

Aspectos moleculares y prospectos de terapias en la enfermedad de Parkinson

Hebert Luis Hernández-Montiel*

RESUMEN

La enfermedad de Parkinson es el trastorno neurodegenerativo del movimiento más común y está caracterizado por la pérdida progresiva de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra, pars compacta. En el pasado, el principal obstáculo para el desarrollo de terapias de neuroprotección y restauración había sido el limitado conocimiento de los eventos moleculares que provocan esta neurodegeneración. En los últimos años y con el advenimiento de modernas técnicas de investigación se han podido conocer con mayor detalle la fisiopatología de esta enfermedad. Esto ha favorecido que se hayan desarrollado y perfeccionado, a través de distintas líneas de investigación, nuevas terapias que preventan o protejan de la enfermedad de Parkinson. El presente trabajo hace una revisión de los aspectos fisiopatológicos involucrados en la enfermedad de Parkinson, desde los aspectos genéticos hasta los ambientales, que provocan la disfunción y muerte de las neuronas dopaminérgicas. Hace referencia también a las nuevas terapias que están en desarrollo y que podrían disminuir la progresión de la enfermedad en aquellos pacientes portadores y con medidas neuroprotectoras, evitar que aparezcan nuevos casos.

Palabras clave: Enfermedad de Parkinson, disfunción mitocondrial, neurodegenerativo, apoptosis, terapias restaurativas y de neuroprotección.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Parkinson (EP) es un padecimiento neurodegenerativo que aumenta su inciden-

* Laboratorio de Neurobiología y Bioingeniería Celular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro.

Correspondencia:
MD, PhD Hebert Luis Hernández-Montiel. Laboratorio de Neurobiología y Bioingeniería Celular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro, Clavel Núm. 200, Prados de la Capilla, Santiago de Querétaro, 76170, México. Fax: 2161087. e-mail: heberth2003@yahoo.com.mx

Recibido: 08-09-2005

Aceptado: 16-10-2006

ABSTRACT

Parkinson's disease is the most common neurodegenerative movement disorder and it is characterized by a progressive loss of dopaminergic neurons located in the substantia nigra pars compacta. The main obstacle to develop neuroprotective and restorative therapies has been a limited understanding of the key molecular events causing neurodegeneration. In the past few years with the development of new methodological techniques, the knowledge about the physiology of this disease has increased, favoring the development of new preventive therapies. This review summarizes physiopathological aspects in Parkinson's disease, including genetics to environmental factors that might promote dopaminergic dysfunction and death. In the same way, it focuses in the development of new therapies to reduce the evolution of the disease in carrier patients avoiding arise of new cases, through neuroprotective measures.

Key words: Parkinson's disease, mitochondrial dysfunction, neurodegenerative, apoptosis, neuroprotective and restorative therapies.

cia con la edad, en el cual las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales mueren de forma progresiva, provocando los síntomas clínicos clásicos de la enfermedad. Se desconoce la causa exacta de la muerte de las neuronas dopaminérgicas, pero evidencias recientes sugieren que el estrés oxidativo forma parte de la fisiopatología de esta enfermedad, en este sentido las neuronas dopaminérgicas de pacientes con la EP presentan un incremento de marcadores de estrés oxidativo en proteínas, lípidos y ADN. Se ha reportado la reducción de la actividad del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, la presencia de la microglia reactiva en esta zona del cerebro y un incremento en los niveles de citocinas proinflamatorias en el líquido cerebroespinal de pacientes con EP.

Herbicidas como el paraquat y la rotenona, el compuesto metil-fenil-tetrahidropiridina (MPTP) y los metales pesados han sido involucrados en esta enfermedad. Alteraciones genéticas que afectan genes como el gen Parkin, α sinucleína y componentes del sistema proteosómico, se encuentran en algunos casos de EP. La evidencia reciente sugiere que los procesos fisiopatológicos de la EP podrían ser diversos y multifactoriales, por lo que el desarrollo de nuevos tratamientos tendrá que tomar en cuenta todos estos posibles factores involucrados. En esta revisión se tratarán al inicio los diversos factores asociados al desarrollo de la enfermedad y después, se hablará de las nuevas terapias de neuroprotección y restauración que a partir de los últimos conocimientos de esta enfermedad, se han desarrollado y que podrían disminuir la progresión de la enfermedad en aquellos pacientes portadores y con medidas neuroprotectoras, evitar que aparezcan nuevos casos.

Antecedentes

La enfermedad de Parkinson es el segundo padecimiento neurodegenerativo, detrás de la enfermedad de Alzheimer (EA), y es el primero con desórdenes de movimiento. Con una prevalencia que aumenta con la edad y afecta alrededor del 1% de la población mayor de 65 años, los pacientes con EP exhiben los síntomas clínicos clásicos que incluyen bradicinesia, temblor en reposo, rigidez e inestabilidad postural.¹ Mientras que la población normal tiene una pérdida de alrededor del 4.4% de células de la sustancia nigra, los pacientes con la EP tienen una pérdida 10 veces mayor,² la pérdida del 70-90% de neuronas dopaminérgicas (DA) de la sustancia nigra pars compacta (SNC) y la presencia de inclusiones intracitoplásmicas conocidas como cuerpos de Lewy en algunas de las neuronas dopaminérgicas restantes son patognomónicos de EP.³ El 90% de la EP es de tipo esporádico y en el 10% restante se encuentran mutaciones en diferentes genes que causan la EP familiar. Al inicio de los síntomas, la dopamina en el estriado ha disminuido un 80% y el 60% de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas de la pars compacta se han perdido (Figura 1). La neurodegeneración y los cuerpos de Lewy también se encuentran en las neuronas noradrenérgicas del locus ceruleus, serotoninérgicas del rafe y colinérgicas del núcleo basal de Meynert y del motor dorsal del vago, así como en la corteza cerebral (especialmente en el cíngulo y la corteza entorrinal), bulbo olfatorio y el sistema nervioso autónomo.^{4,5}

Daño oxidativo y disfunción mitocondrial

Todos los organismos aeróbicos se encuentran continuamente expuestos al estrés oxidativo.⁶ La fosforilación oxidativa conlleva la transferencia de electrones, la cual puede provocar la generación de radicales libres (RL), independientemente de las especies existentes que tienen uno o más electrones no apareados.

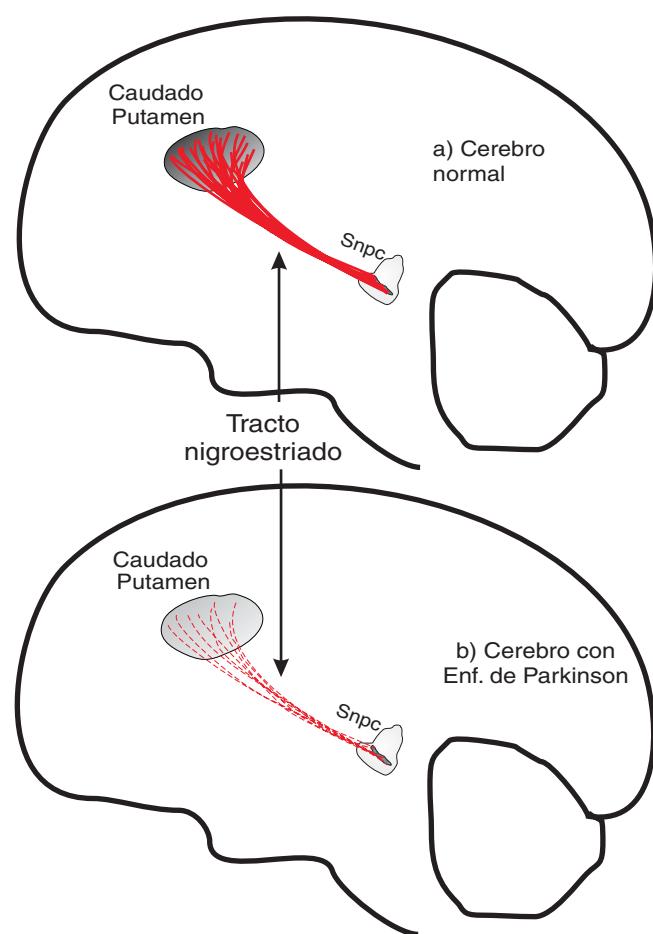


Figura 1. Muerte neuronal en la enfermedad de Parkinson. **a)** Tracto nigroestriado normal, las neuronas dopaminérgicas se localizan en la sustancia nigra pars compacta (SNC) y envían sus proyecciones a los ganglios basales y hacen sinapsis en el estriado (núcleos caudado y putamen) **b)** Esquema que muestra el tracto nigroestriado de un paciente con la enfermedad de Parkinson; la vía nigroestriatal se degenera, con una pérdida acentuada de neuronas dopaminérgicas que se proyectan al putamen y una menor pérdida de las neuronas dopaminérgicas que proyectan al caudado. Hay despigmentación en la SNC debido a la marcada pérdida de neuronas dopaminérgicas. En un paciente sintomático se encuentra una disminución del 60 al 80% de neuronas dopaminérgicas en la SNC.

