



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

EFFECTO DEL INCREMENTO EN  
LOS NIVELES ENDÓGENOS DE ÁCIDO  
KINURÉNICO EN UN MODELO DE  
DAÑO DOPAMINÉRGICO INDUCIDO  
POR LA 6-HIDROXIDOPAMINA  
(6-OHDA) EN RATAS

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

IRMA DANIELA SILVA ADAYA

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Abel Santamaría Del Angel  
COMITÉ TUTOR: Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte  
Dra. Milagros Méndez Ubach

MÉXICO, D.F.

AGOSTO, 2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 17 de mayo de 2010, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **SILVA ADAYA IRMA DANIELA** con número de cuenta 402054173 con la tesis titulada "EFECTO DEL INCREMENTO DE LOS NIVELES ENDÓGENOS DE ÁCIDO KINURÉNICO EN UN MODELO DE DAÑO DOPAMINÉRGICO INDUCIDO POR LA 6-HIDROXIDOPAMINA (6-OHDA) EN RATAS.", realizada bajo la dirección del : **DR. ABEL SANTAMARÍA DEL ÁNGEL**

Presidente: DRA. MARÍA EUGENIA GONSEBAT BONAPARTE  
Vocal: DRA. TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES  
Secretario: DR. ABEL SANTAMARÍA DEL ÁNGEL  
Suplente: DRA. LAURA COLÍN BARENQUE  
Suplente: DRA. MILAGROS MÉNDEZ UBACH

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 02 de julio de 2010

  
Dr. Juan Muñoz Farfán  
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a).

## **AGRADECIMIENTOS**

Primeramente quiero agradecer al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de continuar con mi formación académica.

Agradezco el apoyo de beca recibido por la Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), durante mis estudios de maestría, con el número de becario 220341.

También quiero agradecer a la Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte y a la Dra. Milagros Méndez Ubach por sus valiosos comentarios y observaciones en este proyecto

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

A Dios, por darme la fuerza y entendimiento, para realizar mis estudios.

A mis padres, por estar siempre conmigo, confiar en mí y quererme tanto. Yo también los amo.

A mis hermanos, mi eterno ejemplo a seguir.

Al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía por darme los medios para la realización de este proyecto.

Al Dr. Abel Santamaría Del Angel gracias por brindarme su amistad y conocimiento.

A mis amigos Verónica, Irma, Paul, Rafael, Luis, Berenice, Diana E, Diana P, Yolanda, Yarummi, y César, gracias por escucharme y permitirme aprender mucho de ustedes, así como convertir mis días difíciles en sonrisas.

## DEDICATORIAS

A Dios.

A mi tía Cuca, *in memoriam*.

A mis papás, Irma y Arnulfo.

A mis hermanos: Arnulfo, Juan Carlos, Gerardo y Mauricio

A mis sobrinos: Pau, José, Juan Emiliano, Fer, Juanito, Xime, Teté, Cocó, Dani y Reni.

A la Banda.

## **INDICE**

### **1. ABREVIATURAS**

### **2. RESUMEN / ABSTRACT**

### **3. INTRODUCCIÓN**

**3.1 Enfermedad de Parkinson**

**3.2 Modelos de la Enfermedad de Parkinson**

**3.3 Glutamato como componente excitotóxico**

**3.4 Receptor NMDA y Enfermedad de Parkinson**

**3.5 Vía de la Kinurenina**

**3.6 Ácido kinurénico**

### **4. HIPOTESIS**

### **5. OBJETIVOS**

**5.1 General**

**5.2 Específicos**

### **6. METODOLOGÍA**

**6.1 Sujetos de experimentación**

**6.2 Tratamiento con PROB y L-KYN, e inyección intraestriatal con 6-OHDA**

**6.3 Medición de la conducta de rotación**

**6.4 Perfusión y obtención de cerebro completo**

**6.5 Inclusión en parafina**

**6.6 Confirmación de lesión con 6-OHDA**

**6.7 Medición de dopamina y metabolitos**

**6.8 Tinción con Hematoxilina/ Eosina**

**6.9 Inmunohistoquímica contra GFAP**

**6.10 Tinción de laminillas y contraste de núcleos**

**6.11 Conteo de células reactivas**

**6.12 Tinción con fluoro jade  $\beta$**

**6.13 Análisis estadístico**

## **7. RESULTADOS**

**7.1 Confirmación con lesión con 6-OHDA**

**7.2 Conducta de rotación**

**7.3 Niveles de dopamina estriatal**

**7.4 Tinción hematoxilina/ eosina**

**7.5 Tinción Fluoro jade  $\beta$**

**7.6 Inmunohistoquímica contra GFAP**

## **8. DISCUSIÓN**

## **9. RESUMEN DE RESULTADOS**

## **10. CONCLUSIONES**

## **11. PERSPECTIVAS**

## **12. BIBLIOGRAFÍA**

## 1. ABREVIATURAS

<b><math>\alpha</math>7-nAchr</b>	Receptores nicotínicos $\alpha$ 7
<b>3-HA</b>	Ácido 3-hidroxiantranílico
<b>3-HK</b>	3-hidroxikinurenina
<b>6-OHDA</b>	6-Hidroxidopamina
<b>AMPA</b>	Ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
<b>DA</b>	Dopamina
<b>DA-2</b>	Receptor a dopamina tipo 2
<b>DOPAC</b>	Ácido 3,4-dihidroxifenilacético
<b>EP</b>	Enfermedad de Parkinson
<b>EROs</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>ERNs</b>	Especies reactivas de nitrógeno
<b>GFAP</b>	Proteína glial fibrilar acídica
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno
<b>HVA</b>	Ácido homovanílico
<b>i.e.</b>	Intraestriatal
<b>KYNA</b>	Ácido kinurénico
<b>L-KYN</b>	L-kinurenina
<b>MAO</b>	Monoamina oxidasa
<b>MPTP</b>	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
<b>NMDA</b>	N-metil-D-aspartato
<b>NMDAr</b>	Receptor a NMDA
<b>NAD</b>	Nicotina adenina dinucleótido
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NST</b>	Nucleo Subtálamico
<b>Mg<sup>+</sup></b>	Magnesio
<b>QUIN</b>	Ácido quinolínico
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Anión superóxido
<b>PBS</b>	Buffer de fosfatos
<b>PCP</b>	Fenciclidina
<b>PROB</b>	Probenecid
<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central
<b>SNpc</b>	Sustancia nigra pars compacta
<b>VK</b>	Vía de la kinurenina

## 2. RESUMEN

La vía de la kinurenina (VK) es una ruta del catabolismo del triptófano y sus alteraciones están vinculadas con diversos desórdenes neurodegenerativos. Uno de los metabolitos neuroactivos de esta vía, el ácido kinurénico (KYNA), actúa comúnmente como un bloqueador competitivo del sitio co-agonista para glicina en el receptor para N-metil-D-aspartato (NMDAr) (Kessler et al., 1989) y también disminuye los niveles extracelulares de glutamato al bloquear receptores nicotínicos  $\alpha 7$  ( $\alpha 7$ -nAChR) ubicados en terminales glutamatérgicas (Carpenedo et al., 2001), previniendo así los efectos excitotóxicos de neurotoxinas endógenas como el ácido quinolínico (QUIN) o el mismo glutamato (Foster et al., 1984), así como las convulsiones inducidas experimentalmente por pentilentetrazol (Vécsei et al., 1992). Por lo anterior, se asume que el KYNA es un modulador endógeno de eventos fisiológicos y patológicos asociados a la transmisión glutamatérgica exacerbada (Schwarcz, 2004). Por otro lado, se ha reportado que la administración sistémica a roedores de L-kinurenina (L-KYN) - el precursor inmediato del KYNA en la VK - conjuntamente con la administración de Probenecid (PROB) - un conocido inhibidor de transporte de ácidos orgánicos - aumenta los niveles de KYNA en el estriado y en la Sustancia nigra pars compacta (SNpc) de manera dosis-dependiente (Miller et al., 1992; Vecsei et al., 1992). Uno de los modelos experimentales más empleados para simular las alteraciones de la enfermedad de Parkinson (EP) es el de la infusión tópica de la toxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA) al cerebro de ratas. Diferentes estudios vinculan a las alteraciones en la EP con el exceso de transmisión glutamatérgica en el estriado (Greenamyre, 2001; Kelsey et al., 2004), sustentando esta estimación en evidencia que muestra que antagonistas para el NMDAr tienen efectos benéfico en modelos de la EP (Montastruc et al., 1997; Nash & Brotchie, 2002; Nash et al., 2004). En este trabajo se probaron los posibles efectos protectores de la administración sistémica de PROB+L-KYN en el modelo tóxico por inyección estriatal de 6-OHDA. Se usaron 48 ratas macho de la cepa Wistar. Se diseñaron 4 grupos experimentales: I) control (Sham), II) lesión intraestriatal (i.e.) por 6-OHDA en el día 2 de tratamiento, III) PROB (50 mg/kg, i.p.) + L-KYN (75 mg/kg, i.p.) del día 1 al 7, IV) PROB + L-KYN + 6-OHDA. Veintiún días después de la lesión se evaluó la conducta de rotación como un marcador de alteraciones motoras en los mismos animales. Veintiocho días después de la lesión con 6-OHDA se evaluó el daño neuronal en estriado por una tinción con hematoxilina/eosina y por una inmunohistoquímica contra la proteína glial fibrilar ácida (GFAP). La neurodegeneración fue evaluada por la técnica de tinción por verde de fluoro-jade. Para estas técnicas se usaron cortes de cerebro a nivel del núcleo caudado de la rata. También se midieron los niveles totales de dopamina en estriado como marcador neuroquímico de daño. Para todos los marcadores observamos efectos benéficos del tratamiento con PROB + L-KYN contra el daño dopaminérgico inducido por 6-OHDA. Nuestros resultados sugieren que el tratamiento sistémico de los animales con la combinación de PROB y L-KYN constituye una herramienta valiosa para inducir la modulación de receptores glutamatérgicos y colinérgicos estriatales a través del incremento en los niveles endógenos del KYNA, permitiendo así el estudio de los mecanismos celulares y moleculares involucrados en las alteraciones producidas por modelos de enfermedades neurodegenerativas, como el probado en este trabajo con 6-OHDA.

## ABSTRACT

Kynurenine pathway (KP) is one pathway of the catabolism of tryptophan and its alterations are linked to various neurodegenerative disorders. One of the neuroactive metabolites of this pathway, kynurenic acid (KYNA), acts as a competitive blocker at the co-agonist glycine site of the NMDA receptor and decreases the extracellular levels of glutamate by blocking  $\alpha 7$ -nACh nicotinic receptors located in glutamatergic terminals, thus preventing excitotoxic effects induced by endogenous neurotoxins such as quinolinic acid or glutamate itself. KYNA also reduces the seizures induced by pentylentetrazole in rodents. Therefore, it is assumed that KYNA is an endogenous modulator of physiological and pathological events associated with glutamatergic transmission. It has also been reported that systemic administration to rodents of L-kynurenine (L-KYN) - the immediate precursor of KYNA at KP -, together with probenecid (PROB) - a known inhibitor of organic acids transport - increases KYNA levels in the striatum and Substantia nigra pars compacta in a dose-dependent manner. One of the models used to simulate the changes in Parkinson's disease (PD) is the topical infusion of the toxin 6-hydroxydopamine (6-OHDA) to rodents. Different studies have linked the alterations in PD with excessive glutamatergic transmission in the striatum, and this concept has been supported by evidence showing that NMDA antagonists exert beneficial effects in PD models. In this work we tested the protective effects that a systemic administration of L-KYN + PROB exerted in the toxic model induced by striatal injection of 6-OHDA to rats. Forty eight male Wistar rats were used throughout the study. Four experimental groups were designed: I) Control (Sham), II) Intra-striatal lesion by 6-OHDA on day 2 of treatment, III) PROB (50 mg/kg, i.p.) + L-KYN (75 mg/kg, i.p.) from day 1 to 7 of treatment, IV) L-KYN + PROB + 6-OHDA. Twenty one days after 6-OHDA infusion, rotation behavior was assessed as a marker of motor impairment. Twenty eight days after 6-OHDA infusion, the striatal damage was assessed by hematoxylin/eosin staining and immunohistochemistry against glial fibrillary acidic protein (GFAP). Neurodegeneration was also assessed by fluoro jade staining. For these techniques, brain slices were obtained from the rat caudate nucleus. In addition, the total levels of dopamine were estimated in striatal tissue samples of 6-OHDA-treated animals by HPLC as a neurochemical marker of damage. For all markers evaluated, we observed beneficial effects induced by treatment of rats with L-KYN + PROB on the dopaminergic damage induced by 6-OHDA. Our results suggest that the systemic treatment of L-KYN plus PROB to animals is a valuable tool for the modulation of glutamatergic and cholinergic activities through the striatal increase in endogenous levels of KYNA, thus allowing the study of mechanisms involved in cellular and molecular alterations caused in toxic models of neurodegenerative disorders.

### **3. INTRODUCCION**

#### **3.1. Enfermedad de Parkinson**

La enfermedad de Parkinson (EP) la describió por primera vez en 1917 por James Parkinson. Es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común a nivel mundial, y afecta al 1 % de la población cercana a los 65 años (Lang & Lozano, 1998) y hasta un 5 % a los de 85 años o más (Shastry, 2001). La etiología de la EP aún es desconocida, pero la edad sigue siendo el principal factor de riesgo para desarrollarla. Se ha estimado que entre un 5 y 10 % de los casos con EP tienen una etiología familiar (Blum et al., 2001), mientras que en la mayoría de los casos tienen su etiología es muy variada, en los cuales los factores ambientales pueden contribuir a la patogénesis de la enfermedad (Olanow & Tatton, 1999). Se han relacionado a diferentes factores exógenos/endógenos con el desarrollo de la EP; entre ellos está el monóxido de carbono (Choi & Cheon, 1999), la presencia de  $\beta$ -carbonilos (Collins & Neafsey, 1985) o la rotenona, un plaguicida de uso común (Betarbet et al., 2000) así como algunos solventes (Drechsel & Patel, 2008).

Las manifestaciones clínicas más importantes en la EP son la postura inestable, la rigidez, el temblor en reposo, la bradiscinesia, y otros síntomas no motores como son alteraciones cognitivas, disturbios en el sueño, disfunción olfatoria y depresión, siendo éstas expresiones comunes y discapacitantes que resultan del daño en diferentes áreas del cerebro. La EP no es clínicamente evidente hasta que al menos entre el 50-70 % de las neuronas dopaminérgicas se hayan perdido. Los primeros signos clínicos solo se observan cuando la degeneración esta muy avanzado (Ziemssen & Reichmann, 2007).

