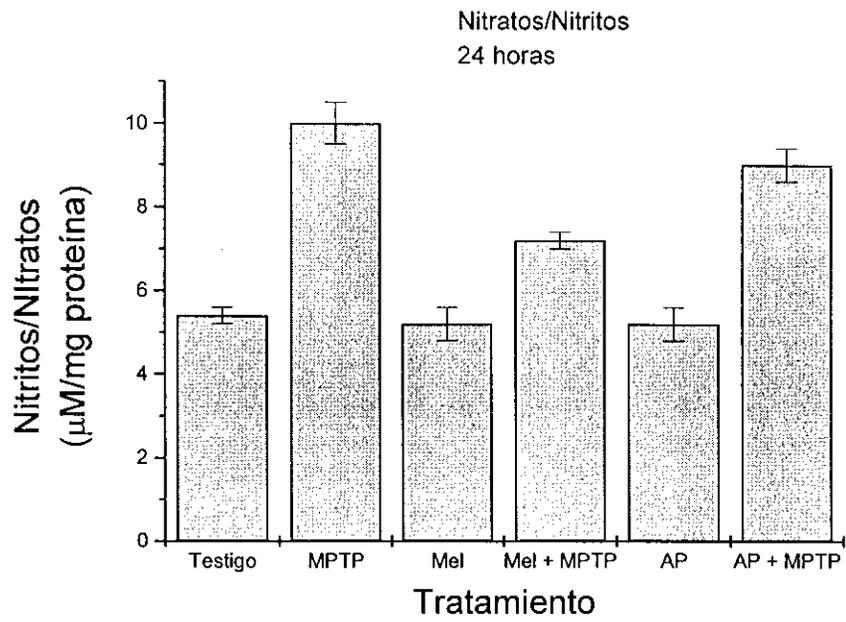


Figura 10

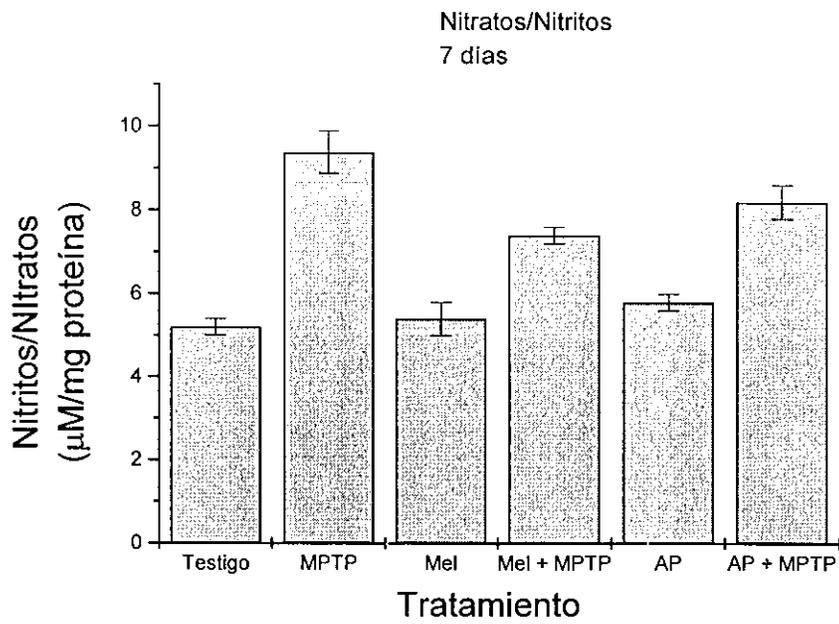


Figura 11

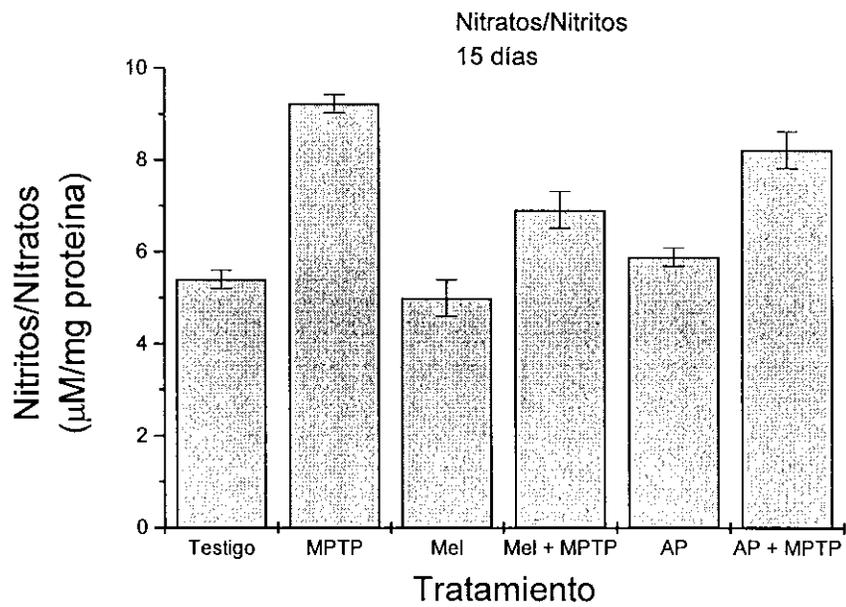


Figura 12

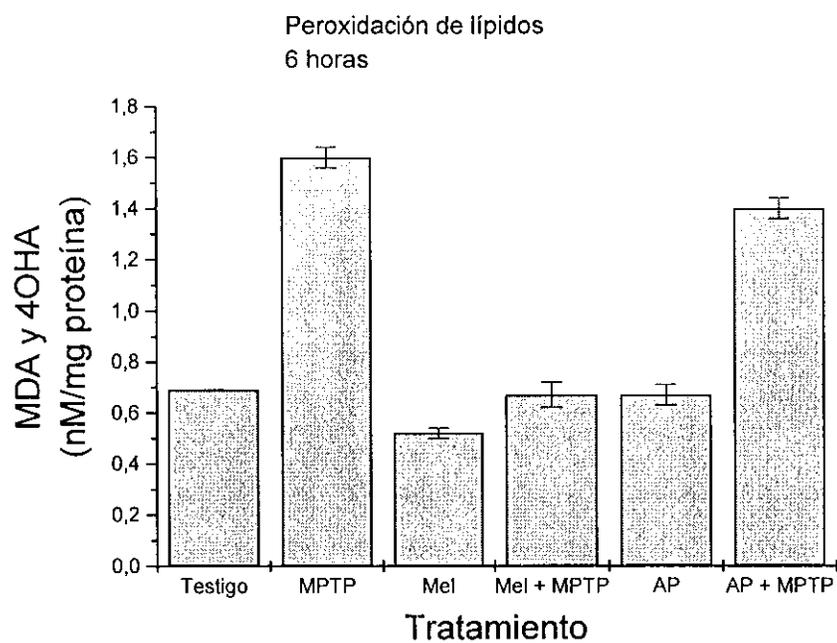


Figura 13

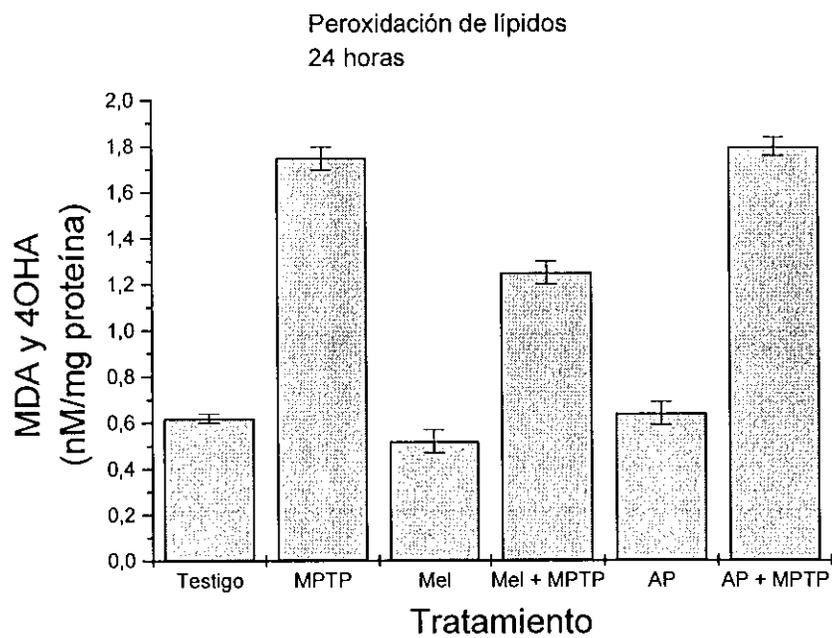


Figura 14

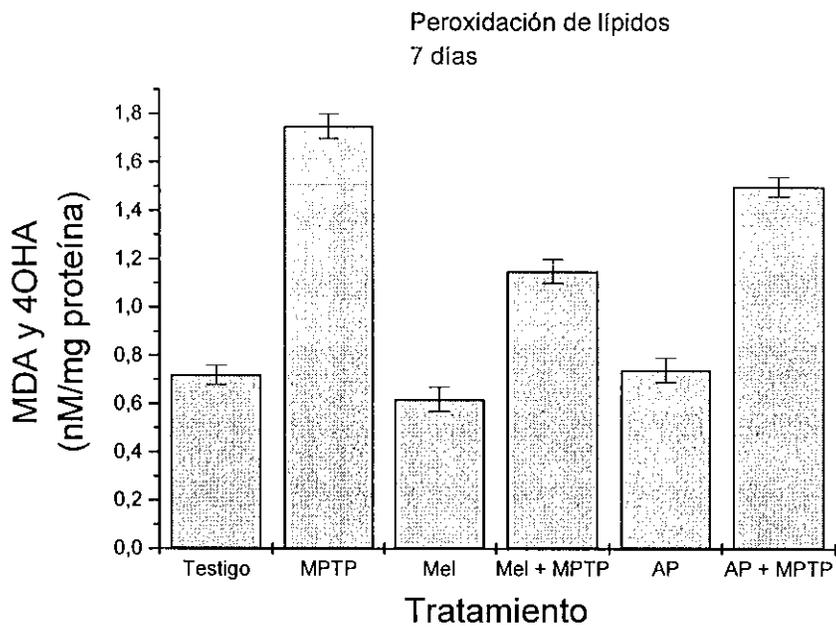
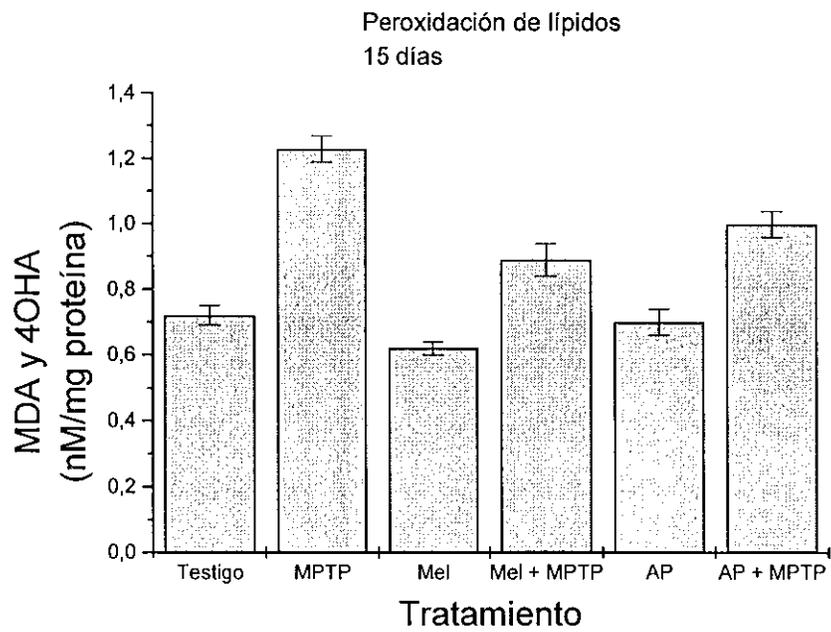


Figura 15



Debido a que los ácidos grasos poliinsaturados constituyen un blanco preferencial de los radicales libres que alteren estas biomoléculas al generar una reacción en cadena o de lipoperoxidación y a que las estructuras que se afectan particularmente son las membranas celulares. Evalué la fluidez en las membranas celulares, como una aproximación inicial y posteriormente evalué la fluidez en las membranas mitocondriales.

En la figura 16 – 19 se observa que el MPTP induce una disminución significativa de la fluidez de las membranas celulares, en comparación con el grupo testigo. Efecto que se manifiesta desde las 6 horas del tratamiento. Además en la figura 1 se advierte que la melatonina mantiene la fluidez de las membranas celulares y muestra una tendencia a aumentar la fluidez cuando es administrada simultáneamente con el MPTP. En relación con el grupo de aceite de pescado, encontramos que disminuye la fluidez. Sin embargo, la fluidez se recupera cuando se administra simultáneamente el MPTP y el aceite de pescado.

A las 24 horas (figura 17), la melatonina disminuye la fluidez de las membranas celulares, fenómeno que es revertido parcialmente por el MPTP. En el tratamiento del aceite de pescado la fluidez se mantiene a valores semejantes al grupo testigo y grupo de aceite de pescado + MPTP.

A los 7 días del tratamiento (figura 18) la diferencia importante es que la fluidez esta disminuida en relación al grupo testigo en los grupos tratados con melatonina y melatonina + MPTP.

A los 15 días (figura 19) la fluidez de las membranas celulares se mantiene en valores semejantes al grupo testigo, excepto en el grupo de aceite de pescado + MPTP.