Muchos RL son especies reactivas inestables que pueden extraer un electrón de las moléculas vecinas para completar su propio orbital. Esto provoca la oxidación de las moléculas vecinas, moléculas biológicas críticas que incluyen al ADN, proteínas y lípidos de la membrana, son sujetos de daño oxidativo.

La mitocondria es la fuente más importante de RL, generando radicales superóxido a partir de ubi-quinona y NADH deshidrogenasa (complejo I).⁷ Las mitocondrias son organelos cuya membrana interna y matriz contienen una multitud de enzimas y esta última contiene copias de un genoma mitocondrial distinto, el mtADN. El superóxido producido en las células por las reacciones oxidativas es normalmente convertido a H_2O_2 , por la superóxido dismutasa (SOD). Este superóxido puede reaccionar con el óxido nítrico para formar peroxinitrito ($ONOO^-$),⁸ reacción que ocurre con una velocidad tres veces mayor al rango de superóxido dismutación por la peróxido dismutasa. La generación de peroxinitrito depende de la concentración de superóxido y de óxido nítrico en la célula y puede existir en una forma activa parecida al radical hidróxilo. A pH fisiológico puede difundir a través de muchos diámetros celulares, causando daño por oxidación de lípidos, proteínas y ADN. También puede reaccionar con Cu/Zn-SOD para formar el ion nitronium, el cual puede nitrar residuos

de tirosina.⁹ La 3-nitrotirosina así generada es un excelente marcador bioquímico de daño oxidativo mediado por peroxinitrito.

Se han encontrado de forma consistente en los pacientes con EP un decremento en los niveles del antioxidante glutatión. Se ha podido determinar que esta baja posiblemente es debida a su sobreutilización en las reacciones de estrés oxidativo y que podría tener una gran participación en la degeneración *nigra* de todos los desórdenes con deficiencia de dopamina nigroestriatal, tales como la parálisis supranuclear progresiva y la atrofia sistémica múltiple.¹⁰

Evidencia reciente sugiere que la inhibición del complejo I mitocondrial puede ser la causa central de los casos de EP esporádica y que esta inhibición causa la agregación de la α sinucleína, lo cual contribuye a la muerte de las neuronas DA. Esta anormalidad enzimática sólo se encuentra en la sustancia *nigra pars compacta* que provoca un decremento de la actividad de la cadena respiratoria. Hasta el momento no se ha identificado una anormalidad genética del genoma nuclear, mitocondrial, una endo o exotoxina que explique la incidencia de los casos en la EP esporádica (Figura 2). A pesar de esto, el incremento de la incidencia de EP con la edad se liga al hecho de que el envejecimiento provoca delecciones por encima del 5% de todas las moléculas genómicas mitocondriales en

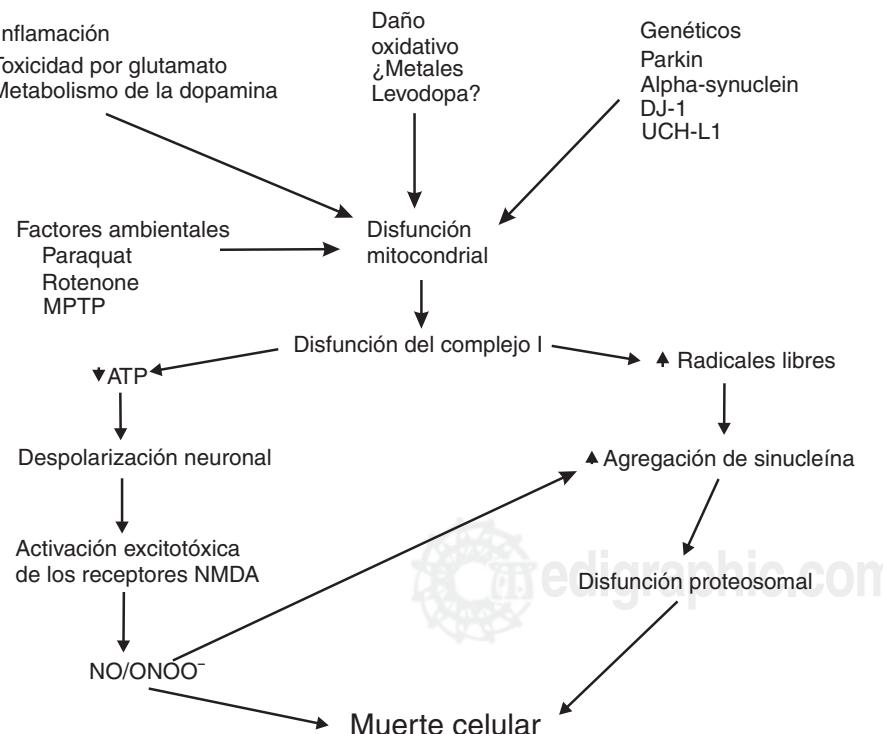


Figura 2. La alteración del complejo I como causa central de la enfermedad de Parkinson esporádica. La disfunción del complejo I incrementa el estrés oxidativo, la formación de radicales libres y la reducción de la formación del ATP. Esta disfunción puede ser multifactorial y puede presentarse en otras enfermedades que contribuyen a la disfunción. Esto permite la agregación de sinucleína con la alteración de los proteosomas y contribuye a la muerte neuronal. Este mismo estado puede ser inducido por factores ambientales e inflamación crónica. La disminución de ATP produce despolarización de la membrana y contribuye al daño excitotóxico y por radicales libres como el peroxinitrito ($ONOO^-$) y el óxido nítrico (NO). Las causas genéticas que alteran el sistema proteosómico también causan EP.

el cerebro.¹¹ Muchas de las rutas conocidas de muerte neuronal se encuentran involucradas con el complejo I: excitotoxicidad, especies reactivas de oxígeno, apoptosis dependiente e independiente de caspasas, necrosis y daño por inflamación. Las observaciones sugieren que la inhibición del complejo I crea un me-

dio ambiente oxidativo que provoca la agregación de la α sinucleína, con la subsecuente muerte de neuronas DA. La evidencia bioquímica de los defectos en el complejo I de la cadena respiratoria en la sustancia nigra de pacientes con EP,^{12,13} junto con los hallazgos de que la potente toxina 1-fenil-4-metil-1,2,3,4-tetrahi-