Las características patológicas de la EP incluyen la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc que proyectan hacia el cuerpo estriado, y la presencia de inclusiones intracitoplásmicas, mejor conocidas como cuerpos de Lewy, las cuales son inclusiones pequeñas y esféricas que consisten de un centro denso y granular rodeado por un halo de filamentos radiales que están constituidos por  $\alpha$ -sinucleína y ubiquitina. Otra característica de EP es la pérdida considerable de dopamina (DA) y sus metabolitos,

el ácido homovanílico (HVA) y el 3,4-dihidroxifenilacetato (DOPAC), así como del transportador a dopamina en el estriado y en la SNpc (Beal, 2001).

La EP aún no es curable con los medicamentos actualmente disponibles como la L-Dopa, aunque agonistas de la DA han mostrado ejercer una mejora eficiente en los síntomas de disfunción motora durante la fase temprana de la enfermedad (Watts, 1997; Weiner, 1999; Singh et al., 2007). Mientras la enfermedad progresa, los síntomas de los pacientes responden menos a la L-Dopa, requiriendo mayores dosis de ésta, las cuales en el largo plazo están asociadas con otras complicaciones motoras (fluctuaciones motoras, discinecias, postura encorvada, congelamiento, pérdida de los reflejos de postura, etc.) y manifestaciones extramotoras (fatiga, depresión, desórdenes de sueño, disfunción autonómica, apatía y alteración de las funciones cognitivas) (Stocchi et al., 1996; Hurtig, 1997; Jankovic, 2005; Chaudhuri et al., 2006). De cualquier manera, estos tratamientos no evitan el deterioro fisiopatológico, dando como resultado la pérdida progresiva de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc. Por lo tanto, aún es necesario el desarrollo de nuevos fármacos capaces de prevenir y disminuir esta muerte neuronal dopaminérgica durante las fases de la enfermedad (Clarke, 2004).

### **3.2. Modelos de la Enfermedad de Parkinson**

Los modelos animales de la EP son una herramienta importante para estudiar los mecanismos patológicos y la implementación de estrategias terapéuticas. Existen en la actualidad diferentes modelos animales de la EP los cuales pueden ser químicos (reserpina, 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), 6-hidroxidopamina (6-OHDA), pesticidas, metanfetamina, etc.) y genéticos (sobrexpresión de  $\alpha$ -sinucleína y modelos transgénicos en general) (Betarbet et al., 2002).

Uno de los modelos animales más empleados en la actualidad para simular diferentes características de la EP consiste en la administración intraestriatal de 6-OHDA de manera unilateral a roedores. Este modelo es muy popular en las investigaciones biomédicas

debido a su alta reproducibilidad, bajo costo y baja complejidad, la infusión estriatal de 6-OHDA causa daño a las terminales de neuronas dopaminérgicas en el estriado, pérdida de dopamina y pérdida lenta y retrógrada de los cuerpos neuronales en la SNpc (Blandini et al., 2007). El mecanismo neurotóxico ejercido por la 6-OHDA está mayoritariamente asociado al estrés oxidativo, ya que esta toxina entra a la neurona dopaminérgica a través del transportador a dopamina, y una vez adentro se acumula en el citosol donde se oxida por la desaminación por la monoamino oxidasa (MAO) o por su autooxidación iniciada o amplificada por hierro vía la reacción de Fenton, aumentando así la tasa de formación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ERO/ERN), principalmente de peróxido de hidrógeno (Blum, 2001). Como mecanismo adicional y no excluyente, la 6-OHDA se acumula en la mitocondria, donde inhibe la actividad de la cadena de transporte de electrones mediante el bloqueo del complejo I mitocondrial (Fig. 1) (Schober, 2004).

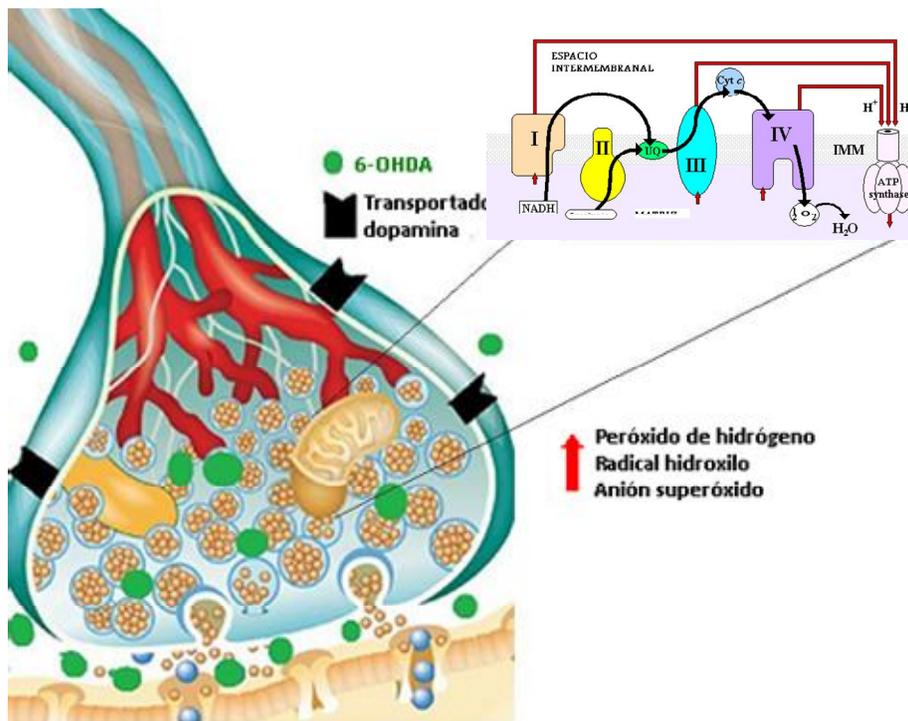


Fig. 1. Mecanismos tóxicos de 6-OHDA. La 6-OHDA entra a la neurona dopaminérgica mediante el transportador selectivo a catecolaminas (dopamina, noradrenalina y adrenalina), provocando muerte de estas neuronas debido a la autooxidación de la 6-OHDA y por inhibición del complejo I de la cadena de transporte de electrones mitocondrial; estos eventos en conjunto provocan la generación de ERO/ERN (principalmente peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo y anión superóxido).

### 3.3. Glutamato como componente excitotóxico

El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio en el SNC de mamíferos y modula la neurotransmisión a través de sinapsis excitatorias, actuando sobre los receptores ionotrópicos y metabotrópicos localizados en las terminales presinápticas y en la membrana postsináptica en el cerebro y la médula espinal. Existen tres subtipos distintos (por criterios farmacológicos y moleculares) de receptores glutamatérgicos, los cuales se nombraron de acuerdo a los agonistas que lo activan: N-metil-D-aspartato (NMDAr), ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA), y ácido kaínico (AKr) (Kalia et al., 2008). El NMDAr es complejo, y la estimulación de los dos sitios de unión que presenta - a glicina y glutamato - es requerida para abrir el canal iónico que permiten la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ . El glutamato ejerce su papel como neurotransmisor, y es liberado de manera dependiente de la actividad de la terminal sináptica, mientras que la glicina actúa como un modulador que está presente en el fluido extracelular a niveles constantes. El canal iónico del NMDAr está normalmente bloqueando de manera dependiente de voltaje por  $\text{Mg}^{2+}$ , y la despolarización remueve este bloqueo.

La biología molecular de la familia de NMDAr ha sido bien establecida: se sabe que está compuesto por una subunidad NR1 en combinación con una o más subunidades NR2 y una subunidad menos común NR3 (McBain & Mayer, 1994). Las subunidades NR2, las cuales son 4 (A-D), determinan la farmacología y otras propiedades del NMDAr (Kemp & McKernan, 2002). Existen claras diferencias en la expresión de las subunidades: mientras que la distribución de las subunidades NR1 y NR2A son ubicuas en el cerebro, la subunidad NR2B es específica para el cerebro anterior, NR2C para el cerebelo, y la expresión de NR2D es más rara que los otros subtipos. Las diferencias en el ensamblaje de las subunidades del receptor confieren la selectividad de este a diferentes compuestos (Williams, 1993).

El exceso crónico de glutamato es altamente tóxico para las neuronas, y a este acontecimiento se le llama excitotoxicidad; la muerte neuronal por excitotoxicidad es el

resultado de una sobre-estimulación de NMDAr y el subsecuente exceso de flujo de calcio al interior de la célula (Kemp & McKernan, 2002). Este exceso de calcio citoplásmico activa una serie de enzimas dependientes del ión que participan en el catabolismo de proteínas, fosfolípidos y ácidos nucleicos, así como en la síntesis de enzimas envueltas en la síntesis de óxido nítrico (NO), provocando una muerte debida al rompimiento de membrana, el déficit energético, el aumento en la formación de ERO/ERN y las alteraciones en el citoesqueleto (Koutsilieris & Riederer, 2007). A finales de los años 70's y entrados los 80's, el desarrollo de agonistas, antagonistas y moduladores de NMDAr que actúan en diferentes sitios de unión tuvo un importante auge. De manera interesante, el complejo receptor-canal para NMDA es rico en sitios moduladores.

#### **3.4. Receptor NMDA y Enfermedad de Parkinson**

La sobreactivación de NMDAr se ha asociado a al daño neuronal evocado en diferentes desórdenes neurodegenerativos, incluyendo la isquemia, la epilepsia, el trauma cerebral, la demencia y enfermedades neurodegenerativas como la EP y la enfermedad de Alzheimer (Gardoni & Di Luca, 2006). Por ello se ha sugerido que diferentes patologías en las cuales la muerte neuronal está asociada a la excitotoxicidad inducida por glutamato podrían ser tratadas bloqueando a los NMDAr. Incluso, dicho bloqueo podría ser aplicado en desórdenes neurodegenerativos en los cuales el exceso de glutamato no es precisamente el problema primario, pero en los que las neuronas afectadas se vuelven particularmente sensibles al daño excitotóxico producido por niveles normales de glutamato por alteraciones en el metabolismo energético y posterior sensibilización de NMDAr sensibles a voltaje (Kemp & McKernan, 2002).

Bajo condiciones fisiológicas existe un balance de neurotransmisores en el estriado, entre la activación de neuronas por NMDAr y la inhibición por receptores dopaminérgicos tipo D2. En contraste, en la EP la disminución de dopamina resulta en una desinhibición de las neuronas estriatales y una relativa sobreactivación glutamatérgica. Aun así, el

déficit dopaminérgico resulta en un aumento de actividad del núcleo subtalámico (NST), el cual proyecta glutamatergicamente al globo pálido externo de los ganglios basales, haciéndolos más activos; estas desregulaciones son conocidas como síndrome secundario de sobreactivación glutamatergica (Koutsilieri & Riederer, 2007). A este respecto, se ha vinculado a las alteraciones de la EP con el exceso de transmisión glutamatergica en el estriado (Greenamyre, 2001; Kelsey et al., 2004), por lo que esta transmisión aumentada podría estar contribuyendo a los síntomas de la enfermedad (Carlsson & Carlsson, 1990; Blandini et al., 2000). Por ello, antagonistas glutamatergicos, particularmente antagonistas a NMDAr en diferentes sitios de regulación de la activación del receptor o diferentes subunidades del mismo receptor (Fig. 2) han mostrado potenciar el tratamiento con levodopa y agonistas al receptor a dopamina en modelos de la EP, reforzando la idea de que estos componentes pueden tener efectos benéficos para el tratamiento de la enfermedad (Klockgether & Turski, 1990).

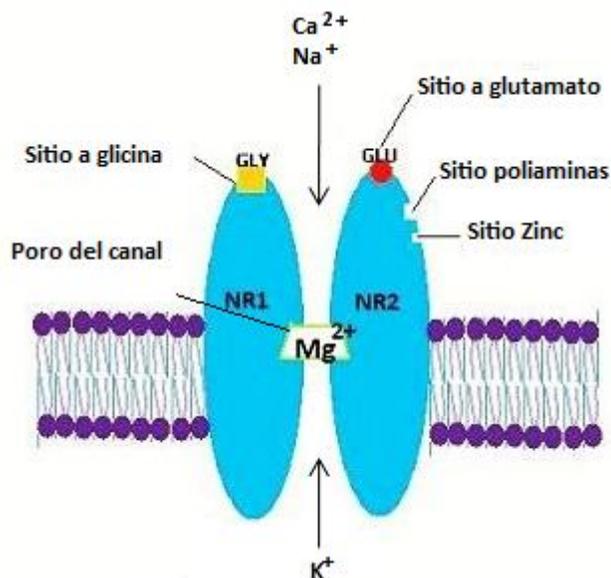


Fig. 2 Sitios de regulación de NMDAr. Sitios extracelulares en la subunidad NR1 incluyen al sitio de unión a glicina, el sitio de unión a glutamato en la subunidad NR2 y el sitio de unión dentro del poro del canal que se superpone al sitio de unión al magnesio (Mg<sup>2+</sup>). Dentro de la subunidad NR2 también se encuentran sitios de acción para poliaminas y zinc.

Existen diferentes estudios que prueban la eficacia de antagonistas no competitivos a NMDAr (dizocilpina (MK-801), fenciclidina (PCP), etc.) en modelos de EP, atenuando las respuestas parkinsonianas y aumentando la terapia dopaminérgica. Estos agentes tienen una eficacia terapéutica limitada, y aunque inducen efectos no deseados como sedación, ataxia y psicosis, resultado de un antagonismo no específico, no dejan de representar terapias experimentales potenciales para la descripción de mecanismos (Lange et al, 1997).

La administración central de algunos antagonistas al sitio para glicina (ácido 7-cloro kinurénico) y antagonistas parciales (HA-966) han mostrado ejercer efectos benéficos en varios modelos de la EP (Kretschmer et al., 1994; Carroll et al., 1995; Parsons et al., 1997). Por lo tanto, antagonistas al sitio a glicina han reportado ser un blanco atractivo para el desarrollo de nuevos fármacos dado el bajo perfil de sus efectos secundarios, ya que no producen efectos psicomiméticos (Koek & Colpaert, 1990; Danysz et al., 1995; Bristow et al., 1996; Kretschmer et al., 1997), y no deterioran el aprendizaje a dosis anticonvulsivantes (Chiamulera et al., 1990; Murata & Kawasaki, 1993). Por su parte, actualmente la amantadina, un conocido bloqueador no competitivo de canal asociado al NMDAr, es usada para el tratamiento de la EP en varios países, así como para disminuir las discinecias causadas por la L-Dopa (Del Dotto et al., 2001). De igual manera, el dextrometorfano, un conocido antitusivo, reduce las discinecias en pacientes con EP, aunque estos pacientes muestran cansancio (Shin et al., 2008).