En las membranas mitocondriales (figuras 20 - 23) la fluidez disminuyó significativamente en el grupo tratado con MPTP, en comparación al control. Efecto que fue más notorio a las 6 horas del tratamiento (figura 20).

Asimismo, a las 6 horas (figura 20) la melatonina no modificó la fluidez de la membrana mitocondrial. Sin embargo, fue capaz de revertir parcialmente la disminución de la fluidez que induce el MPTP. La fluidez en el grupo de aceite de pescado disminuyó en comparación al grupo testigo. En este caso, el MPTP indujo un aumento en la fluidez.

A las 24 horas del tratamiento (figura 21) la fluidez de las membranas mitocondriales disminuyó en los grupos tratados con melatonina y melatonina + MPTP.

A los 7 días del tratamiento (figura 22) la fluidez mitocondrial disminuyó solo en los grupos tratados con melatonina y melatonina + MPTP. A los 15 días (figura 23) la fluidez mitocondrial fue menor en los grupos tratados con aceite de pescado + MPTP.

Figura 16

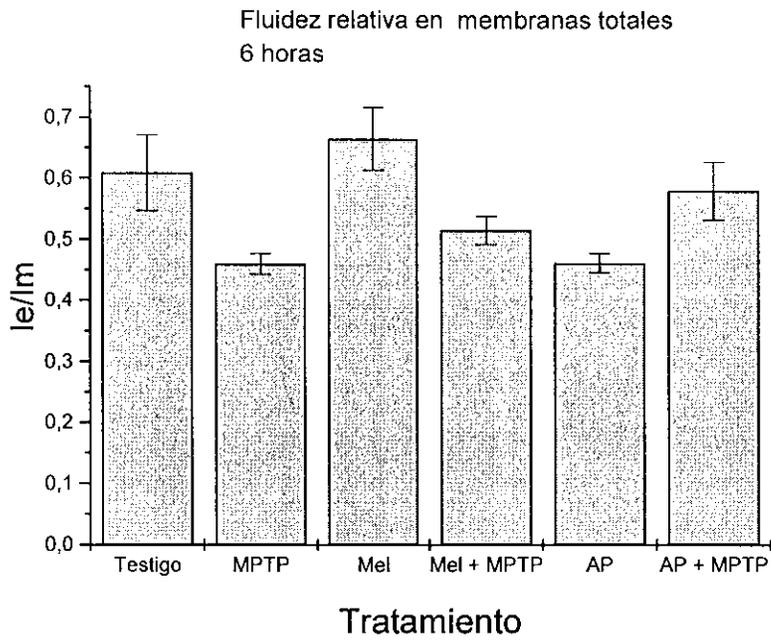


Figura 17

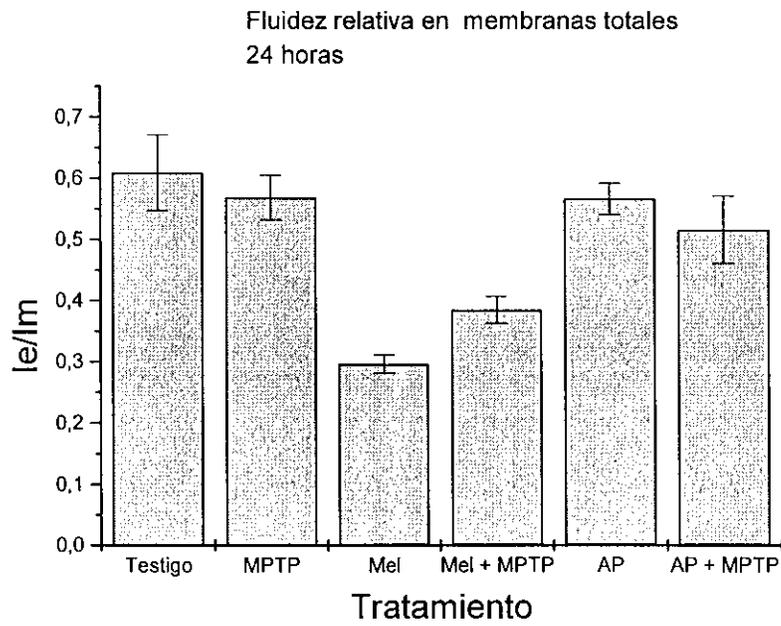


Figura 18

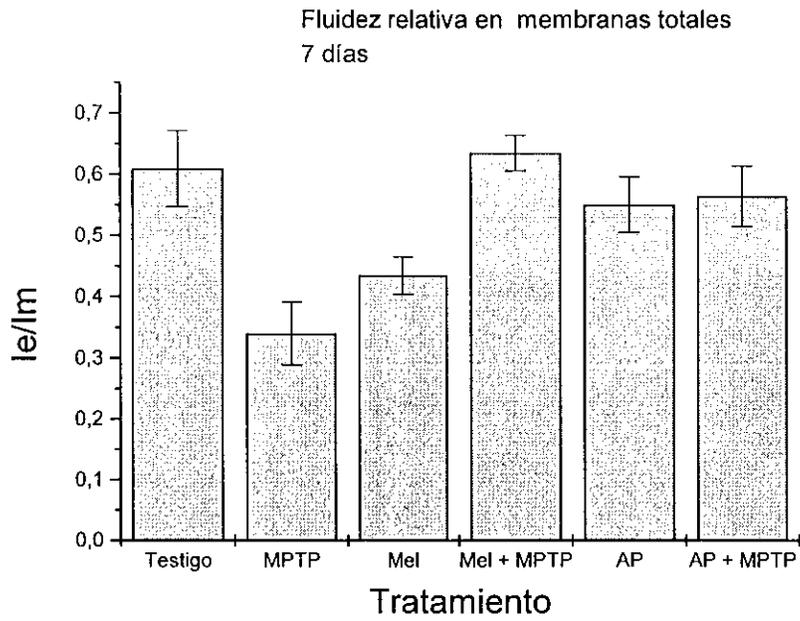


Figura 19

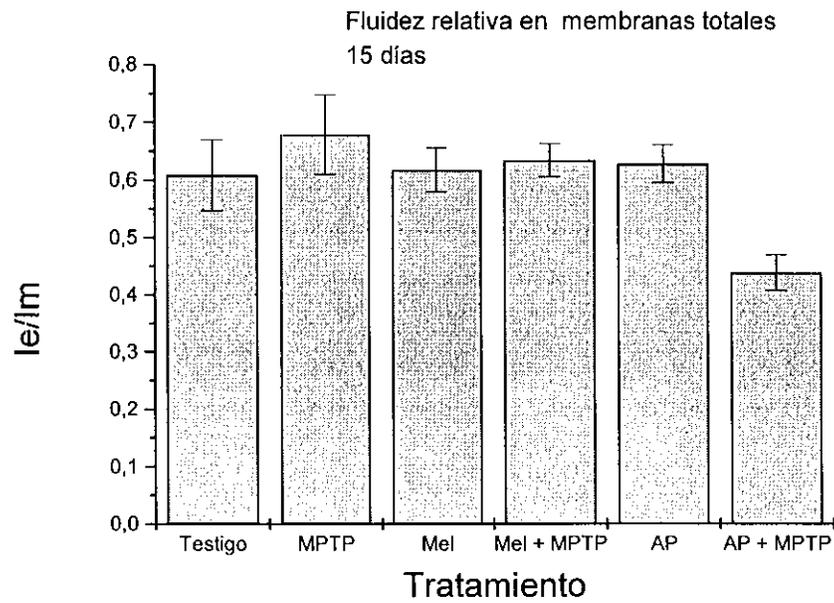


Figura 20

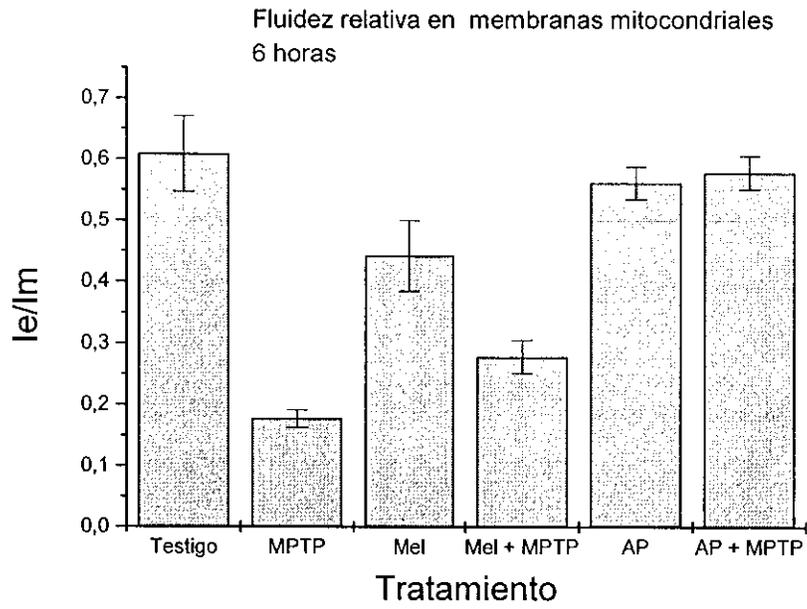


Figura 21

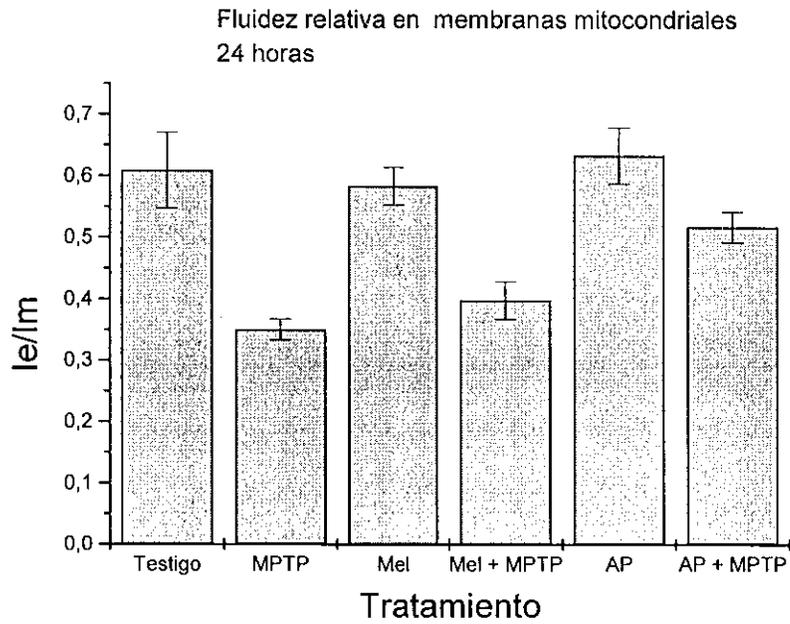


Figura 22

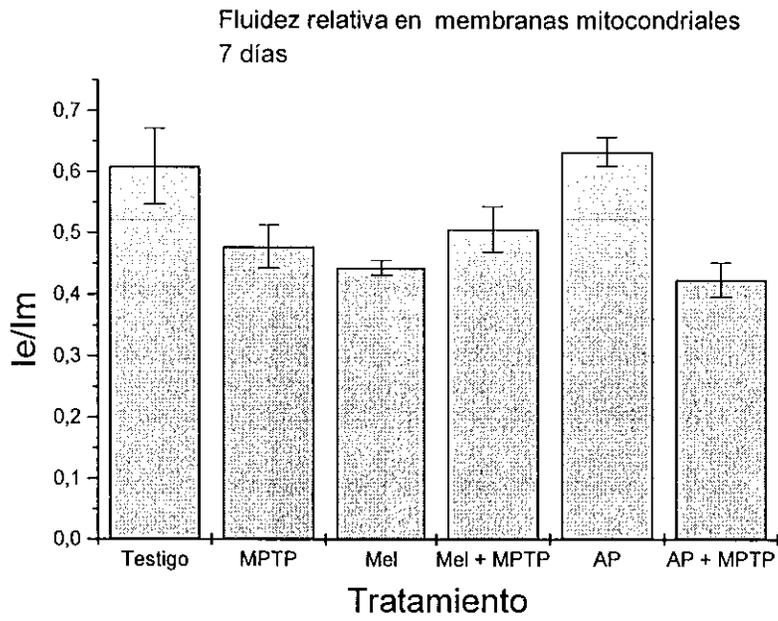
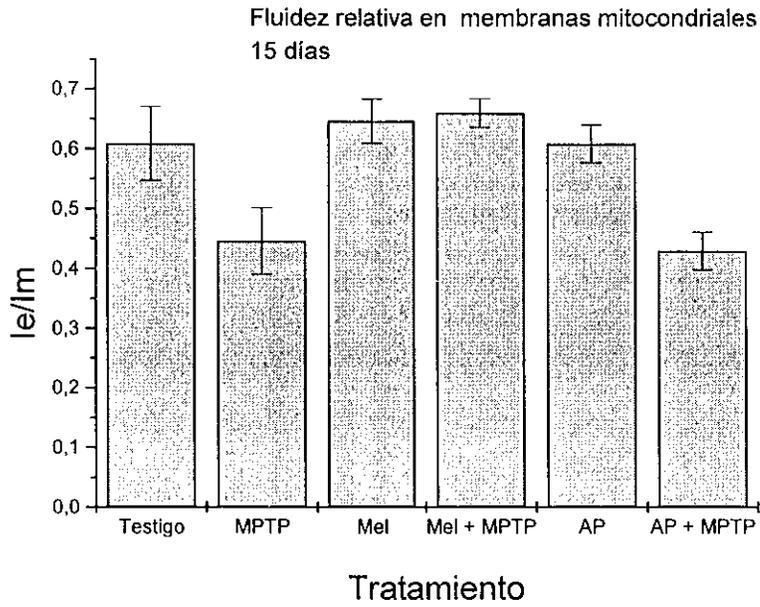