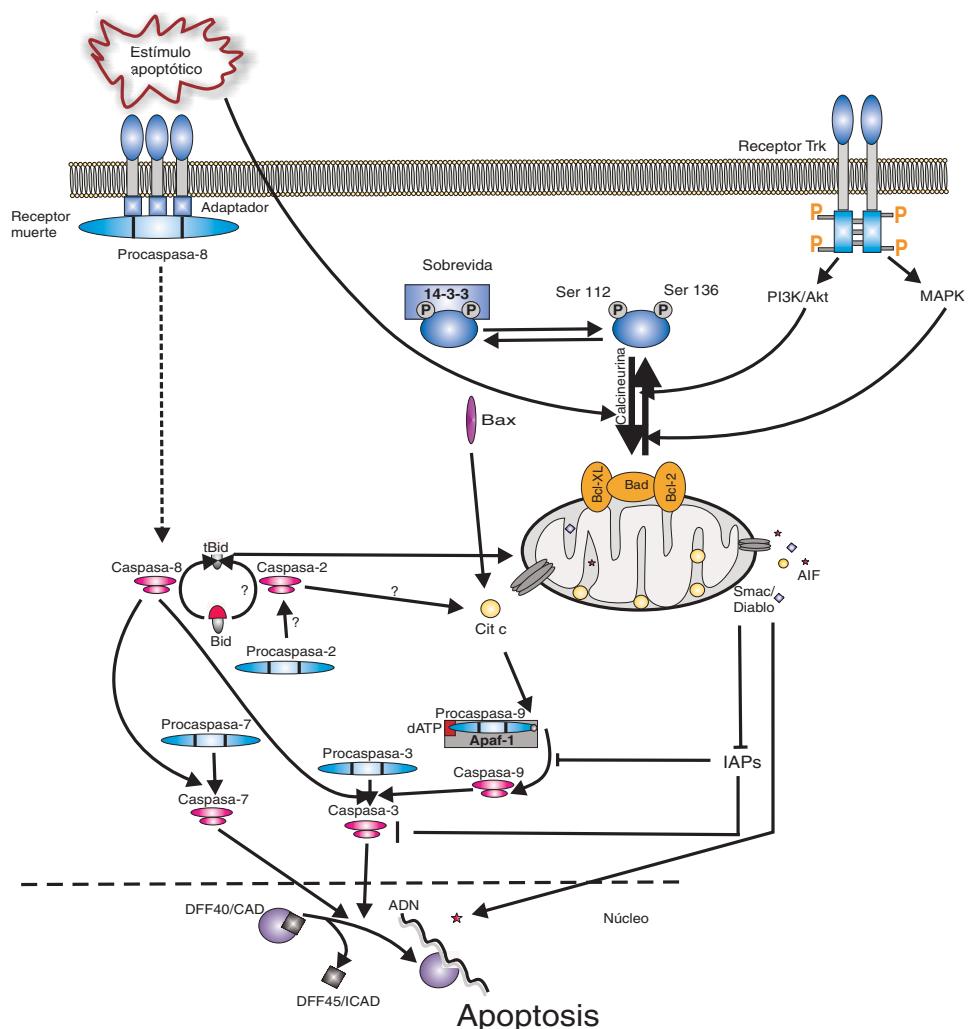


Figura 3. Receptor de muerte celular y rutas mitocondriales apoptóticas. Ligandos externos activan al receptor de muerte y actúan a la caspasa-8 la cual activa a su vez a tBid, traslocando a la mitocondria donde induce la liberación del citocromo c (cit c) al citosol. La activación de la caspasa-2 puede inducir también la activación de Bid y la señalización hacia la mitocondria para que libere cit-c, implicando a la mitocondria como un amplificador de la cascada de activación de las caspasas. Dentro del citosol, el cit-c forma apoptosomas (en presencia de Apaf-1, dATP y procaspasa-9) activando la caspasa-9. El efector caspasa -3 y -7, que pueden ser activados por las caspasas -8 ó -9, se requieren para que se active la endonucleasa DFF40/CAD, responsable de la fragmentación genómica del ADN. Además, Smac/Diablo (liberado por la mitocondria) se une a IAPs, potenciando la activación de las caspasas. AIF es también liberado al citosol y trasloca al núcleo, induciendo la fragmentación del ADN y matando a las células de una manera independiente a las caspasas. En presencia de un estímulo apoptótico (e. Ca^{2+} -calmodulin), calcineurina desfosforila a Bad, el cual trasloca a la mitocondria e interactúa con Bcl-2 o BclXL, liberando el citocromo c (cit-c) al citosol. La activación de los receptores para neurotropinas (receptores Trk) activa a PI3K/Akt o MAPK, responsable de la fosforilación de Bad. Bad fosforilado en Ser112 y Ser136, es secuestrado por la proteína citosólica 14-3-3, evitando la traslocación a la mitocondria.

dropiridina (MPTP) causa parkinsonismo agudo,^{14,15} realzan la posibilidad de que factores mitocondriales contribuyen en la patogénesis de EP. Estudios de trasplante genómico han mostrado que el defecto en el complejo I es determinado por el ADN mitocondrial.¹⁶⁻¹⁸ Si este defecto es causado por mutaciones en el ADN mitocondrial o si el polimorfismo funcional deja a la célula susceptible al daño por agentes externos, es desconocido.

Por su parte, la acumulación y agregación de la α sinucleína podría contribuir ampliamente en la muerte de las neuronas dopaminérgicas y oligodendroцитos debido al daño en el control de proteínas y la destoxicación.¹⁹⁻²¹ Estas inclusiones pueden causar daño celular al obstruir el tráfico celular normal y alterar la morfología, así como atrapar otros componentes celulares, lo que eventualmente provoca la muerte neuronal.²² Estudios *post mortem* en humanos indican que las especies reactivas de oxígeno son importantes en la patogénesis de la EP esporádica.^{23,24} El daño en el complejo I mitocondrial libera la actividad de estrés por RL y vuelve a las neuronas vulnerables a la excitotoxicidad por glutamato.

Efecto del medio ambiente y los factores genéticos asociados a la enfermedad de Parkinson.

Las alteraciones en los genes α sinucleína, Parkin y UCH-L1 (ubiquitin C-terminal hydrolase-L1), miembros del sistema ubiquitin-proteosomal, en pacientes con enfermedad de Parkinson sugieren que el daño de este sistema puede intervenir en la enfermedad.²⁵ El gen mutante de α sinucleína se encuentra involucrado en la patogénesis del EP autonómico dominante. Las delecciones en el gen Parkin han sido identificadas como la causa primaria en raras formas de EP juvenil autosómico recesivo.²⁶ Las proteínas que son ubiquitinizadas por este sistema, son reconocidas por el proteosoma subunidad 26S y son blanco de degradación.^{21,27-28} La alteración de este sistema modifica la capacidad de procesamiento de las proteínas, causando la agregación anormal y contribuye a su acumulación en los cuerpos de Lewy. La DJ-1 es una proteína de función desconocida que se encuentra alterada en algunos casos de EP autosómico recesivo.²⁹

Estudios epidemiológicos sugieren que agentes tóxicos ambientales que inhiben al complejo I también se encuentran involucrados en la EP; el MPTP, el paraquat y la rotenona, son un ejemplo de ello.³⁰⁻³³ La exposición al herbicida paraquat ha sido implicada como un factor de riesgo para la EP. El mecanismo exacto aún se desconoce, pero al parecer induce una

fosforilación secuencial de la cinasa *c-jun* N-terminal (JNK) y de *c-jun*, la activación de la caspasa-3 y provoca la muerte secuencial de neuronas dopaminérgicas tanto *in vivo* como *in vitro*.³⁴ La rotenona, otro herbicida, es también capaz de provocar EP. Aunque los estudios epidemiológicos sugieren un papel importante a los pesticidas en la patogénesis de la enfermedad, es claro que existe una predisposición genética particular, potencialmente asociada a la forma como el organismo es capaz de metabolizar neurotoxinas relacionadas a la dopamina.³⁵

Dopamina e inflamación

El metabolismo de la dopamina por sí mismo es fuente de producción de óxido, radicales tóxicos por la auto-oxidación y oxidación enzimática, un mecanismo muy relacionado con la toxicidad a la 6-hidroxidopamina. Actualmente se ha propuesto la hipótesis de que los productos intermedios de dopamina, quinona/semiquinona reactivos químicamente, son altamente neurotóxicos y potencialmente genotóxicos. Esta es una consideración muy importante que sugiere que el tratamiento con levodopa acelera la progresión de la EP. Actualmente, se desarrollan terapias experimentales con inhibidores de la monoaminoxidasa.³⁶⁻³⁷

La biosíntesis de catecolaminas es regulada por la tirosinahidroxilasa (TH), la actividad de esta enzima es regulada a su vez por la concentración del cofactor tetrahidrobiopterrina (BH4), cuyo nivel es regulado a su vez, por la actividad de la GTP ciclohidrolasa I (GCH), así, la actividad de GCH indirectamente regula la actividad de los niveles de catecolaminas. La actividad de la TH en las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales es más sensible a un decremento en la BH4 y la mutación de GCH resulta en una reducción de la actividad de la GCH, de BH4, TH y dopamina, causando una deficiencia de GCH heredada de forma recesiva o una distonía progresiva heredada de forma dominante, que también es llamada distonía responsive a dopa; sin embargo, en los pacientes con EP y EP juvenil parece no estar alterada esta vía.³⁸

El área del cerebro donde se encuentra la sustancia *nigra* muestra una gran densidad de microglia. Cuando ésta es activada, incrementa la expresión de marcadores de superficie celular tales como el antígeno de macrófagos (Mac-1) y ellos producen una variedad de citocinas proinflamatorias, así como la producción de especies reactivas de oxígeno.³⁹ Un número de citocinas, incluyendo interleucina-1 (IL-1), IL-6 y el factor de necrosis tumoral (FNT)- α contribuyen a los procesos inflamatorios.⁴⁰ Estudios re-

cientes han mostrado que el FNT- α se encuentra incrementado 366% en el estriado y 432% en el fluido cerebroespinal de pacientes con EP.^{38,41-43} Algunos estudios sugieren que la intensa reacción glial secundaria a la lesión por MPTP no se correlaciona directamente con la intensidad de la neurodegeneración.⁴⁴ La ruta inflamatoria de la ciclooxygenasa 2 (COX-2) ha sido implicada en la neurodegeneración. La COX-2 es expresada y regulada en las células gliales por citocinas y lipopolisacáridos catalizando la formación de prostaglandinas, que promueven la reducción de los niveles de hidroperóxido, resultando en la generación de RL,⁴⁵ sin embargo, cuando se presentan lesiones excitotóxicas, excitación sináptica, muerte neuronal por apoptosis e isquemia cerebral, la COX-2 es expresada principalmente en neuronas.⁴⁶⁻⁵¹