### **3.5. Vía de la Kinurenina**

El aminoácido esencial triptófano se cataboliza en un 5-10 % hacia la síntesis de otras proteínas como la melatonina y el neurotransmisor serotonina. El resto del triptófano (90-95%) es metabolizado por la vía de la kinurenina (VK) (Fig. 3), que tiene como uno de sus metabolitos finales a la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) (Stone, 1993), molécula necesaria para el metabolismo redox basal del Sistema Nervioso Central (SNC). La maquinaria enzimática del catabolismo del triptófano existe tanto en el cerebro como en la

periferia, teniendo mayor actividad en la segunda. Dentro del SNC), la maquinaria enzimática de la VK está principalmente localizada en las células gliales (Kita et al., 2002).

Un componente central de la VK es la L-KYN, que puede ser metabolizada en dos vías separadas a KYNA, o a 3-hidroxikinurenina (3-HK) y ácido quinolínico (QUIN), ambos precursores del NAD. Algunos intermediarios metabólicos de esta vía tienen efectos moduladores sobre especies animales a nivel de SNC; por ej., el QUIN produce un patrón neurotóxico asociado a la sobreactivación de NMDAr (Schwarcz et al., 1983), mientras que otro metabolito, la 3-HK, precursor del QUIN, presenta propiedades neurotóxicas a través de la formación de radicales libres (Eastman & Guilarte, 1989). Por otra parte, tanto la 3-HK como su producto de degradación directo, el ácido 3-hidroxiantranílico (3-HA) generan  $O^{2-}$  y  $H_2O_2$  de una manera dependiente de cobre (Goldstein et al., 2000).

En contraste, el KYNA ha sido descrito como un componente inhibidor de actividad de NMDAr, ejerciendo por este proceso acciones anticonvulsivantes y antiexcitotóxicas en diferentes paradigmas experimentales (Foster et al., 1984). Las propiedades proconvulsivantes y excitotóxicas del QUIN y de la 3-HK, así como las actividades anticunvulsivantes del KYNA en diferentes modelos experimentales han generado recientemente un gran interés en estudiar la VK, sugiriendo que las kinureninas endógenas pueden estar involucradas en diferentes desórdenes del SNC, incluyendo la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Alzheimer, la EP y el complejo SIDA-demencia, entre otras (Schwarcz et al., 1984; Stone & Darlington, 2002; Stone, 2001).

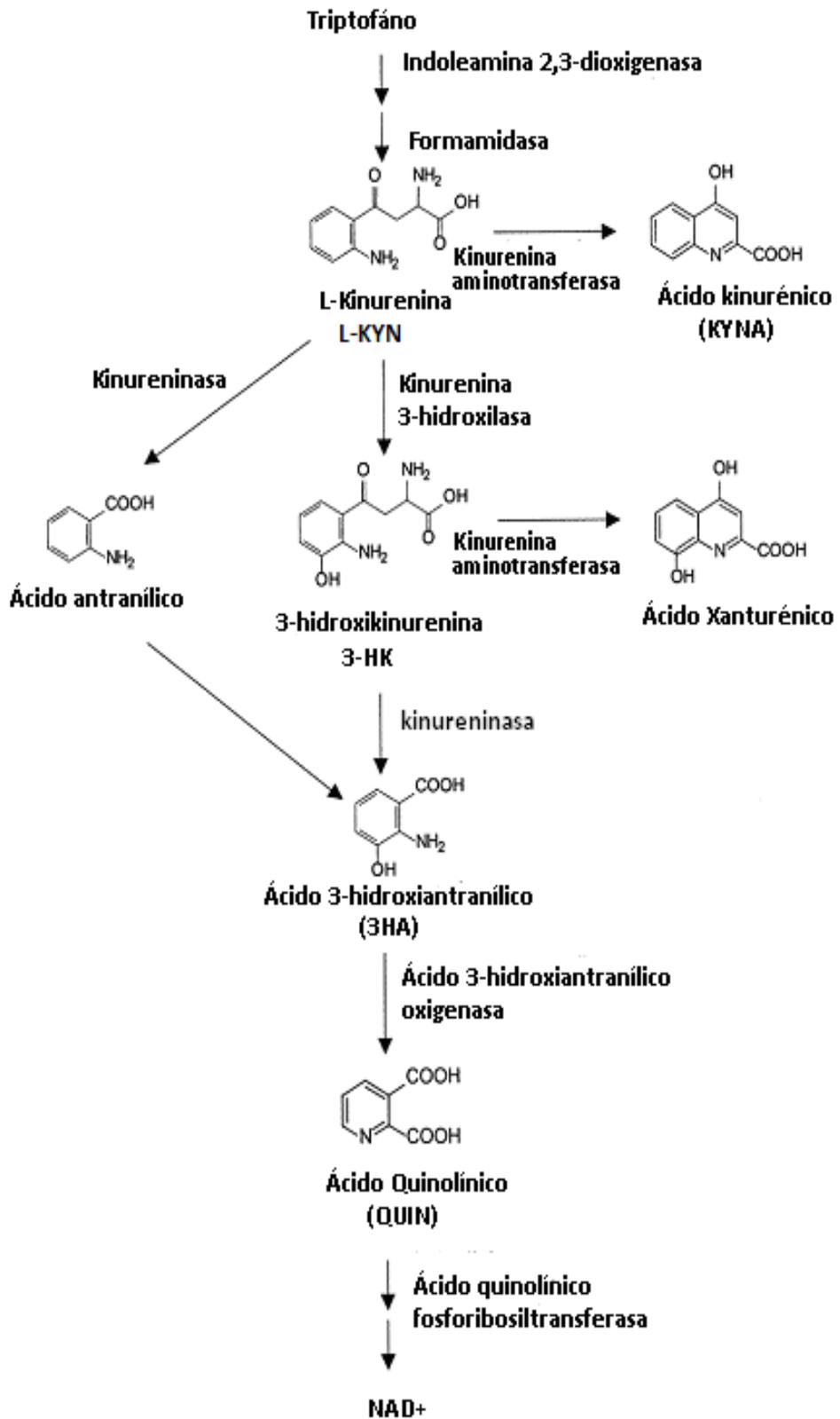


Fig. 3 Vía metabólica de la kinurenina para la degradación del triptofano.

### 3.6. Ácido kinurénico

El KYNA se forma a partir de la L-KYN por una transaminación irreversible catalizada por tres subtipos de kinurenina aminotransferasas (KATs) (Okuno et al., 1991; Yu et al., 2006) y por aspartato-aminotransferasas mitocondriales (mitAAT). La KAT-II ha demostrado ser el principal productor de KYNA en cerebro de ratas y humanos, mientras que en el cerebro de ratón la mitAAT tiene una actividad principal y la KAT-II la menor (Guidetti et al., 2007). Las concentraciones fisiológicas del KYNA son de 0.2–1.5  $\mu\text{M}$ , y tiene alta afinidad al sitio para glicina del NMDAr, bloqueando su actividad a concentraciones micromolares ( $\text{IC}_{50} \approx 7.9\text{--}15 \mu\text{M}$ ), y también bloqueando al sitio para glutamato de NMDAr a concentraciones de 100 a 200 veces mayores que aquellas a las que bloquea al sitio para glicina (Kessler et al., 1989). El KYNA muestra un efecto antagónico débil sobre los receptores AMPA y kainato (Birch et al., 1988), y actúa de manera no competitiva sobre los receptores  $\alpha 7$ -nicotínicos de acetilcolina ( $\alpha 7\text{-nACh}$ ,  $\text{IC}_{50} \approx 7 \mu\text{M}$ ) (Fukui et al., 1991; Hilmas et al., 2001). Se ha sugerido que el KYNA tiene una función fisiológica sobre la transmisión glutamatérgica ya que la administración local de este agente (30-100 nM) en el núcleo caudado de la rata reduce la liberación de glutamato y esto no es mediado por glutamato, sino por receptores a acetilcolina (Carpenedo et al., 2001). De hecho, el KYNA puede tener afinidad por NMDAr y receptores  $\alpha$ -7 nicotínicos en un mismo rango de concentraciones en el cerebro de humanos y roedores, sugiriendo así un papel relevante en la modulación fisiológica y de la transmisión glutamatérgica y colinérgica.

Adicionalmente, se ha probado que el KYNA es un buen atrapador del radical hidroxilo, propiedad que se suma al amplio espectro de propiedades neuroprotectoras de este metabolito (Goda et al., 1996), lo cual sugiere que esta estrategia posee un amplio espectro de acción en diferentes modelos.

El KYNA además aumenta la recaptura de glucosa, indicando que éste afecta el metabolismo aerobio, y sugiriendo que no se trata únicamente de un agente

neuromodulador y neuroprotector, sino también de un agente que compromete la bioenergética mitocondrial (Pérez-De La Cruz et al., 2007).

Algunos estudios reportan que la disminución de los niveles de KYNA en el estriado de animales aumenta la vulnerabilidad a daño excitotóxico (Poeggeler et al., 1998). Adicionalmente se sabe que alteraciones de la VK están presentes en la EP, mostrando aumento en los niveles de 3-HK en el putamen y la SNpc, y con una marcada tendencia a sintetizar más 3-HK que KYNA a partir de L-KYN, proceso que en su caso puede ser responsable de la alta susceptibilidad de las neuronas a un daño oxidativo en esta patología (Ogawa et al., 1992; Pérez-De La Cruz et al., 2007). Por otro lado, se han observado alteraciones en la enzima responsable de la síntesis de KYNA en sus dos isoformas, la KAT-I y la KAT-II, generándose una disminución en la actividad de ambas enzimas en el plasma de pacientes con EP, seguida de una disminución de los niveles de KYNA en plasma y un aumento en los niveles de KYNA en los eritrocitos, relacionado esto último sobre todo con el aumento de la actividad de KAT-II como una posible respuesta de adaptación protectora contra los efectos excitotóxicos (Hartai et al., 2005).

El KYNA tiene habilidad limitada para cruzar la barrera hematoencefálica desde la periferia (Fukui et al., 1991); sin embargo, se ha reportado que la administración sistémica de L-KYN, su precursor inmediato, conjuntamente con la administración de probenecid (PROB), un inhibidor del transporte de ácidos orgánicos del líquido cefaloraquídeo, aumenta los niveles de KYNA en el cerebro de ratones (Vecsei et al., 1992), así como en el estriado y en la SNpc de ratas de manera dosis-dependiente (Miller et al., 1992). Esta estrategia farmacológica también protege del daño producido en la vía nigroestriatal y en el estriado por el QUIN en ratas (Miranda et al, 1999; Santamaría et al, 1996). Notablemente, también se ha reportado que esta doble estrategia protege contra las convulsiones causadas por el agente proconvulsivante pentilentetrazol (Vecsei et al, 1992).

Por otra parte, mediante análisis densitométricos se ha demostrado que tras la administración de 6-OHDA a ratas no sólo hay disminución en la inmunoreactividad contra tirosina hidroxilasa (TH), la enzima limitante en la síntesis de DA, sino que también hay disminución en la inmunoreactividad contra la KAT-I en las neuronas remanentes de la SNPc. En contraste, se observa una aumentada inmunoreactividad contra KAT-I en astrocitos y microglia, evidenciando así una posible estrategia de adaptación tras la disminución del contenido de KYNA por el efecto deteriorante de la administración de 6-OHDA (Csillik et al., 2006). Más aún, existe evidencia sobre de la disminución de la actividad de la KAT-II en cortes de cerebro de ratas tratadas con la toxina mitocondrial 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) - usada comúnmente como modelo de EP en ratones - mostrando también una disminución de KYNA (Luchowski et al., 2002).

En conjunto, los datos anteriores nos sugieren que las alteraciones en el sistema dopaminérgico evocadas por 6-OHDA y otros modelos de la EP están reclutando cambios mayores en la VK, por lo que nuestro planteamiento de inducir una estrategia farmacológica tendiente a aumentar los niveles centrales de KYNA toma mayor fuerza a la luz de que este reto farmacológico podría abatir el componente glutamatérgico del modelo tóxico de la 6-OHDA y conducir así a neuroprotección en este modelo tóxico.

#### **4. HIPOTESIS**

Dado que los niveles endógenos de KYNA no son suficientes para proteger el efecto neurotóxico de la 6-OHDA, entonces el aumento en los niveles endógenos de KYNA por la aplicación sistémica de PROB + L-KYNA disminuirá el daño al sistema dopaminérgico inducido por 6-OHDA en ratas.

#### **5. OBJETIVOS**

##### **5.1. General**

- Evaluar el efecto de niveles incrementados farmacológicamente de KYNA sobre la neurotoxicidad inducida por 6-OHDA en ratas.

##### **5.2. Específicos**

- Cuantificar la conducta de rotación inducida por apomorfina como un marcador de alteraciones motoras en el modelo tóxico y en presencia de los tratamientos.
- Identificar histológicamente las alteraciones morfológicas producidas en este modelo y los efectos del tratamiento con L-KYN + PROB.
- Identificar por inmunohistoquímica la presencia de gliosis reactiva (GFAP) y mediante una tinción con fluoro jade  $\beta$ , como marcador de neurodegeneración.
- Medir los niveles de dopamina en el modelo de 6-OHDA en condiciones de estimulación de la síntesis de KYNA en el estriado.

## **6. METODOLOGÍA**

### **6.1. Sujetos de experimentación**

Para realizar esta investigación, se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar (280-320 g) del bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Los animales se mantuvieron en condiciones ambientales estándar (temperatura constante de 25°C, con ciclos de luz:oscuridad de 12 horas, y con libre acceso a comida y agua). Todos los procedimientos con animales se realizaron de acuerdo a la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio y a la Guía de Uso Ético de Animales de la Secretaría de Salud, México. Durante los experimentos se hizo el mayor esfuerzo para minimizar el sufrimiento de los animales.

### **6.2. Tratamiento con PROB y L-KYN e inyección intraestriatal con 6-OHDA**

Se diseñaron 4 grupos experimentales de seis animales cada uno:

- 1) Solución salina isotónica (S.S.I.) intraperitoneal (i.p.) + vehículo intraestriatal (i.e)
- 2) PROB y L-KYN i.p. +vehículo i.e.
- 3) S.S.I. i.p. + 6-OHDA i.e.
- 4) PROB y L-KYN i.p. + 6-OHDA i.e.

Las soluciones de PROB y L-KYN, o la SSI, fueron administradas 2 días antes y durante 5 días después de la inyección i.e. de la toxina. La concentración de la solución de PROB fue de 50 mg/kg, y la solución de L-KYN fue de 75 mg/kg por peso de animal; ambos compuestos disueltos en hidróxido de sodio 1 N ajustado a un pH de 10.