Figura 23



10. Discusión

En las figuras 8-15, se observa como una vez administrado el MPTP aumenta el estrés oxidativo en el suero de estos animales. La medición de los niveles de lipoperóxidos así como los de nitratos/nitritos en estos grupos tratados con MPTP nos muestra como estos metabolitos se incrementan debido a que se desencadena un daño oxidativo sistémico, que además de dañar al mesencéfalo afecta otros tejidos periféricos. Esto se puede observar fácilmente a partir de las 6 horas después de la administración del MPTP, aunque cabe mencionar que este efecto se mantiene aún 15 días después. Estos datos, aportados por nuestro grupo de investigación (Ortiz y col., 2001) así como de otros grupos (Acuña-Castroviejo y col., 2000) fortalecen el concepto de que buena parte del daño observado en el modelo experimental del MPTP es debido al estrés oxidativo. Al comparar los resultados de los productos de la lipooxidación así como de los catabolitos del óxido nítrico (nitratos/nitritos) se observó que tanto en forma aguda como crónica el incremento de ambos es sumamente importante. Este aumento en el estrés oxidativo inducido por el MPTP se asocia a un aumento en la actividad de peroxidasa de la ciclooxigenasa 2 (COX-2) (Gómez-Rodríguez 2006 Tesis de Maestría)

Una vez que la melatonina se administra junto al MPTP (Figuras 8-15), se puede observar una disminución en la concentración de estos productos oxidativos de manera significativa a las 6 horas, obteniéndose valores similares al de los testigos. Sin embargo a tiempos mayores (1-15 días) la melatonina revierte parcialmente el efecto del MPTP. Esto puede deberse a varios aspectos entre ellos, la disminución de citocinas proinflamatorias provenientes de la actividad catalítica de peroxidasa de COX-2, la eliminación de radicales

y/o la capacidad que tiene la melatonina para incrementar la eficacia de las enzimas de nuestro sistema antioxidante.

De manera similar a la melatonina, el aceite de pescado disminuyó parcialmente el estrés oxidativo que indujo la adición de MPTP (figuras 8-15). Lo que indica que el aceite de pescado protege del daño oxidativo inducido por el MPTP. En estudios previos del laboratorio se demostró que tanto la adición de aceite de pescado como de melatonina reduce significativamente la actividad de peroxidasa de COX-2, que se induce por el MPTP (Gómez-Rodríguez 2006, Tesis de Maestría). Esto sugiere una utilidad terapéutica y farmacológica del aceite de pescado.

En relación con la fluidez de las membranas celulares, este parámetro mostró disminuciones inducidas por los diferentes tratamientos. Uno de los cambios que se encontró de manera consistente fue que la fluidez disminuye de manera importante después de 6 horas, por el MPTP tanto en el conjunto de las membranas celulares, como en las membranas mitocondriales. Posteriormente encontramos oscilaciones en la fluidez en las membranas analizadas. Desconocemos cuáles son los mecanismos que controlan estos cambios en la fluidez de las membranas.

En cambio la administración de aceite de pescado, solo indujo una disminución de la fluidez a las 6 horas de su administración. Posteriormente, en este grupo, la fluidez de las membranas celulares y mitocondriales tuvo valores semejantes a los del grupo testigo. Tampoco encontramos cambios consistentes en la fluidez de las membranas celulares y mitocondriales, en los grupos tratados con MPTP + aceite de pescado. Es posible que la administración de aceite de

pescado altere el metabolismo de forma tal, que sea difícil predecir y explicar su efecto en la fluidez de las membranas celulares.

Como resultado de nuestro trabajo, se ha comprobado por primera vez que la melatonina es capaz de inhibir la actividad de peroxidasa de COX-2 en el modelo del MPTP en ratones C57/BL6 y por lo tanto se sugiere su incorporación a la lista de anti-inflamatorios específicos de COX-2.

En la actualidad, la industria farmacéutica invierte una gran cantidad de recursos tanto económicos como humanos en la investigación y desarrollo de nuevos productos que inhiban la actividad de la COX-2, que como ya hemos mencionado se encuentra en la cúspide de la síntesis de las prostaglandinas, que son sustancias proinflamatorias que inician la activación de los procesos inflamatorios. Esto dio paso al desarrollo de inhibidores específicos de COX-2, los coxib's, que no presentan los daños colaterales que tienen los anti-inflamatorios no esteroideos tradicionales.

A principios de la década de los 90's se descubrió que la melatonina no sólo intervenía en los ritmos circadianos de la reproducción sino que también poseía actividad antioxidante y eliminaba radicales libres; posteriormente se propuso que la melatonina era posiblemente un potente anti-inflamatorio (Lissoni y col., 1997) y aunque se demostró esta capacidad en diversos modelos experimentales en ninguno de estos se mencionaba el hecho de que inhibía a la COX-2.

Nuestros resultados se suman a muchos otros reportes en donde se menciona que los efectos protectores de la melatonina se deben a su actividad antioxidante y al hecho de que elimina radicales libres en diversos modelos de estrés oxidativo, aunque recientemente ya se mencionaba el hecho de que la

actividad anti-inflamatoria de la melatonina podría deberse a la inhibición del NF κ B y de la óxido nítrico sintasa inducible (Rosales-Corral y col., 2003).

Para concluir, mencionemos que esta nueva faceta de la melatonina como anti-inflamatorio viene a dar nuevas esperanzas en el tratamiento de enfermedades degenerativas cuyas etiologías involucran la inflamación como un componente importante de las mismas; más aún cuando los inhibidores específicos de COX-2 existentes en el mercado se han correlacionado con un probable daño cardiovascular, por lo que en un futuro se tiene que dilucidar los mecanismos involucrados en la inhibición de la enzima, y de esta manera estaremos en una mejor posición para el tratamiento de una gran cantidad de enfermedades en donde la inflamación es el punto de partida de las mismas.