Citotoxicidad por glutamato

Existe evidencia indirecta que sugiere la participación de mecanismos glutamatérgicos en la patogénesis de esta enfermedad. El glutamato, el mayor neurotransmisor excitador en el sistema nervioso central de vertebrados, es conocido por tener actividad neurotóxica cuando se encuentra presente en exceso en las sinapsis. Dos mecanismos generales protegen a las neuronas de esta toxicidad: el primero es una rápida remoción por parte de proteínas de membrana que lo acarrean, conocidas como transportadoras de aminoácidos excitatorios (EAAT) y el segundo es por el metabolismo y reciclaje del glutamato por astrocitos sinápticos vía glutamina sintetasa, una reacción que requiere de ATP. Cuando los niveles extracelulares de glutamato son altos (0.5-1.0 mM), el metabolismo del glutamato sufre un cambio y entra al ciclo de desaminación oxidativa generadora de ATP, en la que participa la glutamatodeshidrogenasa. Esta enzima requiere de ADP para su actividad y comienza a ser funcional cuando los niveles de energía celular se encuentran bajos. Se ha observado que uno de los transportadores de glutamato, el EAAT3 específico de neuronas, se encuentra en altas concentraciones en las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas. Mediante estudios por inmunocitoquímica se ha encontrado que las neuronas dopaminérgicas se tiñen de forma intensa para la enzima glutamatodeshidrogenasa. Estos datos apuntan a que el glutamato pudiera tener algún papel en la fisiopatología de la EP, aún faltan más estudios para determinar el papel exacto que juega en esta patología.⁵² Actualmente se sabe que la exposición de las neuronas al glutamato provoca una despolarización mitocondrial asociada a

un incremento del influjo de Ca²⁺ dentro de la mitocondria. También se sabe que la actividad de los receptores a glutamato, los NMDA, inducen un rápido influjo de Ca²⁺ mitocondrial, disminución del consumo de O₂ e inhibición de la actividad de los complejos I, II/III y IV de la cadena respiratoria.⁵³

Papel de los metales en la enfermedad de Parkinson

La actividad de la superoxidodismutasa (Mn-SOD y/o Cu/Zn-SOD) controla los niveles de ion superóxido (O₂^{-•}), produciendo peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Aunque el H₂O₂ no es muy reactivo, si se encuentra con Fe²⁺ o Cu⁺, forma un radical hidróxilo (OH[•]) altamente reactivo y de corta vida por medio de la reacción de Fenton-Haber Weiss.⁵⁴ La peroxidación de los lípidos de la membrana y la modificación oxidativa de varias proteínas de membrana y asociadas a ella, ocurren en las enfermedades neurodegenerativas. El estrés oxidativo asociado a la membrana es promovido por metales con actividad redox, más notablemente el hierro y el cobre. Los niveles de hierro están incrementados en poblaciones neuronales vulnerables en la EA y EP. Las manipulaciones dietéticas y farmacológicas del hierro y cobre modifican el curso de la enfermedad en modelos de EA y EP en ratones, por lo que esto sugiere un papel de estos metales en la patogénesis de la enfermedad.⁵⁵ El incremento del contenido de hierro en la sustancia nigra de humanos y neuromelanina en presencia de hierro, juegan un papel importante en la generación de RL.⁵⁶ El desferol, un quelante de hierro, ha demostrado ser un potente agente neuroprotector en modelos de EP con 6-hidroxidopamina.⁵⁷

Metil-fenil-tetrahidropiridina (MPTP) y su relación con la enfermedad de Parkinson

Mucho del interés actual en la asociación entre neurodegeneración y disfunción mitocondrial por disfunción/daño oxidativo provienen de los estudios realizados con el parkinsonismo inducido por el MPTP, alteración mitocondrial que también ocurre en la EP. El MPTP, agente identificado como causante de EP en humanos y actualmente utilizado en investigación para inducir EP, inhibe el complejo I mitocondrial y replica muchas de las características del EP esporádico.⁵⁸⁻⁵⁹ La primera indicación de esta disfunción proviene de las observaciones de que los humanos que son expuestos a la molécula MPTP, desarrollan un fenotipo de EP. Más tarde fue demostrado que el MPTP sigue una conversión a un deri-

vado, el 1-metil-4-fenilpiridina (MPP+), por una monoaminaoxidasa en las células gliales. El MPP+ es tomado por las células que procesan dopamina hacia los sitios de recaptura y concentrada ampliamente dentro de las matrices mitocondriales cargadas negativamente. Dentro de la mitocondria, el MPP+ inhibe el complejo enzimático I de la cadena de transporte de electrones (ETC), lo cual causa una degeneración específica de las neuronas catecolaminérgicas en la sustancia *nigra* y el locus *ceruleus*, reduciendo la producción de ATP en las mitocondrias.⁶⁰ Esta reacción resulta en toda una gama de alteraciones clínicas e histopatológicas reminiscentes de la EP esporádica.⁶¹⁻⁶³

Se ha encontrado que existe un decremento de alrededor del 30 al 40% en la actividad del complejo I en la sustancia *nigra* de pacientes con EP.⁶⁴⁻⁶⁸ Defectos localizados en el ADN mitocondrial para el complejo I de plaquetas de pacientes con EP, son transferibles a líneas celulares carentes de mitocondrias. Estos defectos son asociados con la producción de RL, incremento a la susceptibilidad al MPP+ y daño al almacén mitocondrial de calcio.

Relativamente tarde en el proceso de apoptosis, la activación de las endonucleasas da como resultado la fragmentación del ADN celular, evidente en electroforesis en geles de agarosa como un barrido de ADN de aproximadamente 180 pares de bases.⁶⁹ Específicamente, los extremos terminales 3'OH resultantes de la fragmentación del ADN pueden ser detectados con la técnica de TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-X 3' nick end-labeling*). *In vivo*, el núcleo apoptótico fue detectado en ratones después de 5 días de tratamiento con MPTP (5x30 mg/kg),⁷⁰ mientras que no pudo ser detectado después de un día de régimen de exposición con MPTP.⁷¹

El desarrollo de un inadecuado metabolismo mitocondrial puede alterar una gran variedad de procesos celulares y mecanismos homeostáticos. La falla del transporte de electrones en la ETC puede dar por resultado la depleción de ATP, formación de especies reactivas de oxígeno o RL, salida de calcio con despolarización mitocondrial y formación de poros de transición con canales a través de las dos membranas de la mitocondria. El poro de transición mitocondrial provee un paso citoplasmico a moléculas que usualmente se concentran dentro de la mitocondria, como el citocromo C. Éste puede activar las cascadas de señalización de la muerte celular programada mediante su contribución en la activación de cisteínas, en la vía enzimática secuestradora de aspartato (caspa-

sas).⁷² Las caspasas son una familia de proteasas de cisteína con un sustrato específico para el ácido aspártico. Se ha mostrado que hay activación de la caspasa-3 después de la aplicación de MPP+ en neuronas del cerebelo⁷³⁻⁷⁴ o después de la administración de MPTP *in vivo*.⁷⁵ La activación de esta cascada enzimática resulta en la autodigestión del contenido celular (*Figura 3*).^{14,76}

El papel de las neurocininas en la enfermedad de Parkinson

Las neurocininas en los mamíferos son un grupo de neuropéptidos que incluyen a la sustancia P (neurocinina-1, NK-1), sustancia K (NK-2) y la neuromedina (NK-3). Sus efectos biológicos como neurotransmisores, neuromoduladores o factores parecidos a moléculas neurotróficas son mediados por tres distintos receptores a neurocininas llamados: receptor a SP (NK-1R), NK-2R y NK-3R. Varias líneas de investigación han mostrado que las neurocininas se encuentran involucradas en la patogénesis de la EP. El decremento de los niveles de sustancia P y de la inmunorreactividad a la sustancia P que ha sido encontrada en los tejidos de la sustancia *nigra* y el estriado de animales con Parkinson también se encontró en análisis *post mortem* de pacientes con EP. Las neurocininas ejercen un efecto protector sobre las neuronas y los receptores a las neurocininas 1 y 3 se encuentran de forma abundante en neuronas colinérgicas y dopaminérgicas de los ganglios basales, indicando que estas neuronas se encuentran bajo regulación fisiológica de las neurocininas. La administración de agonistas de los receptores NKs en modelos de Parkinson en ratones tratados con MPTP, crea una modulación en la actividad motora. Éstas constituyen moléculas que se encuentran asociadas al funcionamiento y sobrevida de neuronas de los ganglios basales, en particular de las neuronas dopaminérgicas.⁷⁷