Al día 2 de la administración de fármacos, las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (50 mg/Kg de peso del animal), y posteriormente inyectadas unilateral y estereotáxicamente en el estriado derecho con ácido ascórbico 0.2 % ó 3 µL de 6-OHDA (6.6 µg/µL) disuelto en ácido ascórbico 0.2 %. Las coordenadas fueron establecidas de acuerdo al Atlas estereotáxico de Paxinos y Watson, y fueron: antero-posterior +0.5 mm, lateral -3.5 mm, y ventral -4.8 mm; todas medidas con respecto a bregma (Paxinos & Watson, 1998).

### **6.3. Medición de la conducta de rotación**

Veintidós días después de la lesión estriatal se administró apomorfina (APO) a todos los animales en una dosis de 1.0 mg/Kg de peso vía subcutánea (s.c.); cada animal se mantuvo de forma individual en una caja de acrílico para su observación. Cinco minutos después de la administración de APO se registró el número total de giros contralaterales (en sentido contrario del hemisferio lesionado, lado izquierdo) de cada animal durante 45 min. Cada rotación se define como un giro completo de 360° sobre sus patas traseras. Esta evaluación de conducta motora provee información sobre el desbalance neuroquímico y de muerte neuronal entre el lado lesionado con la toxina y el lado intacto, y es típicamente inducida por un agonista a receptores dopaminérgicos (Santamaría et al., 1996).

### **6.4. Perfusión y obtención de cerebro completo**

Veintiocho días después de la lesión intraestriatal con ácido ascórbico o 6-OHDA, las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico para posteriormente ser perfundidas vía intracardiaca, primero con S.S.I. y después con una solución de paraformaldehído (4 %). Posteriormente, se extrajeron los cerebros completos de cada animal, los cuales se conservaron en una solución de paraformaldehído (4 % en PBS, pH 7.4) para su posterior tratamiento.

### **6.5. Inclusión en parafina**

A continuación se detalla el método de inclusión:

- 1.- Sacar cerebros de paraformaldehído, colocarlos uno por uno dentro de las cajas de lavado e identificarlos.
- 2.- Colocar los cerebros bajo el flujo de agua corriente por 15 min.
- 3.- Colocar las cajas de lavado con los cerebros durante una hora en agitación constante en cada uno de los reactivos en el siguiente orden:
  - Alcohol 70 %
  - Alcohol 80 %

- Alcohol 96 %
- Alcohol 96 %
- Alcohol absoluto
- Alcohol absoluto
- Alcohol-xilol (1:1)
- Alcohol-xilol (1:1)
- Xilol absoluto
- Xilol absoluto
- Parafina
- Parafina

4.- Al realizar el último lavado, se procede a incluir los cerebros en parafina, sacando los cerebros de la caja de lavado y colocándolos en moldes de plástico flexible, cubriéndolos completamente con parafina.

5.- Dos días después de haberse colocado en parafina, los cerebros son cortados en secciones de 7 µm para cada cerebro en el micrótopo rotatorio 820 HistoSTAT. Los cortes se colocan entonces en portaobjetos para su posterior uso en las pruebas inmunohistoquímicas correspondientes.

#### **6.6. Confirmación de lesión con 6-OHDA**

Se realizó mediante una inmunohistoquímica contra la TH

Para la prueba inmunohistoquímica contra TH (Chemicon International, Inc., CA, USA, 1:1000) se usaron cortes de 30µm a nivel del cuerpo estriado.

El procedimiento fue el siguiente:

- 1.-Colocar laminillas en xilol durante 10 min , para desparafinar
- 2.-Rehidratar los cortes en diferentes grados de alcoholes.
- 3.-Sumergir los cortes en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y en metanol al 10% durante 30 min.
- 4.-Enjuagar tres veces con PBS (pH 7.4).

5.-. Incubar con anticuerpo primario a TH 1:750 diluido en PBS+ 10 % Suero Normal de cabra + 10% Tritón durante una noche en refrigeración.

6.-Enjuagar con 3 lavados de PBS.

7.- Se incuba a temperatura ambiente durante 2 horas con el anticuerpo secundario (1:200) + 5% de suero normal de cabra.

8.- Enjuagar 3 veces con PBS.

9.- Se incuba con avidina-biotina por 2 horas a temperatura ambiente

11.- Enjuagar con PBS.

12.- Secar y agregar DAB (diaminobencidina, Kit hasta observar el viraje de color rojo a café claro.

13.- Lavar por último con PBS

#### **6.7. Medición de dopamina y metabolitos**

El contenido en tejido estriatal de DA y metabolitos (HVA y DOPAC) fue analizado por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) con detección electroquímica (García et al., 2008). Brevemente, el tejido fue obtenido por disección e inmediatamente fue sonificado en 500  $\mu$ L de ácido perclórico y metabisulfito de sodio 0.1% (p/v), seguido por una centrifugación 4,000 x g durante 10 min a 4°C. Los sobrenadantes fueron congelados a -70°C hasta que se usan para su análisis cromatográfico. Para este análisis se uso un cromatógrafo Perkin-Elmer LC-4C con un detector electroquímico BAS CC-5. Los picos fueron integrados por el programa Turbochrom Navigator 4.1 Data Station de Perkin-Elmer. Las curvas de calibración fueron realizadas inyectando 20  $\mu$ L de diferentes concentraciones conocidas de estándares (preparadas en una solución de ácido perclórico-metabisulfito). Las concentraciones de DA, HVA y DOPAC se obtuvieron interpolando los datos con su respectiva curva estándar. Se uso una columna (1004.6 mm) Alltech Adsorbosphere para catecolaminas con un tamaño de partícula de 3 mm. La fase móvil consiste en una solución acuosa de buffer de fosfatos (0.1 M, pH 3.1) que contiene octil sulfato de sodio 0.9 mM, EDTA 0.1mM, y 15 % (v/v) de metanol:agua. La

velocidad de flujo fue de 1.4 mL/min. El potencial fue fijado a 0.8 V contra un electrodo de referencia de Ag/AgCl.

### **6.8. Tinción con hematoxilina/ eosina**

A continuación se describe el método de tinción por hematoxilina eosina.

- 1.- Las laminillas se colocan durante 30 min en Xilol, para su desparafinación.
- 2.- Colocar las laminillas en los diferentes reactivos a continuación mencionados durante 3 min en el siguiente orden:

- Xilol
- Xilol:alcohol absoluto (1:1)
- Alcohol absoluto
- Alcohol absoluto
- Alcohol 96%
- Alcohol 96%
- Enjuagar en agua corriente
- Hematoxilina de Gill
- Enjuagar en carbonato de litio
- Eosina
- Enjuagar en alcohol 96%
- Alcohol 96%
- Alcohol absoluto
- Alcohol absoluto
- Alcohol absoluto:xilol (1:1)
- Xilol
- Xilol

- 3.- Se cubrieron los cortes con resina y con un cubreobjetos. Al terminar, los cortes fueron observados al microscopio de luz (Leica DMLS Galen III) con una cámara digital a color (SSC-DC14) acoplada.

Los cortes fueron teñidos con hematoxilina-eosina con la finalidad de visualizar los cuerpos celulares (Rodríguez et al., 1999), y este estudio será interpretado como marcador de lesión/preservación morfológica.

### **6.9. Inmunohistoquímica contra GFAP**

Para la prueba inmunohistoquímica contra GFAP (Kit de DAKO, Dakocytomation, Carpintería, CA), a continuación se describe el método secuencial:

- 1.-Colocar laminillas en xilol durante 30 min.
- 2.-Enjuagarlas con agua corriente.
- 3.-Colocar las laminillas en una solución de citrato de sodio 10 mM y tritón al 10 %, en baño María y dejarlo hervir durante 30 min. Posteriormente, enfriar en agua fría por 10 min.
- 4.-Enjuagar con PBS (pH 7.4).
- 5.-Colocar las laminillas en una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 15 min.
- 6.-Enjuagar con PBS.
- 7.- Secar laminillas alrededor del corte, colocar sobre el corte albúmina (2 %).
- 8.- Enjuagar con PBS.
- 9.- Incubar con anticuerpo primario (anticuerpo monoclonal que reconoce a GFAP, DAKO, dilución 1:100 con PBS) durante una noche en refrigeración.
- 10.- Enjuagar con PBS.
- 11.- Incubar con el anticuerpo secundario (anticuerpo de conejo conjugado con peroxidasa de rábano rojo, Kit Dako).
- 12.-Enjuagar con PBS.
- 13.-Secar y agregar DAB (diaminobencidina, Kit DAKO), esperar un minuto hasta observar el viraje de color rojo a café claro.

La GFAP es una serie de filamentos intermedios cuya rápida síntesis e inmunexpresión son el resultado de una respuesta a una lesión o trauma, enfermedad,

insulto químico o un desorden genético (Eng et al., 2000), como sucede tras la administración estriatal de 6-OHDA (Sheng et al., 2003).

#### **6.10. Tinción de laminillas y contraste de núcleos**

Después del tratamiento con los anticuerpos se procede a:

- 1.- Lavar laminillas con agua corriente durante 5 min.
- 2.- Sumergir las laminillas durante 50 seg en Hematoxilina de Gill.
- 3.- Enjuagar con agua corriente 2 veces.
- 4.- Colocar laminillas en los siguientes reactivos:
  - Alcohol de 96 %, 2 enjuagues.
  - Alcohol de 96 %, por 3 min.
  - Alcohol de absoluto por 3 min.
  - Alcohol absoluto por 3 min.
  - Xilol absoluto por 3 min.
  - Xilol absoluto por 3 min
- 5.- Secar laminillas y colocar la resina; colocar cubreobjetos. Al terminar, los cortes fueron observados al microscopio de luz (Leica DMLS Galen III) con una cámara digital a color (SSC-DC14) acoplada.

#### **6.11. Conteo de células reactivas**

En los cortes histológicos con Hematoxilina & Eosina, se contó el número de núcleos, ya sea preservadas o dañadas, el cual fue obtenido como un promedio de 10 campos seleccionados al azar en 40x de tres secciones por cerebro de rata (n=3) en estriado. El criterio seguido para el conteo de neuronas dañadas incluyó núcleos picnóticos, vacuolización citoplásmica y atrofia neuronal. La tasa de daño neuronal por campo fue calculada considerando el número de células dañadas entre el número de células totales por 100.

Para el conteo de células inmunoreactivas para GFAP se consideraron diez campos de tres secciones por cerebro de cada rata en un aumento 40x (n=3).

#### **6.12. Tinción con fluoro jade $\beta$**

Para la técnica de fluoro jade, las laminillas fueron tratadas por el método a continuación descrito:

- 1.- Los cortes son desparafinados con xileno durante 15 min y enjuagados con 2 lavados de alcohol.
- 2.- Las laminillas fueron inmersas en una solución 1 % de hidróxido de sodio y 80 % de alcohol.
- 3.- Colocar las laminillas 2 min en alcohol del 70 %
- 4.- Colocar las laminillas 2 min en agua destilada
- 5.- Transferir laminillas en una solución al 0.06% de permanganato de potasio por 10 min
- 6.- Enjuagar con agua destilada
- 7.- Colocar durante 20 min en solución de tinción de fluoro jade  $\beta$  al 0.0004% diluido en ácido acético al 0.1% .
- 8.-Enjuagar durante un min en 3 baños diferentes de agua destilada.
- 9.- Remover el exceso de agua destilada
- 10.- Colocar los cortes en un secador de cortes a 50°C por 5 a 10 min. Los cortes secos son limpiados por inmersión en xileno por lo menos un min antes de ser cubiertos por resina
- 11.- Al terminar, los cortes se observan al microscopio con lámpara de fluorescencia (Leica DMLS Galen III) con una cámara digital a color (SSC-DC14) acoplada. La marca fluorescente fue visualizada usando luz verde con una excitación (500-570 nm). La intensidad de la fluorescencia fue medida y cuantificada usando el software Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). La intensidad fue calculada y expresada como el promedio de la intensidad de píxeles de la región de interés (ROI).

Para cada experimento la fluorescencia fue calculada en por lo menos tres diferentes ROIs. Estos valores fueron promediados y fueron divididos en 5 categorías, partiendo de la intensidad del fondo hasta la mayor intensidad registrada (categorías: -; +; ++; +++; ++++).

La técnica de Fluoro-Jade se usa para marcar de manera simple y segura neurodegeneración, incluyendo cuerpos celulares, dendritas, axones y terminales nerviosas (Schmued et al, 1997).

### **6.13. Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico se uso el software estadístico y graficador Graphpad Prism versión 5.0 (1992-2007) aplicando un ANOVA de una vía seguido por una prueba de Tukey a los grupos de datos. Los valores de  $P < 0.05$  se consideraron significativos. Los datos se expresaron como promedio  $\pm$  error estándar medio (EEM).

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Confirmación de la lesión con 6-OHDA

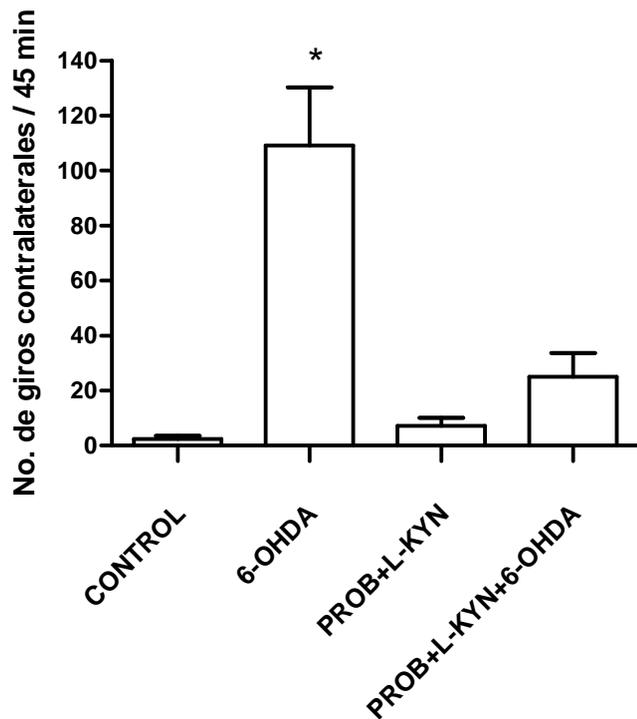
En la Figura (Fig.) 1, observamos la confirmación de la lesión a las vías nigroestriatales con una inmunohistoquímica contra la TH. En A) observamos una inmunoreactividad claramente disminuida por la administración i.e. con 6-OHDA en el estriado lesionado, mientras que en B) se observa una mayor inmunoreactividad contra TH en el estriado intacto.