11. CONCLUSIONES

- El MPTP aumenta significativamente los niveles de lipoperóxidos y nitratos/nitritos en suero en relación con los testigos.
- La melatonina y el aceite de pescado disminuyen significativamente el aumento en los lipoperóxidos y nitratos/nitritos que induce el MPTP.
- El MPTP induce una disminución de la fluidez en el conjunto de las membranas celulares y mitocondriales en relación con los testigos
- Únicamente durante un período breve (6 horas) la melatonina revierte la disminución de la fluidez del conjunto de membranas celulares y mitocondriales que induce el MPTP.
- En todos los grupos el aceite de pescado mantiene los niveles lipoperóxidos y nitratos/nitritos en suero y la fluidez del conjunto de membranas celulares y mitocondriales, casi igual a los testigos.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Absi E, Ayala A, Machado A y 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.
2. Ackman RG (1992) Fatty acids in fish and shellfish. En Chow KC (Ed.) *Fatty acids in food and their health implications*. Marcel Dekker, USA. pp. 169-184.
3. Acuña-Castroviejo D, Escames G, Carozo A, Leon J, Khaldy H y Reiter RJ. (2002) Melatonin, mitochondrial homeostasis and mitochondrial-related diseases. *Curr. Top. Med. Chem.* 2, 133-152.
4. Alvira DR, Villalba MP (1998). *Radicales libres y especies activadas del oxígeno. úmica, biología e implicaciones en patología médica*. *An Med Interna (Madrid)*; 5: 146-51.
5. Andersen JK. (2004) Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat. Rev. Neurosci.* S18-S25.
6. Andreassen OA, Ferrante RJ, Dedeoglu A, Albers DW, Klivenyi P, Carlson EJ, Epstein CJ y Beal MF. (2001) Mice with a partial deficiency of manganese superoxide dismutase show increased vulnerability to the mitochondrial toxins malonate, 3-nitropropionic acid, and MPTP. *Exp. Neurol.* 167, 189-195.
7. Antolin I, Obstet B y Burkhardt S y Hardeland R. (1997) Antioxidative protection in a high-melatonin organism: The dinoflagellate *Gonyaulax polyedra* is rescued from lethal oxidative stress by strongly elevated, but

- physiologically possible concentrations of melatonin. *J. Pineal. Res.* 23, 182-190.
8. Barlow-Walden LR, Reiter RJ, Abe M, Pablos M, Menendez-Pelaez A, Chen LD y Poeggeler B. (1995) *Neurochem Int.* 5, 497-502.
 9. Beckman JS y Koppenol WH. (1996) Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am. J. Physiol.* 271, C1424-C1437.
 10. Blask DE, Sauer LA, Dauchy R, Holowachuk EW y Ruhoff MS. (1999) New actions of melatonin on tumor metabolism and growth. *Biol. Signals Recept.* 8, 49-55.
 11. Burke RE (1998) Programmed cell death and Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 13, 17-23.
 12. Chan P, DeLanney LE, Irwin I, Langston JW y Di Monte D. (1991) Rapid ATP loss caused by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mouse brain. *J. Neurochem.* 57, 348-351.
 13. Chow KC (1992) *Fatty acids in foods and their health implications.* Marcel Decker; USA. 1045 pp.
 14. Crespo E, Macias M, Pozo D, Escames G, Martin M, Vives F, Guerrero JM y 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.
 15. Davey GP y Clark JB. (1996) Threshold effects and control oxidative phosphorylation in nonsynaptic rat brain mitochondria. *J. Neurochem.* 66, 1617-1624.

16. Davis GC, Williams AC, Markey SP, Ebert MH, Caine ED, Reichert CM y Kopin IJ. (1979) Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry Res.* 1, 249-254.
17. Dexter DT, Carter CJ, Wells FR, Javoy-Agid F, Agid Y, Lees A, Jenner P y Marsden CD. (1989) Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 52, 381-389.
18. Dexter DT, Nanayakkara I, Goss-Sampson MA, Muller DP, Harding AE, Marsden CD y Jenner P. (1994) Nigral dopaminergic cell loss in vitamin E deficient rats. *Neuroreport.* 5, 1773-1776.
19. Donovan DM, Miner LL, Perry MP, Revay RS, Sharpe LG, Przedborski S, Kostic V, Philpot RM, Kirstein CL, Rothman RB, Schindler CW y Uhl GR. (1999) Cocaine reward and MPTP toxicity: alteration by regional variant dopamine transporter overexpression. *Mol. Brain Res.* 73, 37-49.
20. Dupont J (1999) Fats and Oils. En Sadler M (Ed.) *Encyclopedia of Human Nutrition.* Academic Press. USA. pp. 719-729.
21. Eisenbach M, Constantinov C, Aloni H, Shinitzky M. *Repellents for Escherichia coli operate neither by changing membrane fluidity nor by being sensed by periplasmic receptors during chemotaxis.* *J Bacteriol* 1990 Sep; 172 (9): 5218-24.
22. D L Nelson, M M Cox. *Lehninger Principles of Biochemistry* 3rd. Ed. Worth Publishers 2000, pp. 389, 391, Capitulo 5, Capitulo 8, Capitulo 1, Capitulo 14, Capitulo 19.
23. Fahn S y Przedborski S. (2000) in Merrit's Neurology, ed. Rowland, LP (Lippincott, Williams & Wilkins, New York), pp. 679-693.
24. Fahn S y Sulzer D. (2004) Neurodegeneration and neuroprotection in

- Parkinson's disease. *NeuroRx* 1, 139-154.
25. Forno LS, DeLanney LE, Irwin I y Langston JW. (1993) Similarities and differences between MPTP-induced parkinsonism and Parkinson's disease: neuropathologic considerations. *Adv. Neurol.* 60, 600-608.
 26. Floor E y Wetzel MG. (1998) Increased protein oxidation in human substantia nigra pars compacta in comparison with basal ganglia and prefrontal cortex measured with an improved dinitrophenylhydrazine assay. *J. Neurochem.* 70, 2682-2675.
 27. Galla HJ, Sackmann E. *Lateral diffusion in the hydrophobic region of membranes: use of pyrene excimers as optical probes.* *Biochim Biophys acta* 1974 Feb 26; 339(1): 103-15.
 28. Gitto E, Tan DX, Reiter RJ, Karbownik M, Manchester LC, Cuzzocrea S, Fulia F y Barberi I. (2001) Individual and synergistic actions of melatonin: Studies with vitamin E, vitamin C, glutathione and desferoxamine in liver homogenates. *Pharm. Pharmacol.* 53, 1393-1401.
 29. Good PF, Hsu A, Temer P, Perl DP y Olanow CW. (1998) Protein nitration in Parkinson's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 57, 338-339.
 30. Graham DG. (1978) Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones. *Mol. Pharmacol.* 14, 633-643.
 31. Hartmann A, Troadec JD, Hunot S, Kikly K, Faucheux BA, Mouatt-Prigent A, Ruberg M, Agid Y y Hirsch EC. (2001) Caspase-8 is an effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's