Terapias de neuroprotección y restauración

Actualmente se está estudiando el desarrollo de estrategias terapéuticas efectivas que pudieran ejercer efectos protectores contra el deterioro y muerte de las neuronas DA.⁷⁸⁻⁷⁹ Es muy importante comprender que, para poder desarrollar tratamientos de neuroprotección, se debe diagnosticar de forma muy temprana a los sujetos enfermos. Así, la terapia de neuroprotección podría tener un beneficio particular en pacientes preclínicos o en estudios muy tempranos

de la enfermedad. Las imágenes de la tomografía por emisión de positrones (PET) y la tomografía por emisión de fotones simple (SPECT) es una herramienta útil en el diagnóstico preclínico de la enfermedad, pero su uso como método de detección en la población, no es posible. Recientemente se han desarrollado técnicas de investigación utilizando estos modernos métodos de imagen para seguir el comportamiento de células implantadas en modelos de trasplantes. En este sentido, se están creando grupos de estudio de pacientes con síntomas tempranos asociados al EP, alteraciones olfativas, disfunción neurocognitiva sutil, anormalidades del control visuomotor y en menor grado, desórdenes de personalidad y de humor, que han sido sugeridos como marcadores que preceden o acompañan las alteraciones iniciales de la enfermedad.⁸⁰⁻⁸³

¿El tratamiento con levodopa promueve la lesión?

Estudios de oxidación en pacientes con EP sugieren la influencia del tratamiento con levodopa (LD) como un tratamiento con un efecto pro-oxidativo. Numerosos estudios *in vitro* han mostrado un incremento en la oxidación y subsecuente neurotoxicidad secundaria al tratamiento con LD. El metabolismo de la dopamina y LD catalizados por la MAO-B produce RL tóxicos⁸⁴ que *in vitro* pueden iniciar la disrupción de la membrana celular por peroxidación lipídica⁸⁵⁻⁸⁶ y promover la muerte de neuronas dopaminérgicas y de otras neuronas en cultivos *in vitro*.⁸⁷⁻⁹⁰ Debido a estos mecanismos, la LD podría ser tóxica para las neuronas dopaminérgicas y acelerar la neurodegeneración en la EP.^{88,91,92} Al presentarse altos niveles de estrés oxidativo, se ha observado incremento de la oxidación de lipoproteínas en plasma y en líquido cerebroespinal, decremento de los niveles plasmáticos de grupos proteína-sulfhidrilo y bajos niveles de α -tocopherol en líquido cerebroespinal de pacientes con la EP comparados con pacientes con otras enfermedades neurológicas y con los controles. El tratamiento con LD no cambia de forma significativa la oxidación de lipoproteínas en plasma, pero sí incrementa la auto-oxidación y disminuye los niveles de antioxidantes plasmáticos, con mayor significancia para el ubiquinol-10, efecto que no se vio cuando se utilizaron agonistas de dopamina. Existen otros estudios en los que la LD no parece acelerar la enfermedad.^{93,94} Aún son necesarios más estudios al respecto para poder determinar la influencia real que el tratamiento con levodopa ejerce sobre las neuronas dopaminérgicas.

Terapias antioxidantes

El ubiquinol-10 es la forma reducida de la coenzima Q10 y actúa como antioxidante, siendo oxidada a ubiquinona-10. La coenzima Q10 ha sido reportada sin cambios⁹⁵ o reducida⁹⁶ en pacientes con EP. En otro estudio la relación entre ubiquinol-10 y ubiquinol-10/coenzima Q fue menor en pacientes con EP sin tratamiento con LD. Esto podría implicar un déficit de ubiquinol-10 en pacientes con PD tratados con LD. Estos datos proveen las bases para dar una terapia de suplementación con Q10 en pacientes que reciban tratamiento con LD.⁹³ Estudios recientes muestran que no existe una correlación entre los valores de la coenzima Q10 sérica y el riesgo para la EP.^{95,97}

Se han usado otros antioxidantes como el adenín-dinucleótido de nicotinamida (forma reducida, NADH) que es necesario para la generación de ATP por la mitocondria con resultados parciales. La administración de glutatión no ha reportado buenos resultados debido a la hidrólisis completa que sufre el compuesto en el tracto gastrointestinal; recientemente se han desarrollado estudios con la melatonina, la cual es producida principalmente por la glándula pineal, debido a su potente actividad antioxidante endógena.⁹⁸⁻¹⁰⁰

Terapias no dopaminérgicas

Recientemente se reportó que el dextrometorfán (DM), un agente antitusivo usado ampliamente, atenúa *in vitro* la neurodegeneración dopaminérgica inducida por una endotoxina. En cultivos mesencefálicos sometidos a tratamiento con MPTP, el DM reduce de forma significativa tanto la producción de radicales superóxido en el medio extracelular como a las especies reactivas de oxígeno intracelulares. El efecto neuroprotector del DM fue observado en animales silvestres, pero no en animales mutantes deficientes en NADPH oxidasa, indicando que esta enzima es un mediador crítico para la actividad neuroprotectora del DM.^{101,102}

Otro agente utilizado es la bupidina, un antagonista de los receptores A2 de adenosina. Este medicamento incrementa experimentalmente los niveles cerebrales de noradrenalina, dopamina, serotonina e histamina, sin afectar la afinidad de los receptores a dopamina, serotonina, noradrenalina, ácido gamma-aminobutírico y endorfinas, pero incrementa la afinidad del receptor por receptores NMDA y sigma.¹⁰³ Recientemente se encontró un incremento en la síntesis de los receptores a adenosina A2A en las neuronas del sistema estriato-pálido, cambio que se encuentra

asociado con el inicio de disquinesias después de una terapia de largo plazo con levodopa.¹⁰⁴

El modafinil, medicamento usado en alteraciones del sueño ha mostrado tener un efecto protector contra los efectos nocivos causados por la administración de MPTP. Inhibe preferentemente la liberación de GABA en el estriado y previene el decremento de dopamina, serotonina y noradrenalina en el estriado y los niveles de glutatión y GABA en la sustancia *nigra*. Parte de este efecto protector se debe a la modulación nigroestriatal de GABA y la modulación de la liberación de noradrenalina y serotonina en el estriado.¹⁰⁵

El MPTP induce apoptosis a través de muchas vías de señalización, una de ellas es a través de la cinasa *c-jun* N-terminal. Actualmente se está investigando un bloqueador llamado SP600125, un inhibidor reversible que compite con el ATP para unirse a la cinasa y que tiene gran selectividad por JNK.¹⁰⁶

Terapias con antiinflamatorios

Otra terapia en investigación es el uso de agentes antiinflamatorios,³⁸ de los cuales el meloxicam, un inhibidor de la COX2, ha dado buenos resultados en animales^{40, 107} aunque en humanos los resultados no han sido satisfactorios.¹⁰⁸ Esto podría indicar que los modelos experimentales no reflejan exactamente los procesos neurodegenerativos o que la muerte neuronal conlleva toda una cascada de procesos que no son resueltos por una sola terapia.