**Fig. 1** Confirmación de la lesión con 6-OHDA mediante una técnica inmunohistoquímica contra la TH. A) Lado lesionado i.e. con 6-OHDA. B) lado intacto contralateral a la lesión i.e. con 6-OHDA. En un aumento 0.63 X

## 7.2. Conducta de rotación

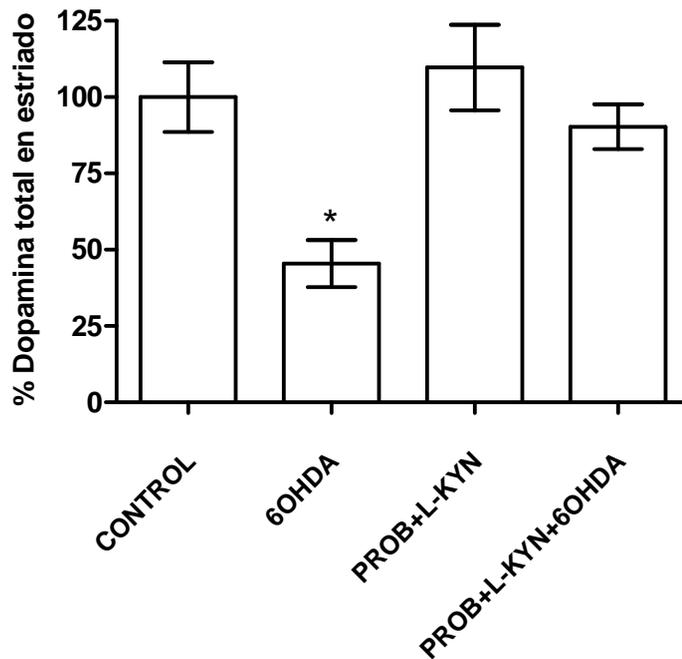
En la Fig. 2 observamos que la 6-OHDA aumentó significativamente la conducta de rotación comparada con el grupo control. Por otra parte, los tratamientos solos (L-KYN y PROB por separado) no generaron cambios significativos con respecto al control, mientras que los mismos tratamientos administrados simultáneamente disminuyeron la conducta de rotación inducida por la 6-OHDA de manera significativa.



**Fig. 2** Efecto del tratamiento con PROB + L-KYN sobre la conducta rotacional inducida por la 6-OHDA en ratas. Las columnas representan el promedio  $\pm$  EEM para los 4 grupos con una n=10 por grupo. \*P<0.05 denota diferencias vs. control, PROB+L-KYN y PROB+L-KYN+6-OHDA. ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey.

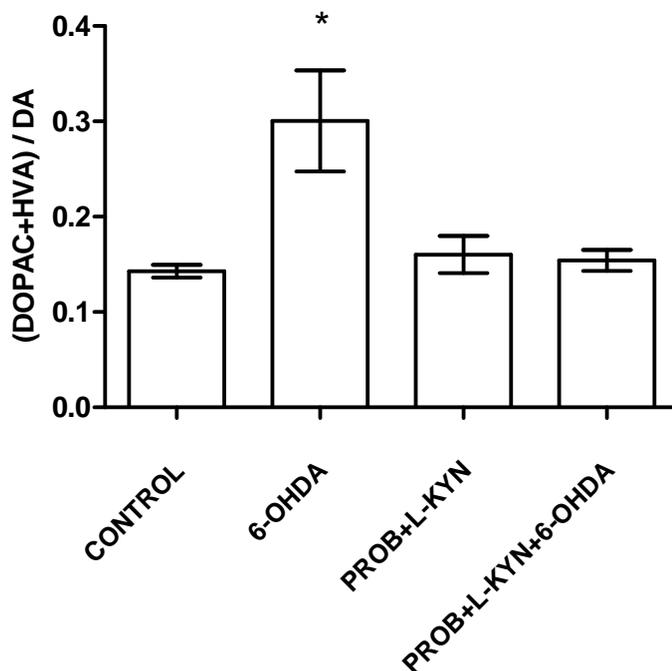
### 7.3. Niveles de dopamina estriatal y metabolitos

En la Fig. 3 observamos una disminución significativa de los niveles de dopamina en tejido estriatal en el grupo tratado con 6-OHDA con respecto al grupo control. Esta disminución de dopamina se ve atenuada por la administración de PROB + L-KYN.



**Fig. 3** Efecto del tratamiento con PROB+L-KYN sobre los niveles de dopamina total estriatal inducidos por 6-OHDA en ratas (n= 6). Las columnas representan el promedio  $\pm$  EEM. \*P<0.05 denota diferencias vs. control, PROB+L-KYN, PROB+L-KYN+6-OHDA. ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey.

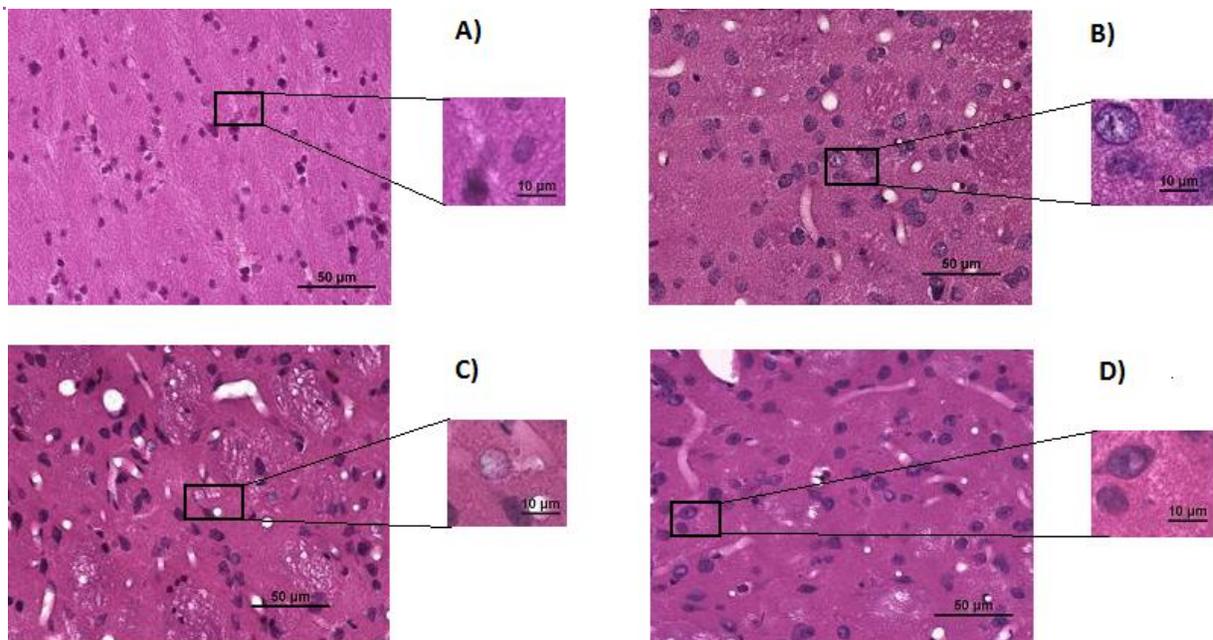
En la Fig 4. Observamos un aumento significativo en el metabolismo (índice de recambio) de la dopamina en tejido estriatal en el grupo tratado con 6-OHDA con respecto al grupo control. Este aumento se ve contrarrestado en el grupo tratado con PROB y L-KYN.



**Fig. 4** Efecto del tratamiento con PROB+L-KYN sobre el metabolismo de dopamina inducido por 6-OHDA en ratas (n= 6). Las columnas representan el promedio  $\pm$  EEM. \*P<0.001 denota diferencias vs. control, PROB+L-KYN, PROB+L-KYN+6-OHDA. ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey

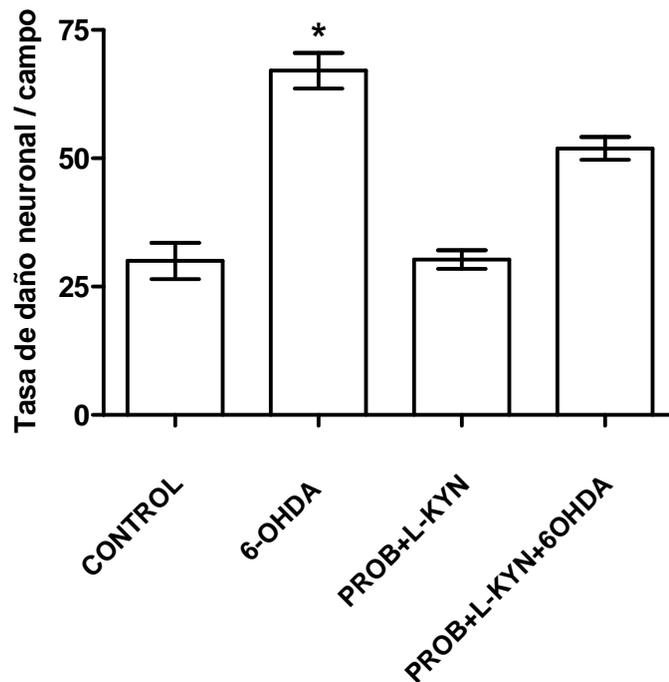
#### 7.4. Tinción hematoxilina/ eosina

En la Fig. 5 podemos observar la tinción con Hematoxilina/Eosina de los diferentes grupos, observando una mayor integridad de núcleos celulares a nivel del estriado en el grupo control y en el grupo tratado con PROB+L-KYN, mientras que en el grupo tratado con 6-OHDA encontramos núcleos con regiones con mayor afinidad a la hematoxilina, así como de mayor tamaño e irregulares. El grupo tratado con PROB+L-KYN+6-OHDA mantuvo la al ser comparado con el grupo tratado con 6-OHDA sola.



**Fig. 5** Tinción de hematoxilina/Eosina mostrando el efecto del tratamiento con PROB y L-KYN sobre la toxicidad de 6-OHDA en ratas. A) grupo control, B) Grupo 6-OHDA, C) Grupo tratado con PROB + L-KYN y D) Grupo tratado con PROB+L-KYN+ 6OHDA. Cortes a nivel de cuerpo estriado de cerebro de rata en un aumento 40x, el cuadro pequeño denota un aumento de 100x en la región 40x señalada.

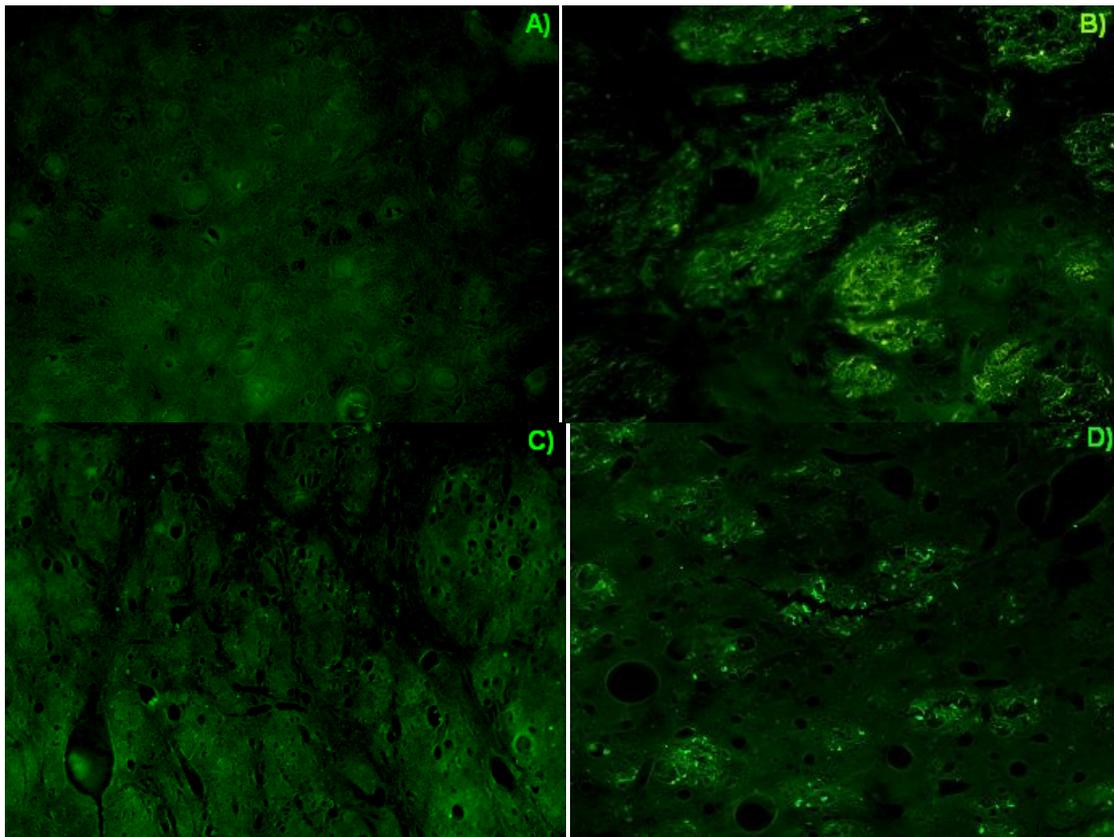
En la Fig. 6 observamos que la 6-OHDA produjo un aumento en la tasa de daño neuronal de manera significativa con respecto al control, mientras que los tratamientos por sí solos no generaron cambios significativos con respecto al control; el grupo tratado con PROB+L-KYN+6-OHDA tuvo una disminución en este marcador con diferencias significativas con respecto al grupo de 6-OHDA solo.



**Fig. 6** Efecto del tratamiento con PROB + L-KYN sobre la tasa de daño neuronal inducida por la administración intraestriatal de 6-OHDA en ratas. Las columnas representan el promedio  $\pm$  EEM de 10 campos tomados al azar (al mismo nivel de corte) de 3 cortes por cerebro (40x), en grupos con  $n=3$ . \* $P<0.05$  denota diferencias vs. control, PROB+L-KYN, PROB+L-KYN+6-OHDA. ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey

### 7.5. Tinción con Fluoro jade $\beta$

En la Fig. 7 podemos observar la tinción con fluoro jade- $\beta$  de tejidos de los diferentes grupos, observando una mayor fluorescencia en el grupo tratado con 6-OHDA, dada por la neurodegeneración positiva de cuerpos neuronales y fibras, mientras que el grupo tratado con PROB+L-KYN+6-OHDA muestra una disminución de este marcador positivo de neurodegeneración provocado por la administración de 6-OHDA en ratas.



**Fig. 7** Tinción con fluoro jade  $\beta$  mostrando el efecto del tratamiento con PROB y L-KYN sobre el efecto tóxico de la 6-OHDA en ratas. A) grupo control, B) Grupo 6-OHDA, C) Grupo tratado con PROB + L-KYN y D) Grupo tratado con PROB+L-KYN+ 6OHDA. La fluorescencia verde muestra la positividad a la neurodegeneración en fibras y cuerpos neuronales en cortes a nivel del estriado en cerebro de rata (40x).