- disease, but pathway inhibition results in neuronal necrosis. *J. Neurosci.* 21, 2247-2255.
32. Harris ED. (1992) Regulation of antioxidant enzymes. *FASEB J.* 6, 2675-2683.
33. Hastings TG. (1995) Enzymatic oxidation of dopamine: The role of prostaglandin H synthase. *J. Neurochem.* 64, 919-924.
34. Higgins DS Jr y Greenamyre JT. (1996) [³H] dihydrorotenone binding to NADH:ubiquinone reductase (complex I) of the electron transport chain: an autoradiographic study. *J. Neurosci.* 16, 3807-3816.
35. Javitch JA, D'Amato RJ, Strittmatter SM y Snyder SH. (1985) Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: Uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridinium by dopamine neurons explain selective toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 2173-2177.
36. Jiménez-Jimenez FJ, Molina JA, Morano A. Etiología de la enfermedad de Parkinson: factores de riesgo y protectores. *Neurología* 1993; 8: 256-266).
37. (Koller WC, Minagar A. Treatment strategies for the management of Parkinson's disease. En *Parkinson's: Disease Management Guide*. PDR second edition. 2002; 101-131.
38. Kang D, Narabayashi H, Sata T y Takeshige K. (1983) Kinetics of superoxide formation by respiratory chain NADH-dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *J. Biochem. (Tokyo)* 94, 1301-1306.
39. Klaidman LK, Adams JD Jr, Leung AC, Kim SS y Cadenas E. (1993) Redox cycling of MPP⁺: evidence for a new mechanism involving hydride

- transfer with xanthine oxidase, aldehyde dehydrogenase, and lipoamide dehydrogenase. *Free Radic. Biol. Med.* 15, 169-179.
40. Klivenyi P, St Clair D, Wermer M, Yen HC, Oberley T, Yang L y Flint Beal M. (1998) Manganese superoxide dismutase overexpression attenuates MPTP toxicity. *Neurobiol. Dis.* 5, 253-258.
41. Kosel S, Egensperger R, von Eitzen U, Mehraein P y Graeber MB. (1997) On the question of apoptosis in the parkinsonian substantia nigra. *Acta Neuropathol. (Berl)* 93, 105-108.
42. Kris-Etherton PM, Shaffer TD, Yu-Poth S, Huth P, Moriarty K, Fishel V, Hargroe RL, Zhao G, Etherton TD (2000) Polyunsaturated fatty acids in the food chain in the United States. *Am. J. Clin. Nutr.* 71: 179S-88S.
43. Langston JW, Forno LS, Tetrud J, Reeves AG, Kaplan JA y Karluk D. (1999) Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. *Ann. Neurol.* 46, 598-605.
44. Lissoni P, Rovelli F, Meregalli S, Fumagalli L, Musco F, Brivio F, Brivio O y Esposti G. (1997) Melatonin as a new possible anti-inflammatory agent. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* 11, 157-159.
45. Liu Y, Roghani A y Edwards RH. (1992) Gene transfer of a reserpine-sensitive mechanism of resistance to N-methyl-4-phenylpyridinium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 9074-9078.
46. Livrea MA, Tesoriere L, D'Arpa D y Morreale M. (1997) Reaction of melatonin with lipoperoxyl radicals in phospholipid bilayers: *Free Radical Biol. Res.* 23, 706-711.

47. Lopez-Burillo S, Tan DX, Rodriguez-Gallego V, Manchester LC, Mayo JC, Sainz RM y Reiter RJ. (2003) Melatonin and its derivatives cyclic 3-hydroxymelatonin, *N*¹-acetyl-*N*²-formyl-5-methoxykynuramine and 6-hydroxymelatonin reduce oxidative damage induced by Fenton reagents. *J. Pineal Res.* 34, 178-184.
48. Lotharius J y Brundin P. (2002) Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and alpha-synuclein. *Nat. Rev. Neurosci.* 12, 932-942.
49. Luong C, Miller A, Barnett J, Chow J, Ramesha C y Browner MF. (1996) Flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase-2. *Nat. Struct. Biol.* 3, 927-933.
50. Maker HS, Weiss C, Slides DJ y Cohen G. (1981) Coupling of dopamine oxidation (monoamine oxidase activity) to glutathione oxidation via the generation of hydrogen peroxide in rat brain homogenates. *J. Neurochem.* 36, 589-593.
51. Martin M, Macias M, Escames G, Reiter RJ, Agapito MT, Ortiz GG y Acuña-Castroviejo D. (2000) Melatonin-induced increased activity of the respiratory Caín complex I and IV can prevent mitochondrial damage induced by ruthenium red *in vivo*. *J. Pineal Res.* 28, 242-248.
52. Martin M, Macias M, Leon J, Escames G, Khaldy H y Acuna-Castroviejo D. (2002) Melatonin increases the activity of oxidative phosphorylation enzymes and the production of ATP in rat brain and liver mitochondria. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34, 348–357.

53. Mayer RA, Kindt MV y Heikkila RE. (1986) Prevention of the nigrostriatal toxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine by inhibitors of 3,4-dihydroxyphenylethylamine transport. *J. Neurochem.* 47, 1073-1079.
54. McGeer PL y McGeer EG. (2001) Inflammation, autotoxicity and Alzheimer disease. *Neurobiol. Aging* 22, 799-809.
55. Mecocci P, MacGarvey U, Kaufman AE, Koontz D, Shoffner JM, Wallace DC y Beal MF. (1993) Oxidative damage to mitochondrial DNA shows marked age-dependent increases in human brain. *Ann. Neurol.* 34, 609-616.
56. Mejía Ricardo, M Carmen Gómez Eichelmann. *Escherichia coli Membrane fluidity as detected by excimerization of dipyranylpropane: sensitivity to the bacterial fatty acid profile.* *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1999 August 1; 368(1): 156-60.
57. Montilla Lopez P, Tunez I, Munoz de Agueda MC, Cabrera E, Montilla MC, Marttila RJ, Lorentz H y Rinne UK. (1988) Oxygen toxicity protecting enzymes in Parkinson's disease. Increase of superoxide dismutase-like activity in the substantia nigra and basak nucleus. *J. Neurol. Sci.* 86, 321-331.
58. Nichol CP, Davis JH, Weeks G, Bloom M. *Quantitative study of the fluidity of Escherichia coli membranes using deuterium magnetic resonance.* *Biochemistry* 1980 Feb 5; 19 (3): 451-7.
59. Okatani Y, Okamoto K, hayashi K, Wakatsuki A, Tumura S y Sagara Y. (1998) Maternal-fetal transfer of melatonin in pregnant women near term. *J. Pineal Res.* 25, 129-134.

60. Ortiz GG, Crespo-Lopez ME, Moran-Moguel C, Garcia JJ, Reiter RJ y Acuña-Castroviejo D. (2001) Protective role of melatonin against MPTP-induced mouse brain cell DNA fragmentation and apoptosis *in vivo*. *Neuroendoc. Lett.* 22, 101-108.
61. Otero-Siliceo E. (1996). Parkinson: Enfoque al futuro. Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Fondo de Cultura Económica. México.
62. Pablos MI, Guerrero JM, Ortiz GG, Agapito MT y Reiter RJ. (1997) Both melatonin and a putative receptor agonist CGP 52608 stimulate glutathione peroxidase and glutathione reductase activities in mouse brain *in vivo*. *Neuroendocrinol Lett.* 18: 49-58.
63. Pearce RK, Owen A, Daniel S, Jenner P y Marsden CD. Alterations in the distribution of glutathione in the substantia nigra in Parkinson's disease. *J. Neural Transm.* 104, 661-677.
64. Pieri C, Marra M, Moroni F, Recchioni R y Marsheselli F. (1994) Melatonin, a peroxy radical scavenger more efficient than vitamin E. *Life Sci.* 55, PL271-PL276.
65. Pierrefiche G y Laborit H. (1995) Oxygen radicals, melatonin and aging. *Exp. Gerontol.* 30, 213-227.
66. Poon AMS y Pang SF. (1992) 2[125I]iodomelatonin binding sites in spleens of guinea pigs. *Life Sci.* 50, 1719-1726.
67. Przedborski S, Jackson-Lewis V, Yokoyama R, Shibata T, Dawson VL y Dawson TM. (1996) Role of neuronal nitric oxide in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced dopaminergic neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 4565-4571.