Factores neurotróficos y terapias restaurativas

Los factores neurotróficos en virtud de sus propiedades de neuroprotección, muestran un gran potencial como agentes terapéuticos en enfermedades neurodegenerativas. El factor neurotrófico derivado de las células gliales (GDNF) es uno de los agentes promotores más potentes de supervivencia para las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas;^{109,110} también el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y el factor derivado de las células gliales tienen efectos similares.^{111,112} La cascada de señalización intracelular es mediada por un sistema de receptor multicomponente que comprende el GDNF α (componente α del receptor de la familia GDNF) y el receptor tirosina cinasa, los cuales son abundantes en la sustancia *nigra*.¹¹³ La administración directa dentro de la sustancia *nigra* produce una restauración funcional y bioquímica parcial después del tratamiento con MPTP.¹¹⁴⁻¹¹⁶ Dependiendo del diseño experimental, el GDNF tiene efectos neuroprotectores y restaurativos.^{117,118}

El BDNF promueve la sobrevida de todos los tipos mayores de neuronas afectados en la AD y la EP como las neuronas hipocampales, neocorticales, colinérgicas septales, neuronas basales del cerebro anterior y neuronas dopaminérgicas de la sustancia *nigra*.¹¹⁹

Terapias con vitaminas antioxidantes

Debido a que el estrés oxidativo es un importante mecanismo de muerte celular en la EP, las vitaminas C, E y A, valiosos agentes antioxidantes, se han asociado con los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad. La determinación de estas vitaminas en grupos de pacientes con la EP mostró que los niveles son similares a los encontrados en pacientes sanos.¹²⁰ En estudios de suplementación con vitamina E, se ha observado que se pueden proteger del daño estriatal causado por la 6-hidroxidopamina.¹²¹ Estudios *in vitro* han mostrado que la vitamina E protege a las neuronas contra los efectos neurotóxicos causados por el glutamato.¹²² La suplementación con vitamina E y C incrementa los intervalos de dosificación de levodopa.¹²³

Se han sugerido las dietas balanceadas que contengan cantidades adecuadas de frutas, vegetales junto con suplementos de S-adenosín metionina, vitaminas C, B6, B12 y folato.^{36,123} En un estudio realizado por VanItallie y Nufert (2003),¹²⁴ se sugiere el uso de una dieta hipercetogénica, debido a que las cetonas son usadas en forma eficiente por la mitocondria para la generación de ATP y podría ayudar a proteger a las neuronas vulnerables del daño inducido por RL.

Se sabe que el líquido cefalorraquídeo de pacientes con EP tiene niveles bajos de tiamina libre.¹²⁵ La co-carboxilasa o pirofosfato de tiamina (PPT) es una coenzima derivada de la tiamina que se encuentra involucrada en la mayoría de los procesos respiratorios y reacciones del metabolismo intermedio de las células;¹²⁶ y se ha comprobado que se encuentra en complejos multienzimáticos y participa en la piruvato descarboxilasa, transcetolasa, α -oxoácido descarboxilasa, citocromos, acetolacetato sintetasa y transcetolasa.^{127,128} Otro aspecto en el cual interviene el PPT, es en la síntesis del ATP, por lo que su deficiencia ocasiona la inhibición del metabolismo energético¹²⁹⁻¹³¹ así como daño por hipoxia.^{132,133} Debido a sus efectos en la reducción del metabolismo anaerobio y la disminución de la formación de RL, la administración del PPT podría disminuir los eventos fisiopatológicos que promueven la lesión de la sustancia *nigra*.

Finalmente, la enfermedad de Parkinson no parece ser una entidad patológica causada por un solo factor patogénico, característicamente no todos los sistemas

dopaminérgicos del sistema nervioso central se encuentran afectados, pero sí lo están partes de otros sistemas que involucran a diferentes neurotransmisores.

La combinación de terapias antiapoptóticas junto con terapias de restauración parecen ser prometedoras. De forma interesante en los humanos, la fase subclínica puede durar alrededor de 5 años antes del inicio de los síntomas, según análisis funcionales de imágenes y estudios patológicos. Los cambios en la terapéutica deben de encaminarse a la identificación de estadios subclínicos o de los síntomas iniciales y un inicio temprano de la terapia. Es probable que el mejor tratamiento sea una combinación de los anteriores expuestos.

REFERENCIAS

1. Gelb D, Oliver E, Gilman S. Diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Arch Neurol* 1999; 56: 33-39.
2. Dunnett S, Björklund A. Prospects for new restorative and neuroprotective treatments in Parkinson's disease. *Nature* 1999; 399 s1: A32-A39.
3. Forno L. Neuropathology of Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996; 55: 259-272.
4. Uhl G, Hedreen J, Price D. Parkinson's disease: loss of neurons from the ventral tegmental area contralateral to therapeutic surgical lesions. *Neurology* 1985; 35: 1215-1218.
5. Bryant P, Geis C, Moroz A, O'Nelly B, Bogey R. Stroke and neurodegenerative disorders. 4. Neurodegenerative disorders. *Arch Phys Med Rehabil* 2004; 85(S1): S21-S33.
6. Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* 1992; 59: 1609-1623.
7. Turrens J, Alexandre A, Lehninger A. Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 1985; 237: 408-414.
8. Beckman J, Crow J. Pathological implications of nitric oxide superoxide and peroxynitrite formation. *Biochem Soc Trans* 1993; 21: 330-334.
9. Ischiropoulos H, Zhu L, Chen J, Tsai M, Martin J, Smith C, et al. Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys* 1992; 298: 431-437.
10. Fitzmaurice P, Ang L, Guttman M, Rajput A, Furukawa Y, Kish S. Nigral glutathione deficiency is not specific for idiopathic Parkinson's disease. *Mov Disord* 2003; 18: 969-976.
11. Reichmann H, Janetzky B. Mitochondrial dysfunction – a pathogenetic factor in Parkinson's disease. *J Neurol* 2000; 247 S2: 1163-1168.
12. Schapira A, Cooper J, Dexter D, Jenner P, Clark J, Marsden C. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Lancet* 1989; 8649: 1269.
13. Arai H, Furuya T, Mizuno Y, Mochizuki H. Inflammation and infection in Parkinson's disease. *Histol Histopathol* 2006; 21: 673-678.
14. Langston J, Ballard P, Tetrud G, Irwin J. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of a meperidine-analog synthesis. *Science* 1983; 4587: 979-980.
15. Dauer W, Przedborski S. Parkinson's Disease: mechanisms and models. *Neuron* 2003; 39: 889-909.
16. Gu M, Cooper J, Taanman J, Schapira A. Mitochondrial DNA transmission of the mitochondrial defect in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1998; 44: 177-186.
17. Swerdlow R, Parks J, Miller S, Tuttle J, Trimmer P, Sheehan J, et al. Origin and functional consequences of the complex I defect in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1996; 40: 663-671.
18. Swerdlow R. Mitochondrial DNA-related mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Arch Pathol Lab Med* 2002; 126: 271-280.
19. Goedert M. Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 2001; 2: 492-501.
20. Dawson T, Mandir A, Lee M. Animals model of PD: pieces of the same puzzle? *Neuron* 2002; 35: 219-222.
21. Dawson T, Dawson V. Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. *Science* 2003; 302: 819-822.
22. Giasson B, Lee V. Are ubiquitination pathways central to Parkinson's disease? *Cell* 2003; 114: 1-8.
23. Jenner P, Olanow C. Understanding cell death in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1998; 44 s1: 572-584.
24. Zhang Y, Dawson V, Dawson T. Oxidative stress and genetics in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 2000; 7: 240-250.
25. Warner T, Schapira A. Genetic and environmental factors in the cause of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2003; 53 s3: S16-S25.
26. Riess O, Jakes R, Kruger R. Genetic dissection of familial Parkinson's disease. *Mol Med Today* 1998; 10: 438-444.
27. Fleming S, Fernagut P, Chesselet M. Genetic mouse models of parkinsonism: strengths and limitations. *NeuroRx* 2005; 2: 495-503.
28. Lim K, Dawson V, Dawson T. The cast of molecular characters in Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 991: 80-92.
29. Chung K, Dawson V, Dawson T. New insights into Parkinson's disease. *J Neurol* 2003; 250(S3): 15-24.
30. Manning-Bog A, McCormack A, Uversky V, Fink A, Di Monte D. The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation of alpha-synuclein in mice: paraquat and alpha synuclein. *J Biol Chem* 2002; 277: 1641-1644.
31. Sherer T, Betarbet J, Greenamyre J. Environment, mitochondrial and Parkinson's disease. *Neuroscientist* 2002; 8: 192-197.
32. Sherer T, Kim J, Betarbet J, Greenamyre J. Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and alpha-synuclein aggregation. *Exp Neurol* 2003; 179: 9-16.
33. Vila M, Przedborski S. Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. *Nature Rev Neurosci* 2003; 4: 365-375.
34. Peng J, Xo M, Stevenson F, Hsu M, Andersen J. The herbicide paraquat induces dopaminergic nigral apoptosis through sustained activation of the JNK pathway. *J Biol Chem* 2004; 279: 32626-32632.
35. Paolini M, Sapone A, González F. Parkinson's disease, pesticides and individual vulnerability. *Trends Pharmacol Sci* 2004; 25: 124-129.
36. Zhu B. CNS dopamine oxidation and catechol-O-methyltransferase importance in the etiology, pharmacotherapy, and dietary prevention of Parkinson's disease. *Int J Mol Med* 2004; 13: 343-353.