**Tabla 1. Comparación de la intensidad de fluorescencia por Fluoro Jade  $\beta$  en diferentes tratamientos.**

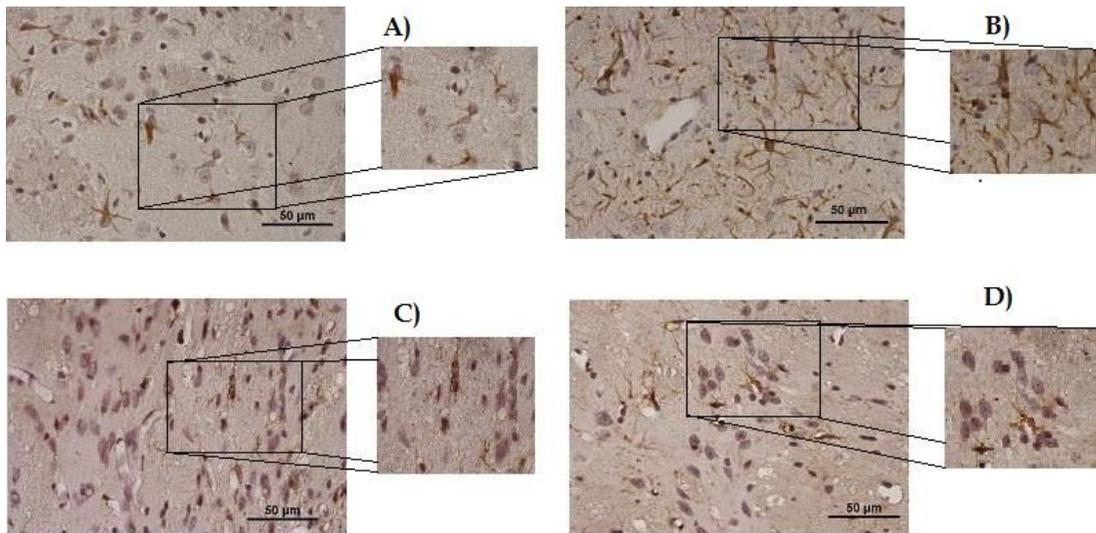
<b>Control</b>	<b>6-OHDA</b>	<b>PROB+L-KYN</b>	<b>PROB+L-KYN+6-OHDA</b>
-	++++	-	+

**Nota:**

**Intensidad de FJ $\beta$ : +++++, mayor intensidad; +, baja intensidad; -, intensidad de fondo.**

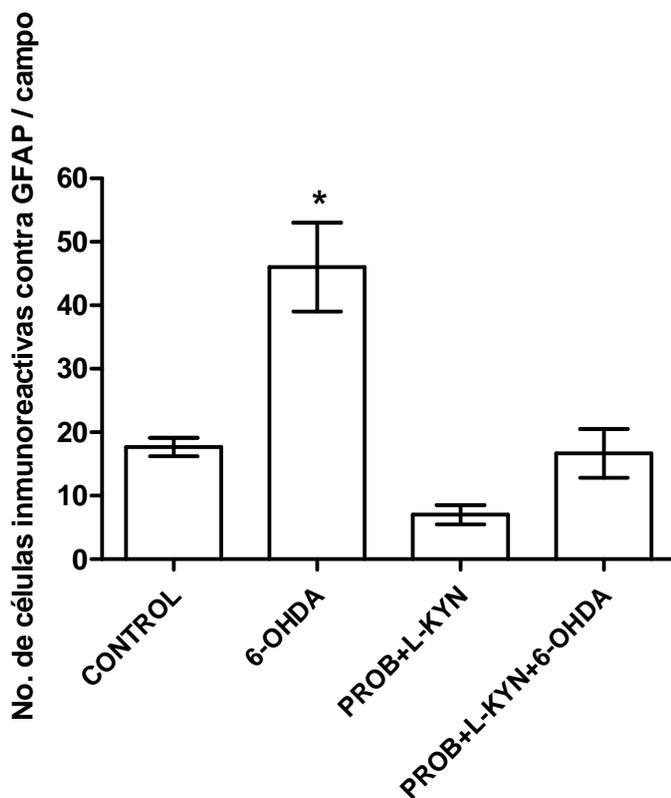
## 7.6. Inmunohistoquímica contra GFAP

En la Fig. 8 podemos observar la inmunohistoquímica contra GFAP de los diferentes grupos experimentales, observándose una mayor expresión de esta proteína en el grupo tratado con 6-OHDA, Mientras que en el grupo tratado con PROB+L-KYN+6-OHDA observamos una disminución en la expresión de la GFAP al ser comparado con el grupo tratado con 6-OHDA.



**Fig. 8** Inmunohistoquímica contra GFAP mostrando el efecto del tratamiento con PROB y L-KYN sobre el efecto tóxico de la 6-OHDA en ratas. A) grupo control, B) Grupo 6-OHDA, C) Grupo tratado con PROB + L-KYN y D) Grupo tratado con PROB+L-KYN+ 6OHDA La inmunoreactividad positiva contra la GFAP se muestra en astrocitos marcados en color marrón. Cortes estriatales de cerebro de rata (40x), el cuadro pequeño denota un aumento 100x en la región 40x señalada.

La Fig. 9 muestra que en el grupo tratado con 6-OHDA se generó una mayor inmunoreactividad contra la GFAP en términos cuantitativos y de manera significativa al ser comparada con el grupo control. Esta gliosis reactiva provocada por la 6-OHDA se vio disminuida por la administración de PROB + L-KYN.



**Fig. 9** Efecto del tratamiento con PROB+L-KYN sobre el número de células inmunoreactivas a GFAP inducido por 6-OHDA en ratas. Las columnas representan el promedio  $\pm$  EEM de 10 campos escogidos al azar (al mismo nivel de corte) de 3 cortes por cerebro en grupos con una n=3. \*P<0.05 denota diferencias vs. control, PROB+L-KYN, PROB+L-KYN+6-OHDA. ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey.

## 8. DISCUSIÓN

### *Consideraciones generales*

Los resultados de este trabajo sugieren que la administración sistémica de PROB + L-KYN constituye una estrategia farmacológica de considerable potencial terapéutico capaz de disminuir el daño dopaminérgico general inducido por la lesión estriatal con 6-OHDA a ratas. Siendo enfáticos, este es, a nuestro entender, el primer reporte que establece y valida a esta estrategia para la atenuación de los daños dopaminérgicos en el modelo de parkinsonismo por 6-OHDA. Nuestros resultados cobran más relevancia al ser contrastados con los de previos estudios donde esta estrategia protectora ha demostrado prevenir el daño excitotóxico causado por el ácido quinolínico – un agonista glutamatérgico selectivo sobre receptores para NMDA – en ratas a nivel estriatal (Miranda et al., 1997; Santamaría et al., 1996), así como sobre las convulsiones inducidas por pentilentetrazol (Vécsei et al., 1992), y sobre las alteraciones conductuales y morfológicas producidas por el péptido  $\beta$ -amiloide (Carrillo et al., 2010) también en ratas. En términos generales, el principio de esta estrategia se ha adjudicado al aumento en los niveles endógenos de KYNA en el cerebro y la subsecuente inhibición de la transmisión glutamatérgica exacerbada, como ha sido ya demostrado en otros estudios (Miller et al., 1992; Vecsei et al., 1992).

Pero, en términos reales, cuando comienza a generarse el patrón de daño excitotóxico que es atenuado por los niveles incrementados de KYNA en el modelo de toxicidad por 6-OHDA? Recientemente nuestro grupo ha descrito que la administración i.e. de 6-OHDA a ratas aumenta la liberación de manera inmediata de los neurotransmisores glutamato y dopamina (Tobón-Velasco et al., 2010), por lo que podemos sugerir con sustento experimental que esta toxina induce la disponibilidad inmediata de transmisores potencialmente excitotóxicos y comienza así la cascada de daño celular que se expresará en diferentes marcadores en el tiempo. Entonces, bajo este esquema, los niveles incrementados de KYNA en un esquema de administración de L-KYN + PROB bien

podrían estar bloqueando no solo la liberación de glutamato desde la corteza hacia el cuerpo estriado por el bloqueo de receptores  $\alpha 7$ -nACh presentes principalmente en estas aferencias (Carpenedo et al., 2001), sino que también estaría actuando directamente sobre NMDAR, impidiendo así que el glutamato se una a su receptor y desencadene eventos de excitotoxicidad posteriores (Pérez-De La Cruz et al., 2007; Stone, 2000). De igual manera, el KYNA también podría estar regulando la liberación de dopamina inmediata tras la infusión con 6-OHDA, ya que al inhibir las aferencias glutamatérgicas de la corteza al cuerpo estriado por medio de receptores  $\alpha 7$ -nACh, se estaría regulando la liberación de glutamato (Carpenedo et al, 2001), además de una posterior liberación de dopamina tras una interacción con receptores glutamatérgicos presentes en las aferencias dopaminérgicas de la SNpc hacia el cuerpo estriado (Rassoulpour et al., 2005). Todo lo anterior encuentra sustento en el hecho de que se ha reportado que niveles elevados de KYNA cerebral son alcanzados desde los 30 minutos posteriores a la inyección de L-KYN y/o PROB (Miller et al., 1992; Vecsei et al., 1992). Adicionalmente, se sabe que tras la administración de PROB y L-KYN, el KYNA tiene un pico máximo a las 2 h, regresando a niveles basales a las 5 h después del tratamiento, por lo que es factible pensar que la acción protectora de esta molécula bajo el esquema empleado en este estudio, incluya los mecanismos descritos en esta sección. A continuación, presento una descripción detallada de los hallazgos de este trabajo y su relevancia en el contexto teórico para el sustento de la hipótesis de protección en nuestro modelo experimental.

#### *KYNA vs. 6-OHDA, hallazgos conductuales*

De acuerdo a los resultados obtenidos en nuestros experimentos conductuales, la infusión estriatal de la toxina 6-OHDA resultó, de acuerdo a lo esperado, en un aumento en la conducta rotacional de los animales, evidenciando así una lesión unilateral por pérdida de transmisión dopaminérgica. Este evento (rotación aumentada) es ampliamente reconocido en la literatura (Ungerstedt. 1971) y se ha explicado como el resultado de un

desbalance en la estimulación neuroquímica en el estriado de animales entre el hemisferio lesionado y el no lesionado, cuando se realiza una lesión unilateral aguda y los animales son retados farmacológicamente con agonistas dopaminérgicos. Entonces, el lado lesionado es más estimulado que el no lesionado y esto conlleva a la rotación (asimetría motora), la cual, dependiendo del modelo tóxico practicado, del agonista dopaminérgico empleado, y de elementos como las coordenadas de lesión, puede ser ipsilateral o contralateral a la lesión. En nuestro modelo tóxico, esta rotación fue contralateral al lado de la lesión, como era de esperarse. La administración sistémica de PROB y L-KYN, iniciando antes de la lesión por 6-OHDA, resultó en una prevención de este marcador, sugiriendo entonces que este tratamiento indujo una preservación de la transmisión dopaminérgica por la prevención de la pérdida de terminales, receptores y neuronas en el estriado lesionado, demostrando así de una manera funcional, el carácter neuroprotector de esta doble estrategia farmacológica. Este tipo de evidencias se han reportado con anterioridad en el mismo modelo tóxico cuando se emplean otros agentes protectores, como la pelargonidina (Roghani et al, 2010)

#### *KYNA vs. 6-OHDA, hallazgos neuroquímicos*

Como resultado de una lesión estriatal unilateral por 6-OHDA en ratas, se puede observar después de algunos días, que la disminución de terminales dopaminérgicas estriatales por muerte de neuronas dopaminérgicas de la SNpc por degeneración retrógrada induce a un déficit en los niveles estriatales de dopamina y a alteraciones en el metabolismo de este neurotransmisor (Blum et al, 2001). Nuestros resultados confirman estos eventos para el caso de la infusión de la toxina 6-OHDA, la cual indujo una disminución significativa de dopamina, así como un aumento en el metabolismo de degradación del neurotransmisor. Se sabe que la 6-OHDA muestra una alta afinidad por el transportador de dopamina, por lo que la toxina es introducida a las terminales dopaminérgicas y se acumula en el citosol, provocando una alta auto-oxidación y promoviendo un alto índice de formación de ERO. Así también, la 6-OHDA puede

acumularse en la mitocondria, donde inhibe la actividad del complejo I de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Schober, 2004), y en conjunto, todos estos eventos inducirán la muerte progresiva de las neuronas dopaminérgicas y la consecuente pérdida de este neurotransmisor.

El índice de recambio de dopamina (HVA+DOPAC/DA), o turnover, generalmente aumenta por la administración tópica de 6-OHDA, indicando una acelerada actividad metabólica en las terminales dopaminérgicas que en principio refleja un intento por mantener los niveles de dopamina extracelulares frente a un daño neuronal (Costa et al, 2001). Sin embargo, resulta evidente que un aumento en la tendencia de formación de metabolitos de degradación de la dopamina oriente la vía metabólica de este neurotransmisor hacia su descomposición en las terminales remanentes después de la lesión, enfatizando así el daño que ejerció la toxina. Así, estos elementos ocurrieron en el modelo tóxico empleado, pero fueron prevenidos por L-KYN + PROB, sugiriendo que la preservación neuronal por esta estrategia confluye también en una protección funcional a nivel neuroquímico; es decir, no solo se protege a las células dopaminérgicas y su entorno a nivel estructural, sino también (y más importante) a nivel funcional.

#### *KYNA vs. 6-OHDA, correlato morfológico de protección*

Hasta aquí hemos descrito la relevancia de la protección por acumulación de KYNA sobre marcadores típicamente funcionales alterados por 6-OHDA, como son la conducta rotacional y la alteración neuroquímica del sistema dopaminérgico. Sin embargo, para confirmar esta protección debemos incluir evidencia morfológica. En el estriado hay diferentes tipos neuronales coordinando la actividad de neuronas GABAérgicas, y aunque bien sabemos que la 6-OHDA tiene afinidad por el transportador a dopamina de las células dopaminérgicas, también se ha reportado que esta toxina puede estar ejerciendo efectos de daño sobre otros tipos neuronales, ya que potentes bloqueadores de la recaptura de dopamina y norepinefrina no previenen su toxicidad (Storch et al., 2000).

También existe evidencia sobre la inhibición de los transportadores de catecolaminas por 6-OHDA, reteniendo a la toxina en el espacio extracelular, contribuyendo así a una fracción de su toxicidad (Decker et al., 1993). En este caso, ocurrirá la autooxidación de la 6-OHDA a nivel extracelular (Blum et al., 2000), generando así EROs altamente nocivos para diferentes tipos celulares. Por lo anterior, centramos nuestro análisis morfológico en células estriatales en general.