68. Przedborski S y Jackson-Lewis V. (1998) Mechanisms of MPTP toxicity. *Mov. Disord.* 13 (Suppl. 1), 35-38.
69. Przedborski S. (2002) Dopaminergic system in Parkinson's disease. In *Dopamine Receptors and Transporters*. A. Sidhu et al., Eds:363-402. Marcel Dekker. New York.
70. Przedborski S, Kostic V, Giladi N y Eidelberg D. (2003a) in *Dopamine Receptors and Transporters*, eds. Sidhu A, Laruelle M y Vernier P. (Dekker, New York), pp. 363-402.
71. Rajput AH, Offord KP, Beard CM, Kurland LT. Epidemiology of parkinsonism: incidence, classification, and mortality. *Ann Neurol* 1984; 16: 278-282.
72. Ramsay RR y Singer TP. (1986) Energy-dependent uptake of N-methyl-4-phenylpyridinium, the neurotoxic metabolite of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, by mitochondria. *J. Biol. Chem.* 261, 7585-7587.
73. Ramsay RR, Kowal AT, Johnson MK, Salach JI y Singer TP. (1987) The inhibition site of MPP+, the neurotoxic bioactivation product of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine is near the Q-binding site of NADH dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* 259, 645-649.
74. Reiter RJ, Tan DX, Kim SJ y Qi W. (1998) Melatonin as a pharmacological agent against oxidative damage to lipids and DNA. *Proc. West Pharmacol. Soc.* 41, 229-236.
75. Reiter RJ, Tan DX, Osuna C y Gitto E. (2000) Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. *J. Biomed. Sci.* 7, 444-458.

76. Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolin I, Herrera F, Martin V y Reiter RJ. (2004) Regulation of antioxidant enzymes: A significant role for melatonin. *J Pineal Res.* 36, 1-9.
77. Rosales-Corral S, Tan DX, Reiter RJ, Valdivia-Velázquez M, Martínez-Barboza G, Acosta-Martínez JP y Ortiz GG. (2003) Orally administered melatonin reduces oxidative stress and proinflammatory cytokines induced by amyloid-b peptide in rat brain: a comparative, in vivo study versus vitamin C and E. *J. Pineal Res.* 35, 1-5.
78. Schulz JB, Matthews RT, Muqit MMK, Browne SE y Beal MF. (1995) Inhibition of neuronal nitric oxide synthase by 7-nitroindazole protects against MPTP-induced neurotoxicity in mice. *J. Neurochem.* 64, 936-939.
79. Simopoulos AP (1998) *The return of Omega -3 fatty acids in to the food supply.* Karger. Suiza. 240 pp.
80. Simopoulos AP (1999) Essential fatty acids in health and chronic disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 70: 560s-569s.
81. Simopoulos AP (2000) Symposium: Role of poultry products in enriching the human diet with Omega-3 Pufa. Human requirement for Omega -3 of polyunsaturated fatty acids. *Poultry Sci.* 79: 961-970.
82. Takahashi N, Miner LL, Sora I, Ujike H, Revay RS, Kostic V, Jackson-Lewis V, Przedborski S y Uhl GR. (1997) VMAT2 knockout mice: heterozygotes display reduced amphetamine-conditioned reward, enhanced amphetamine locomotion, and enhanced MPTP toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 9938-9943.

83. Tan DX, Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC y Reiter RJ. (1993) Melatonin: A potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocrine J.* 1, 57-60.
84. Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Plummer BF, Hardies LJ, Weintraub ST, Vijayalaxmi y Shepard AMM. (1998) A novel melatonin metabolite, cyclic 3-hydroxymelatonin: A biomarker of *in vivo* hydroxyl radical generation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253, 614-620.
85. Tan DX, Manchester LC, Reiter RJ, Qi W, Karbownik M y Calvo JR. (2000) Significance of melatonin in antioxidative defense system: Reactions and products. *Biol. Signals Recept.* 9, 137-159.
86. Tan DX, Manchester LC, Burkhardt S, Sainz RM, Mayo JC, Kohen R, Shohami E, Huo YS, Hardeland R y Reiter RJ. (2001) *N*₁-Acetyl-*N*₂-formyl-5-methoxykynuramine, a biogenic amine and melatonin metabolite, functions as a potent antioxidant. *FASEB J.* 15, 2294–2296.
87. Tan DX, Reiter RJ, Manchester LC, Yan MT, El-Sawi M, Sainz RM, Mayo JC, Kohen R, Allegra M y 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, 181-98.
88. Tanji K, Ohta Y, Kawato S, Misushima T, Natori S, Sekimizu K. *Decrease by psychotropic drugs and local anaesthetics of membrane fluidity measured by fluorescence anisotropy in Escherichia coli.* *J Pharm Pharmacol* 1992 Dec; 44 (12): 1036-7.
89. Tatton NA y Kish SJ. (1997) In situ detection of apoptotic nuclei in the substantia nigra compacta of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-

- tetrahydropyridine-treated mice using terminal deoxynucleotidyl transferase labelling and acridine orange staining. *Neuroscience* 77, 1037-1048.
90. Tetrad JW, Langston JW, Redmond DE Jr, Roth RH, Sladek JR y Angel RW. (1986) MPTP-induced tremor in human and non-human primates. *Neurology* 36, 308-308.
91. Vila M, Jackson-Lewis V, Vukosavic S, Djaldetti R, Liberatore G, Offen D, Korsmeyer SJ y Przedborski S. (2001) Bax ablation prevents dopaminergic neurodegeneration in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 2837-2842.
92. Zhang H, Squadrito GL y Pryor WA. (1998) The reaction of melatonin with peroxynitrite: Formation of melatonin radical cation and absence of stable nitrated products. *Biochem. Biophys. Res. Común.* 251, 83-87.
93. Zhang J, Perry G, Smith MA, Robertson D, Olson SJ, Graham DG y Montine TJ. (1999) Parkinson's disease is associated with oxidative damage to cytoplasmic DNA and RNA in substantia nigra neurons. *Am. J. Pathol.* 154, 1423-1429.