37. Henchcliffe C, Schumacher H, Burgut F. Recent advances in Parkinson's disease therapy: use of monoamine oxidase inhibitors. *Expert Rev Neurother* 2005; 5(6): 811-821.
38. Nagatsu T, Ichinose H. Molecular biology of catecholamine-related enzymes in relation to Parkinson's disease. *Cell Mol Neurobiol* 1999; 19: 5766.
39. Barcia C, Fernández Barreiro F, Poza M, Herrero M. Parkinson's disease and inflammatory changes. *Neurotox Res* 2003; 5: 411-418.
40. Hartmann A, Hunot S, Hirsch E. Inflammation and dopaminergic neuronal loss in Parkinson's disease: a complex matter. *Exp Neurol* 2003; 184: 561-564.
41. Boka G, Anglade P, Wallach D, Javoy-Agid F, Agid Y, Hirsch E. Immunocytochemical analysis of tumor necrosis factor and its receptors in Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 1994; 172: 151-154.
42. Mogi M, Harada M, Riederer P, Narabayashi H, Fujita K, Nagatsu T. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from Parkinsonism patients. *Neurosci Lett* 1994; 165: 208-210.
43. Hunot S, Dugas N, Faucheu B, Hartmann A, Jardieu M, Debre P, et al. Fc epsilonRII/CD23 is expressed in Parkinson's disease and induces *in vitro* production of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in glial cells. *J Neurosci* 1999; 19: 3440-3447.
44. Hurley S, O'Banion M, Song D, Arana F, Olschowka J, Haber S. Microglial response is poorly correlated with neurodegeneration following chronic, low dose MPTP administration in monkeys. *Exp Neurol* 2003; 184: 659-668.
45. Mirjany M, Ho L, Pasinetti G. Role of cyclooxygenase-2 in neuronal cell cycle activity and glutamate-mediated excitotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 301: 494-500.
46. Adams J, Collaco-Moraes Y, de Belleroche T. Cyclooxygenase-2 induction in cerebral cortex: an intracellular response to synaptic excitation. *J Neurochem* 1996; 66: 6-13.
47. Tocco G, Freirer-Moar S, Schreiber T, Sakhi S, Aisen P, Pasinetti G. Maturational regulation and regional induction of cyclooxygenase-2 in rat brain: implications for Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 1997; 144: 339-349.
48. Ho L, Osaka H, Aisen P, Pasinetti G. Induction of cyclooxygenase (COX)-2 but not COX-1 gene expression in apoptotic cell death. *J Neuroimmunol* 1998; 89: 142-149.
49. Planas A, Soriano M, Justicin C, Rodríguez-Farre E. Induction of cyclooxygenase-2 in the rat brain after a mild episode of focal ischemia without tissue inflammation or neural cell damage. *Neurosci Lett* 1999; 275: 141-144.
50. Wersinger C, Sidhu A. An inflammatory pathomechanism for Parkinson's disease? *Curr Med Chem* 2006; 13: 591-602.
51. Hald A, Lotharius J. Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: is there a causal link? *Exp Neurol* 2005; 193: 279-90.
52. Plaitakis A, Shashidharan P. Glutamate transport and metabolism in dopaminergic neurons of substantia nigra: implications for the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neurol* 2000; 247(S2): 1125-1135.
53. Rego A, Santos M, Oliveira C. Glutamate-mediated inhibition of oxidative phosphorylation in cultured retinal cells. *Neurochem Int* 2000; 36: 159-166.
54. Sugawara T, Noshita N, Lewén A, Gasche Y, Ferrand-Drake M, Fujimura M, et al. Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase in transgenic rats protects vulnerable neurons against ischemic damage by blocking the mitochondrial pathway of caspase activation. *J Neurosci* 2002; 22: 209-217.
55. Mattson M. Metal-catalyzed disruption of membrane protein and lipid signaling in the pathogenesis of neurodegenerative disorders. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1012: 37-50.
56. Grünblatt E, Mandel S, Berkuzki T, Youdim M. Apomorphine protects against MPTP-induced neurotoxicity in mice. *Mov Disord* 1999; 14: 612-618.
57. Youdim M, Stephenson G, Shachar D. Ironing iron out in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases with iron chelators. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1012: 306-325.
58. Beal M. Experimental models of Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci* 2001; 2: 325-334.
59. Bove J, Prou D, Perier C, Przedborski S. Toxin-induced models of Parkinson's disease. *NeuroRx* 2005; 2: 484-494.
60. Singer T, Castagnoli N, Ramsay R, Trevor A. Biochemical events in the development of parkinsonism induced by MPTP. *J Neurochem* 1987; 49: 1-8.
61. Zigmond M, Stricker E. Animal models of Parkinsonism using selective neurotoxins: clinical and basic implications. *Int Rev Neurobiol* 1989; 31: 1-79.
62. Beal M. Mitochondria, oxidative damage and inflammation in Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 991: 120-131.
63. Eberhardt O, Schulz J. Apoptotic mechanisms and anti-apoptotic therapy in the MPTP model of Parkinson's disease. *Toxicol Lett* 2003; 139: 135-151.
64. Bindoff L, Birch-Martin M, Cartlidge N, Parker W, Turnbull D. Mitochondrial function in Parkinson's disease. *Lancet* 1989; 1: 49.
65. Schapira A, Cooper J, Dexter D, Clark J, Jenner P, Marsden C. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem* 1990; 54: 823-827.
66. Mann V, Cooper J, Krige F, Daniel S, Schapira A, Marsden C. Brain, skeletal muscle and platelet homogenate mitochondrial function in Parkinson's disease. *Brain* 1992; 115: 333-342.
67. Janetzky B, Hauck S, Youdim M, Riederer P, Jellinger K, Pantuck F, et al. Unaltered aconitase activity, but decreased complex I activity in substantia nigra pars compacta of patients with Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 1994; 169: 126-128.
68. Klivenyi P, Andreassen O, Ferrante R, Lancelot E, Reif D, Beal M. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase protects against MPTP toxicity. *Neuroreport* 2000; 11: 1265-1268.
69. Hartley A, Stone J, Heron C, Cooper J, Schapira A. Complex I inhibitors induce dose-dependent apoptosis in PC12 cells: relevance to Parkinson's disease. *J Neurochem* 1994; 63: 1987-1990.
70. Tatton N, Nish S. In situ detection of apoptotic nuclei in the substantia nigra pars compacta of 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-treated mice using terminal deoxynucleotidyl transferase labeling and acridine orange staining. *Neuroscience* 1997; 77: 1037-1048.
71. Jackson-Lewis V, Jakowec M, Burke R, Przedborski S. Time course and morphology of dopaminergic neuronal death caused by the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Neurodegeneration* 1995; 4: 257-269.
72. Jordan J, Cena V, Prehn J. Mitochondrial control of neuron death and its role in neurodegenerative disorders. *J Physiol Biochem* 2003; 59: 129-141.
73. Du Y, Dodel R, Bales K, Jemmerson R, Hamilton-Byrd E, Paul S. Involvement of a caspase-3-like cysteine protease in 1-methyl-4-pyridinium-mediated apoptosis of cultured cerebellar granule neurons. *J Neurochem* 1997; 69: 1382-1388.
74. Robinson S, Freeman P, Moore C, Touchon J, Krentz L, Meshul C. Acute and subchronic MPTP administration di-