En una primera aproximación morfológica, evaluamos la apariencia general del estriado por la técnica de Hematoxilina y Eosina para la tinción de núcleos celulares sin distinguir su origen. Como era de esperarse, la 6-OHDA generó un daño evidente sobre esta estructura, evidenciado por el aumento de picnosis y vacuolización. El tratamiento con PROB y L-KYN disminuyó estas alteraciones de manera significativa, reduciendo la tasa de daño neuronal en el estriado inducida por la 6-OHDA. Esto nos lleva a sugerir que el tratamiento con L-KYN + PROB es capaz de prevenir las alteraciones morfológicas mayores inducidas por la toxina. Otros tratamientos protectores han mostrado semejante eficacia en el mismo modelo en reportes previos (Quintero et al, 2006 ). En consideración de estos prometedores resultados, procedimos a evaluar un segundo marcador morfológico más específico, uno que nos permitiera poner en evidencia un proceso degenerativo en el caso de la lesión con la toxina, y su posible prevención por el doble tratamiento. La técnica de tinción por fluorescencia que utilizamos se basa en la afinidad del fluorocromo Fluoro Jade  $\beta$  por toda neurona en proceso de degeneración, incluyendo cuerpos celulares, dendritas, axones y terminales axónicas (Damjanac et al, 2007). Su principio se basa en que, siendo un fluorocromo ácido, éste tendrá afinidad por componentes básicos, entre los cuales se cuentan diversos productos de degeneración, como las poliaminas. Siendo la infusión estriatal de 6-OHDA a ratas un modelo agudo de degeneración, esperábamos que el tejido estriatal lesionado de estos animales mostrara una mayor intensidad de fluorescencia que los animales Sham, como se ha reportado para el mismo modelo con anterioridad (Ehara & Ueda, 2009). Efectivamente, una mayor

y específica fluorescencia fue encontrada en células estriatales de animales expuestos a la toxina, mientras que el tratamiento de las ratas con L-KYN + PROB y lesionadas con la toxina generó una reducción en la intensidad de fluorescencia, sugiriendo que el tratamiento que induce la acumulación de KYNA no solo previno alteraciones morfológicas gruesas – a juzgar por los resultados de la técnica H & E -, sino que además rescató a las células estriatales de la degeneración de manera parcial. Derivado de estos hallazgos, surgió una siguiente pregunta: que tipo celular es dañado o cual es preservado en este modelo, y cual es estimulado para generar protección por KYNA? Aunque el tiempo de desarrollo del proyecto ya no permitía realizar todas las aproximaciones morfológicas requeridas para responder a esta pregunta (quedando para ser contestada en estudios posteriores), decidimos por lo menos caracterizar la respuesta astrocítica del tejido estriatal de ratas lesionadas con 6-OHDA y el efecto del doble tratamiento. Para ello, empleamos la técnica de inmunotinción de astrocitos por marcaje selectivo de la proteína glial fibrilar acídica (GFAP), una proteína propia de este tipo celular. La neurodegeneración envuelve diversos cambios relacionados con diferentes células del tejido nervioso, como aquellas respuestas inflamatorias provenientes de astrocitos y células de la microglia. Los astrocitos juegan un papel esencial en el mantenimiento de la integridad funcional de de las sinapsis, amortiguando el exceso de neurotransmisores por su recaptura, secretando factores neurotróficos, e incluso modulando la actividad de las neuronas (Vernadakis, 1998). Se sabe que los astrocitos se vuelven inmunológicamente reactivos en respuesta a procesos de daño y degeneración del cerebro, mostrando un aumento en la síntesis de GFAP, formando cicatrices gliales, y en ocasiones obstruyendo la regeneración axonal (Block y Hong, 2005). Aún cuando no se sabe si la gliosis reactiva de astrocitos obedece pretende ser una respuesta de protección o adaptación al daño, o constituir un componente que contribuya a la degeneración neuronal, este fenómeno es comúnmente aceptado como un índice de daño al tejido nervioso cuando se ve incrementado. El número de células inmunoreactivas a GFAP fue drásticamente

incrementado con respecto a su control por efecto de la 6-OHDA como ya se ha reportado en otros estudios previos (Sheng et al, 1993), mientras que el tratamiento con L-KYN + PROB a animales lesionados con la toxina redujo casi por completo la gliosis reactiva, sugiriendo así que el componente astrocítico en el modelo tóxico es un blanco potencialmente terapéutico para combatir las alteraciones neurológicas que se deriven de la degeneración estriatal.

En su conjunto, todas estas evidencias de protección morfológica apoyan el concepto de que el aumento estriatal en los niveles de KYNA mediados por su precursor y el inhibidor de su transporte es un elemento protector para la preservación estructural de las células que son sensibles a ser atacadas por la 6-OHDA a través de sus diferentes mecanismos tóxicos.

#### *6-OHDA, estrés oxidativo y protección por L-KYN + PROB, una posibilidad adicional*

Dado que uno de los mecanismos tóxicos de la 6-OHDA sobre la vía nigroestriatal tiene que ver con la generación directa de ERO - principalmente de peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo derivados de la auto-oxidación de esta toxina -, así como la inhibición del Complejo I de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Blum et al., 2001), la justificación de una protección por parte del KYNA acumulado en el cerebro sobre este mecanismo desde tiempos cortos y hasta tiempos prolongados de toxicidad debe tener un sustento teórico. Nosotros sugerimos que el KYNA acumulado podría estar generando protección antioxidante debido a sus propiedades antioxidantes ya reportadas, ya que ha mostrado ser un buen atrapador del radical hidroxilo, siendo ésta una más de sus acciones neuroprotectoras potenciales (Zsizsik & Hardelan. 2001; Goda et al, 1996)

. Así, el KYNA bien podría estar disminuyendo los niveles de ERO generadas por la 6-OHDA, o por la auto-oxidación de la dopamina (Jakel & Maragos, 2000). Esto tiene enorme relevancia pues permite sugerir un mecanismo multifactorial de protección

ejercido por esta estrategia terapéutica que no se remite a la mera inhibición de eventos excitotóxicos, sino que puede estar actuando a diferentes niveles.

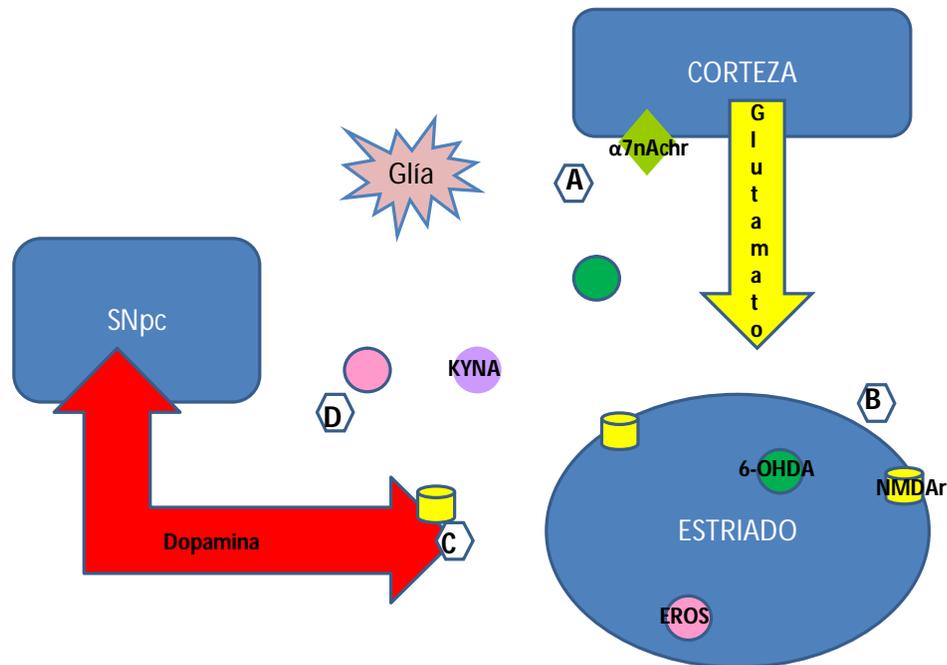
### *Consideraciones finales*

En resumen, todos los puntos mencionados anteriormente favorecen la hipótesis de que la administración sistémica de L-KYN + PROB protege tanto a las terminales dopaminérgicas y neuronas GABAérgicas en el cuerpo estriado, como a las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, considerando que en modelo de degeneración neuronal ocurre de manera retrógrada (Berger et al, 1991). Todo lo anterior fue evidenciado por marcadores bioquímicos (como los niveles de dopamina estriatal y el metabolismo o “turnover”), morfológicos y conductuales.

Dos elementos esenciales restan en esta discusión, y serán abordados brevemente: 1) El hecho de que el aumento de KYNA por el doble tratamiento farmacológico a animales lesionados estriatalmente con 6-OHDA produjera efectos de protección parcial a través de la mayoría de los marcadores evaluados en nuestro estudio sugiere que si bien esta estrategia terapéutica experimental no representa una herramienta “mágica” de protección y prevención del daño celular en su totalidad como se ha observado en estudios previos en otros modelos (Miranda et al., 1997; Santamaría et al., 1996; Vécsei et al., 1992; Carrillo et al., 2010), si parece generar suficiente protección como para preservar un número de células neuronales suficiente para conservar la funcionalidad del estriado como estructura de relevo y depuración de información, lo que sugiere a su vez que estrategias similares en la clínica podrían resultar en el alargamiento de la funcionalidad de áreas celulares afectadas en diversas neuropatías degenerativas que cursen con elementos de transmisión dopaminérgica y glutamatérgica comprometidas y producir así una sobrevida considerable a sus pacientes. Este punto debe considerarse como un valor agregado a este tipo de estudios básicos, pues nos alecciona sobre la plasticidad del SNC. 2) El completo abatimiento de la gliosis reactiva por efecto de la administración de L-KYN + PROB a animales lesionados con 6-OHDA es un resultado intrigante. Si bien,

como establecimos con anterioridad, aún no se conoce con precisión si la respuesta de los astrocitos ante lesiones cerebrales es una medida de adaptación o cuando contribuye al daño degenerativo, si existen reportes en la literatura que establecen que los astrocitos pueden “defender” a las células neuronales de eventos de daño. Nuestros resultados podrían estar sugiriendo esa posibilidad pues este tipo celular se mantuvo en las condiciones basales de gliosis reactiva aún con lesión estriatal cuando se le estimuló con los agentes moduladores del KYN. Pero como podrían los astrocitos contribuir a la protección en este modelo? Nosotros sugerimos que una posibilidad sería a través de la respuesta antioxidante que los astrocitos generan preferencialmente sobre las neuronas. Se ha visto que diversos sistemas de defensa antioxidante y sus respuestas son activados en astrocitos por efecto de condiciones de riesgo para las neuronas y que estos elementos de defensa están disponibles para las neuronas y su defensa. De cualquier manera, esta sugerencia deberá ser explorada, apoyada o descartada en siguientes estudios.

Finalmente, en el esquema siguiente resumimos los diferentes mecanismos de protección que proponemos que podrían estar ocurriendo en el modelo tóxico de la 6-OHDA por efecto de la estrategia L-KYN + PROB.



**Esquema 1** Vías propuestas de regulación del KYNA sobre los efectos tóxicos de la 6-OHDA. A) Bloqueo de receptores  $\alpha 7nAchr$  que regulan la liberación glutamatérgica de la corteza al estriado; B) Inhibición de NMDAr regulando así la excitotoxicidad dada por la sobreactivación de estos receptores; C) Bloqueo de NMDAr presentes en aferencias dopaminérgicas al estriado, regulando la liberación de dopamina al estriado, que a su vez tiene influencia de manera inversa sobre la recaptura de glutamato, los niveles de KYNA y la excitotoxicidad; D) Disminución de ERO generadas por la auto-oxidación de 6-OHDA por la capacidad antioxidante de KYNA.

## **9. RESUMEN DE RESULTADOS**

- El PROB y la L-KYN disminuyeron el daño neuronal en estriado producido por la 6-OHDA (tinción hematoxilina/eosina, inmunohistoquímica contra la GFAP y conducta de rotación)
- El PROB y la L-KYN tuvieron efectos protectores sobre la neurodegeneración inducida por la 6-OHDA (tinción de fluoro jade)
- El PROB y la L-KYN disminuyeron la pérdida de dopamina estriatal total inducida por la 6-OHDA.

## **10. CONCLUSIONES**

Los resultados en este trabajo muestran que la administración sistémica de PROB y L-KYN disminuye el daño al sistema nigroestriatal inducido por la 6-OHDA en ratas.

## **11. PERSPECTIVAS**

Consideramos necesario continuar con estudios más detallados sobre el mecanismo por el cual el PROB y la L-KYN protegen al estriado del daño por la administración de 6-OHDA. Los estudios que consideramos primordialmente necesarios son:

- Determinación de KYNA y dopamina por microdiálisis
- Uso de antagonistas y agonistas para evidenciar vías de neurotransmisión tanto colinérgica como dopaminérgica.
- Evaluar la neurodegeneración y el daño neuronal en la SNpc.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

- Beal. 2001. Experimental models of Parkinson's disease. *Nature Rev.* 2: 325-332.
- Berger et al. 1991. Retrograde degeneration of nigrostriatal neurons induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine injection in rats. *Brain Res Bull.* 26:301–307
- Betarbet et al. 2002. Animal models of Parkinson's disease. *BioEssays* 24: 308-318.
- Birch et al. 1988. Kynurenic acid antagonizes responses to NMDA via action at the strychnine-insensitive glycine receptor. *Eur J Pharmacol.* 154:85–87.
- Blandini et al. 2000. Functional changes of the basal ganglia circuitry in - Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* 62: 63-88.
- Blandini et al. 2007. Time-course of nigrostriatal damage, basal ganglia metabolic changes and behavioural alterations following intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine in the rat: new clues from an old model. *Eur. J. Neurosci*, 25: 397-405.
- Block and Hong. 2005. Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Prog Neurobiol.* 76:77–98
- Blum et al. 2000. Extracellular toxicity of 6-hydroxydopamine on PC12 cells. *Neurosci Lett.* 283: 193-196.
- Blum et al. 2001. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog in Neurobiol.* 65: 135–172.
- Bristow et al. 1996. Anticonvulsant and behavioral profile of L-701,324, a potent, orally active antagonist at the glycine modulatory site on the N-methyl-D-aspartate receptor complex. *J Pharmacol Exp Ther.* 279(2): 492-501.
- Carlsson & Carlsson. 1989. Dramatic synergism between MK-801 and clonidine

- with respect to locomotor stimulatory effect in monoamine-depleted mice. *J. Neural Transm.* 77: 65-71.
- Carpenedo et al. 2001. Presynaptic kynurenate-sensitive receptors inhibit glutamate release *Eur J Neurosci* .13: 2141–2147.
- Carrillo et al, 2010. Protective effect of systemic L-kynurenine and probenecid administration on behavioural and morphological alterations induced by toxic soluble amyloid beta (25-35) in rat hippocampus. *Behav Brain Res.* 210(2): 240-250.
- Carroll et al. 1995. Neurochemical and behavioural investigations of the NMDA receptor-associated glycine site in the rat striatum: functional implications for treatment of parkinsonian symptoms. *Psychopharmacology (Berl)*. 119(1):55-65.
- Chaudhuri et al. 2006. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. *Lancet Neurol.* 5: 235–245.
- Chiamulera et al. 1990. Effect of NMDA- and strychnine-insensitive glycine site antagonists on NMDA-mediated convulsions and learning. *Psychopharmacology (Berl)*. 102(4): 551-552.
- Choi & Cheon. 1999. Delayed movement disorders after carbon monoxide poisoning. *Eur Neurol* 42: 141–144.
- Clarke. 2004. Neuroprotection and pharmacotherapy for motor symptoms in Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 3: 466–474.
- Collins & Neafsey. 1985. Beta-carboline analogues of Nmethyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine (MPTP): endogenous factors underlying idiopathic parkinsonism? *Neurosci Lett* 55:179–184
- Costa et al. 2001. Nicotine prevents striatal dopamine loss produced by 6-hydroxydopamine lesion in the substantia nigra. *Brain Res.* 112: 127-137.

- Csillik et al. 2006. Effect of 6-hydroxydopamine treatment on kynurenine aminotransferase-I (KAT-I) immunoreactivity of neurons and glial cells in the rat substantia nigra. *Acta Neuropathol.* 112: 127-137
- Danysz et al. 1995. Glutamate in CNS disorders: a revived target for drug development? *Drug News Perspect.* 8, 261–277.
- Decker et al, 1993. Competitive irreversible inhibition of dopamine uptake by 6-hydroxydopamine, *Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol.*79: 195-208.
- Del Dotto et al. 2001. Intravenous amantadine improves levodopa-induced dyskinesias: an acute double-blind placebo-controlled study. *Mov. Disord.*16:515-520.
- Damjanac et al. 2007. Fluoro-Jade<sup>®</sup> B staining as useful tool to identify activated microglia and astrocytes in a mouse transgenic model of Alzheimer's disease. *Brain Res.* 1128: 40-49.
- Drechsel & Patel. 2008. Role of reactive oxygen species in the neurotoxicity of environmental agents implicated in Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med.* 44(11):1873-1886.
- Eastman & Guilarte. 1989. Cytotoxicity of 3-hydroxykynurenine in a neuronal hybrid cell line. *Brain Res.* 495(2): 225-231.
- Eng et al. 2000. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res.* 25(9-10): 1439-1451.
- Foster et al. 1984. Kynurenic acid blocks neurotoxicity and seizures induced in rats by the related brain metabolite quinolinic acid. *Neurosci Lett.* 48(3): 273-278.
- Fukui et al. 1991. Blood–brain barrier transport of kynurenines: implications for brain synthesis and metabolism. *JNeurochem.* 56: 2007–2017

- García et al. 2008. Lipid peroxidation, mitochondrial dysfunction and neurochemical and behavioural deficits in different neurotoxic models: Protective role of S-allylcysteine. *Free Radic Res.* 42(10): 892-902.
- Gardoni & Di Luca. 2006. New targets for pharmacological intervention in the glutamatergic synapse. *Eur J pharmacol* 545(1) 2-10.
- Goda et al. 1996. Quinolinic acid and active oxygens. Possible contribution of active Oxygens during cell death in the brain. *Adv. Exp. Med. Biol.* 398: 247-254.
- Goldstein et al. 2000. 3-Hydroxykynurenine and 3-hydroxyanthranilic acid generate hydrogen peroxide and promote alpha-crystallin cross-linking by metal ion reduction. *Biochemistry.* 39: 7266–7275.
- Greenamyre. 2001. Glutamatergic influences on the basal ganglia. *Clin Neuropharmacol.* 24(2): 65-70.
- Guidetti et al. 2007. Mitochondrial aspartate aminotransferase: a third kynurenate-producing enzyme in the mammalian brain. *J Neurochem.* 102:103-111
- Hartai et al. 2005. Kynurenine metabolism in plasma and in red blood cells in Parkinson's disease. *J Neurol Sci.* 239: 31-35.
- Hilmas et al. 2001. The brain metabolite kynurenic acid inhibits alpha7 nicotinic receptor activity and increases non-alpha7 nicotinic receptor expression: physiopathological implications. *J. Neurosci.* 21: 7463-7473.
- Hurtig. 1997. Problems with current pharmacologic treatment of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 144, 10–11.
- Jakel and Maragos. 2000. Neuronal cell death in Huntington's disease: a potential role for dopamine. *Trends Neurosci.* 23: 239–245.

- Jankovic. 2005. Motor fluctuations and dyskinesias in Parkinson's disease: clinical manifestation. *Mov. Disord.* 20(11): 11–16.
- Kalia et al. 2008. NMDA receptors in clinical neurology: excitatory times ahead. *Lancet Neurol.* 7: 742–755
- Kelsey et al. 2004. NMDA receptor antagonists ameliorate the stepping deficits produced by unilateral medial forebrain bundle injections of 6-OHDA in rats. *Psychopharmacology.* 175(2):179-188.
- Kemp & McKernan. 2002. NMDA receptor pathways as drug targets. *Nat. Neurosci.* 5: 1039-1042.
- Kerkerian et al. 1987. Modulatory effect of dopamine on high-affinity glutamate uptake in the rat striatum. *J Neurochem.* 48(4): 1301-1306.
- Kessler et al. 1989. A glycine site associated with N-methyl-D-aspartic acid receptors: characterization and identification of a new class of antagonists. *J Neurochem.* 52 (4): 1319-1328.
- Kita et al. 2002. Effects of systemic and central nervous system localized inflammation on the contributions of metabolic precursors of the L-kynurenine and quinolinic acid pools in brain. *J Neurochem.* 82: 258–268.
- Klockgether & Turski. 1990. NMDA antagonists potentiate antiparkinsonian actions of L-dopa in monoamine-depleted rats. *Ann Neurol.*28(4): 539-546.
- Koek & Colpaert. 1990. Selective blockade of N-methyl-D-aspartate (NMDA)-induced convulsions by NMDA antagonists and putative glycine antagonists: relationship with phencyclidine-like behavioral effects. *J Pharmacol Exp Ther.* 252(1): 349-357.

- Koutsilieris & Riederer. 2007. Excitotoxicity and new anticholinergic strategies in Parkinson's disease and Alzheimer's disease. *Parkinsonism. Relat Disord.* 13(3): 329-331.
- Kretschmer et al. 1997. ACEA 1021, a glycine site antagonist with minor psychotomimetic and amnesic effects in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 130(2): 131-138.
- Kretschmer et al. 1994. Glycine site antagonists abolish dopamine D2 but not D1 receptor mediated catalepsy in rats. *Eur J Pharmacol*. 331(2-3): 109-116.
- Lang & Lozano. 1998. Parkinson's disease. First of two parts. *N. Engl. J. Med.* 339: 1044–1053.
- Lange et al. 1997. Dopamine/glutamate interactions in Parkinson's disease. *Neurosci Biobehav Rev*. 21(4): 393-400.
- Luchowski et al. 2002. 1-Methyl-4-phenylpyridinium and 3-nitropropionic acid diminish cortical synthesis of kynurenic acid via interference with kynurenine aminotransferases in rats. *Neurosci Lett*. 330(1): 49-52
- McBain & Mayer. 1994. N-methyl-D-aspartic acid receptor structure and function. *Physiol Rev*. 74: 723-760.
- Miller, et al. 1992. The effect of peripheral loading with kynurenine and probenecid on extracellular striatal kynurenic acid concentrations. *Neurosci Lett*. 146(1):115-118.
- Miranda et al. 1997. Protection against quinolinic acid-mediated excitotoxicity in nigrostriatal dopaminergic neurons by endogenous kynurenic acid. *Neuroscience*. 78(4): 967-975.

- Miranda et al. 1999. Quinolinic acid lesion of the nigrostriatal pathway: effect on turning behaviour and protection by elevation of endogenous kynurenic acid in *rattus norvegicus*. *Neurosci Lett.* 262: 81–84.
- Montastruc et al. 1997. Glutamate antagonists and Parkinson's disease: a review of clinical data. *Neurosci Biobehav Rev.* 21(4): 477-480.
- Murata and Kawasaki. 1993. Common and uncommon behavioural effects of antagonists for different modulatory sites in the NMDA receptor/channel complex. *Eur J Pharmacol.* 239(1-3):9-15.
- Nash & Brotchie. 2002. Characterisation of striatal NMDA receptors involved in the generation of parkinsonian symptoms: intrastriatal microinjection studies in the 6-OHDA-lesioned rat. *Mov Disord.* 17 (3): 455:466.
- Nash et al. 2004. The NR2B-selective NMDA receptor antagonist CP-101,606 exacerbates L-DOPA-induced dyskinesia and provides mild potentiation of anti-parkinsonian effects of L-DOPA in the MPTP-lesioned marmoset model of Parkinson's disease. *Exp Neurol.* 188(2): 471-479.
- Ogawa et al. 1992. Kynurenine pathway abnormalities in Parkinson's disease. *Neurology.* 42: 1702-1706.
- Okuno et al. 1991. Measurement of rat brain kynurenine aminotransferase at physiological kynurenine concentrations. *JNeurochem.* 57: 533–540.
- Olanow & Tatton. 1999. Etiology and pathogenesis of parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci.* 22: 123–144.
- Quintero et al. 2006 Behavioral and morphological effects of minocycline in the 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease. *Brain Res.* 1093 ( 1): 198-207

- Parsons et al. 1997. Novel systemically active antagonists of the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor: electrophysiological, biochemical and behavioral characterization. *J Pharmacol Exp Ther.* 283(3): 1264-1275.
- Paxinos & Watson. 1998. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Cuarta edición. Academic Press.
- Pérez-De La Cruz et al. 2007. Kynurenine pathway and disease: an overview. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets.* 6: 398-410.
- Poeggeler et al. 1998. Dopaminergic control of kynurenate levels and N-methyl-D-aspartate toxicity in the developing rat striatum. *Dev. Neurosci.* 20: 146-153.
- Rassoulpour et al. 2005. Nanomolar concentrations of kynurenic acid reduce extracellular dopamine levels in the striatum. *J Neurochem.* 93(3): 762-765.
- Rodríguez et al. 1999. Dapsone prevents morphological lesions and lipid peroxidation induced by quinolinic acid in rat corpus striatum. *Toxicology* 139: 111–118.
- Roghani et al. 2010. Oral pelargonidin exerts dose-dependent neuroprotection in 6-hydroxydopamine rat model of hemi-parkinsonism. *Brain Res Bull.* Artículo en prensa
- Santamaría et al. 1996. Systemic DL-kynurenine and probenecid pretreatment attenuates quinolinic acid-induced neurotoxicity in rats. *Neuropharmacology.* 35: 23-28.
- Schmued et al. 1997. Fluoro-Jade: a novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration. *Brain Res.* 751: 37–46.

- Schober. 2004. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. *Cell Tissue Res.* 318: 215-224.
- Schwarcz et al. 1983. Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain. *Science.* 219(4582): 316-318.
- Schwarcz et al. 1984. 3-Hydroxyanthranilate oxygenase activity is increased in the brains of Huntington disease victims. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85(11): 4079–4081.
- Schwarcz. 2004. The kynurenine pathway of tryptophan degradation as a drug target *Curr Opin Pharmacol.* 4:12–17.
- Shastri. 2001. Parkinson disease: etiology, pathogenesis and future of gene therapy. *Neurosci Res.* 41: 5-12.
- Sheng et al. 1993. Alterations in striatal glial fibrillary acidic protein expression in response to 6-hydroxydopamine-induced denervation. *Exp Brain Res.* 95: 450-456.
- Shin et al. 2008. Neuropsychotoxicity of abused drugs: potential of dextromethorphan and novel neuroprotective analogs of dextromethorphan with improved safety profiles in terms of abuse and neuroprotective effects. *J Pharmacol Sci.* 106(1): 22-27.
- Singh et al. 2007. Advances in the treatment of Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 81(1):29-44.
- Stocchi et al. 1996. Motor fluctuations in levodopa treatment: clinical pharmacology. *Eur.Neurol.* 36: 38–42.

- Stone & Darlington. 2002. Endogenous kynurenines as targets for drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov.* 1: 609–620
- Stone. 2001. Kynurenines in the CNS: from endogenous obscurity to therapeutic importance. *Prog Neurobiol.* (2): 185-218.
- Stone. 2000. Development and therapeutic potential of kynurenic acid and kynurenine derivatives for neuroprotection. *Trends Pharmacol. Sci.* 21, 149–154.
- Stone. 1993. Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids. *Pharmacol Rev.* 45:309-379.
- Storch et al. 2000. 6-Hydroxydopamine toxicity towards human SH-SY5Y dopaminergic neuroblastoma cells: independent of mitochondrial energy metabolism. *J. Neural Transm.* 107, 281–293.
- Tobón et al. 2010. Early toxic effect of 6-hydroxydopamine on extracellular concentrations of neurotransmitters in the rat striatum: An in vivo microdialysis study. *Neurotoxicology.*
- Ungerstedt. 1971. Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigrostriatal dopamine system. *Acta Physiol. Scand.* 367: 89–93
- Vécsei et al. 1992. Kynurenine and probenecid inhibit pentylentetrazol- and NMDLA-induced seizures and increase kynurenic acid concentrations in the brain. *Brain Res Bull.* 28(2):233-238.
- Vernadakis. 1998. Neuron–glia interrelations. *Int. Rev. Neurobiol.* 30:149–224
- .Watts . 1997. The role of dopamine agonists in early Parkinson's disease. *Neurology.* 49 (1):34-48.

- Weiner. 1999. The initial treatment of Parkinson's disease should begin with levodopa. *Mov Disord.* 14(5): 716-24.
- Williams. 1993. Ifenprodil discriminates subtypes of the N-methyl-D-aspartate receptor: selectivity and mechanisms at recombinant heteromeric receptors. *Mol pharmacol.* 49: 851-859.
- Yu et al. 2006. Characterization of kynurenine aminotransferase III, a novel member of a phylogenetically conserved KAT family. *Gene.* 365: 111-118.
- Ziemssen & Reichmann. 2007. Non motor dysfunction in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 13: 323-332.
- Zsizsik & Hardelan. 2001. In *Actions and Redox Properties of Melatonin and Other Aromatic Amino Acid Metabolites*; Harde-lan. Ed. Cuvillier: Göttingen, 156-163.