- fferentially affects striatal glutamate synaptic function. *Exp Neurol* 2003; 180: 73-86.
75. Eberhardt O, von Coellin R, Kügler S, Lindenau J, Rathke-Hartlieb S, Gerhardt E, et al. Protection by synergistic effects of adenovirus-mediated X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis and glial cell line-derived neurotrophic factor gene transfer in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 2000; 20: 9126-9134.
76. Rego A, Oliveira C. Mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species in excitotoxicity and apoptosis: implications for the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Neurochem Res* 2003; 28: 1563-1574.
77. Chen L, Yung K, Chan Y. Neurokinin peptides and neurokinin receptors as potential therapeutic intervention targets of basal ganglia in the prevention and treatment of Parkinson's disease. *Curr Drug Targets* 2004; 5: 197-206.
78. Schapira A, Olanow C. Neuroprotection in Parkinson's disease: mysteries, myths, and misconceptions. *JAMA* 2004; 291: 358-364.
79. Mandel S, Grunblatt E, Riederer P, Gerlach M, Levites Y, Yousdim M. Neuroprotective strategies in Parkinson's disease: an update on progress. *CNS Drugs* 2003; 17: 729-762.
80. Brooks D. Neuroimaging in Parkinson's disease. *J Am Soc Exp Neuro Ther* 2004; 1: 243-254.
81. Tapia-Núñez P, Chaná-Cuevas P. Diagnóstico de la enfermedad de Parkinson. *Rev Neurol* 2004; 38: 61-67.
82. Wolters E, Francot C, Bergmans P, Winogrodzka A, Booij J, Berendse H, et al. Preclinical (premotor) Parkinson's disease. *J Neurol* 2000; 247(S2): 11103-11109.
83. Acton P, Zhou R. Imaging reporter genes for cell tracking with PET and SPECT. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 2005; 49(4): 349-360.
84. Basma A, Morris E, Nicklas W, Seller H. L-dopa cytotoxicity to PC12 cells in culture is via its autoxidation. *J Neurochem* 1995; 64: 825-832.
85. Dexter D, Carter C, Wells F, Javoid-Agid F, Agid Y, Lees A, et al. Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. *J Neurochem* 1989; 52: 381-389.
86. Li C, Werner P, Cohen G. Lipid peroxidation in brain: interactions of L-dopa/dopamine with ascorbate and iron. *Neurodegeneration* 1995; 4: 147-153.
87. Tanaka M, Sotomatsu A, Kanai H, Hirai S. Dopa and dopamine cause cultured neuronal death in the presence of iron. *J Neurol Sci* 1991; 101: 198-203.
88. Ziv I, Jancovic J, Rowe D, Xie W, Appel S, Lee W. Neuroprotection by pramipexole against dopa. *Life Sci* 1999; 64: 1275-1285.
89. Jones D, Gunasekar P, Borowitz J, Isom G. Dopamine-induced apoptosis is mediated by oxidative stress and is enhanced by cyanide in differentiated PC12 cells. *J Neurochem* 2000; 74: 2296-2304.
90. Doggett S. Recent important trials of pharmacotherapy in Parkinson's disease. *Expert Opin Pharmacother* 2005; 6: 1025-1028.
91. Fahn S. Is levodopa toxic? *Neurology* 1996; 47: S184-S195.
92. Oh J, Chase T. Glutamate-mediated striatal dysregulation and the pathogenesis of motor response complications in Parkinson's disease. *Amino Acids* 2002; 23: 133-139.
93. Buhmann C, Arlt S, Kontush A, Möller-Bertram T, Sperber S, Oechsner M, et al. Plasma and CSF markers of oxidative stress are increased in Parkinson's disease and influenced by antiparkinsonian medication. *Neurobiol Dis* 2004; 15: 160-170.
94. Suchowersky O, Gronseth G, Perlmuter J, Reich S, Zewig T, Weiner W. Practice parameter: neuroprotective strategies and alternative therapies for Parkinson's disease (an evidence-based review). Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 2006; 66: 976-982.
95. Jiménez-Jiménez F, Molina J, de Bustos F, García-Redondo A, Gómez-Escamilla C, Martínez-Salio A, et al. Serum levels of coenzyme Q10 in patients with Parkinson's disease. *J Neural Transm* 2000; 107: 177-181.
96. Matsubara T, Azuma T, Yoshida S, Tamagami T. Serum coenzyme Q10 level in Parkinson syndrome. In: Folkers, K., eds. *Biochemical and clinical aspects of coenzyme Q*. Japón: Elsevier Science, 1991: 159-166.
97. Götz M, Gerstner A, Harth R, Dirr A, Janetzky B, Kuhn W, et al. Altered redox of state of platelet coenzyme Q10 in Parkinson's disease. *J Neural Transm* 2000; 107: 41-48.
98. Weber C, Ernst M. Antioxidants, supplements, and Parkinson's disease. *Ann Pharmacother* 2006; 40: 935-938.
99. Kedar N. Can we prevent Parkinson's and Alzheimer's disease? *J Postgrad Med* 2003; 49: 236-245.
100. Mayo J, Sainz R, Tan D, Antolin I, Rodriguez C, Reiter R. Melatonin and Parkinson's disease. *Endocrine* 2005; 27: 169-78.
101. Liu Y, Qin L, Li G, Zhang W, An L, Liu B, et al. Dextromethorphan protects dopaminergic neurons against inflammation-mediated degeneration through inhibition of microglial activation. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 305: 212-218.
102. Zhang W, Wang T, Qin L, Gao H, Wilson B, Ali S, et al. Neuroprotective effect of dextromethorphan in the MPTP Parkinson's disease model: role of NADPH oxidase. *FASEB J* 2004; 18: 589-591.
103. Prunete H. Non-dopaminergic therapy in Parkinson's disease. *J Neurol* 2000; 247(S2): 1119-1124.
104. Calon F, Dridi M, Hornykiewicz O, Bedart P, Rajput A, Di Paolo T. Increased adenosine A2A receptors in the brain of Parkinson's disease patients with dyskinesias. *Brain* 2004; 127: 1075-1084.
105. Xiao Y, Fu J, Dong Z, Yang J, Zeng F, Zhu L, et al. Neuroprotective mechanism of modafinil on Parkinson disease induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Acta Pharmacol Sin* 2004; 25: 301-305.
106. Wang W, Shi L, Xie Y, Ma C, Li W, Su X, et al. SP600125, a new JNK inhibitor, protects dopaminergic neurons in the MPTP model of Parkinson's disease. *Neurosci Res* 2004; 48: 195-202.
107. Teismann P, Vila M, Choi D, Tieu K, Wu D, Jackson-Lewis V, et al. COX-2 and neurodegeneration in Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 991: 272-277.
108. Grünblatt E, Mandel S, Yousdim M. MPTP and 6-hydroxydopamine-induced neurodegeneration as models for Parkinson's disease: neuroprotective strategies. *J Neurol* 2000; 247(S2): 1195-1202.
109. Kirik D, Georgievska B, Björklund A. Localized striatal delivery of GDNF as a treatment for Parkinson's disease. *Nat Neurosci* 2004; 7: 105-110.
110. Lin L, Doherty D, Lile J, Bektash S, Collins F. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* 1993; 260: 1130-1132.
111. Khodolilov N, Yarygina O, Frances T, Zhang H, Sulzer D, Dauer W, et al. Regulation of the development of mesencephalic dopaminergic systems by the selective expression of glial cell line-derived neurotrophic factor in their targets. *J Neurosci* 2004; 24: 3136-3146.

112. Fumagalli F, Racagni G, Riva MA. Shedding light into the role of BDNF in the pharmacotherapy of Parkinson's disease. *Pharmacogenomics J* 2006; 6: 95-104.
113. Baloh R, Enomoto H, Jonson E, Milbrandt J. The GDNF family ligands and receptors-implications for neural development. *Curr Opin Neurobiol* 2000; 10: 103-110.
114. Tomac A, Lindquist E, Lin L, Ögren S, Young D, Hoffer B, et al. Protection and repair of the nigrostriatal dopaminergic system by GDNF *in vivo*. *Nature* 1995; 373: 335-339.
115. Gash D, Zhang Z, Ovadia A, Cass W, Simmerman L, Russell D, et al. Functional recovery in parkinsonian monkeys treated with GDNF. *Nature* 1996; 380: 252-255.
116. Gill S, Patel N, Hotton G, O' Sullivan K, McCarter R, Bunnage M, et al. Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease. *Nat Med* 2003; 9: 589-595.
117. Kearns C, Cass W, Smoot K, Kryscio R, Gash D. GDNF protection against 6-OHDA: time dependence and requirement for protein synthesis. *J Neurosci* 1997; 17: 7111-7118.
118. Sullivan A, Opacka-Juffry J, Blunt S. Long-term protection of the rat nigrostriatal dopaminergic system by glial cell line-derived neurotrophic factor against 6-hydroxydopamine *in vivo*. *Eur J Neurosci* 1998; 10: 57-63.
119. Murer M, Yan Q, Raisman-Vozari R. Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 2001; 63: 71-124.
120. Paraskevas G, Kapaki E, Petropoulou O, Anagnostouli M, Vagenas V, Papageorgiou C. Plasma levels of antioxidants vitamins C and E are decreased in vascular Parkinsonism. *J Neurol Sci* 2003; 215: 51-55.
121. Cadet J, Jackson-Lewis V, Fahn S. Vitamin E attenuates the toxic effects of intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) in rats: behavioral and biochemical evidence. *Brain Res* 1989; 476: 10-15.
122. Perumal A, Gopal V, Tordzro W, Cooper T, Cadet J. Vitamin E attenuates the toxic effects of 6-hydroxydopamine on free radical scavenging systems in rat brain. *Brain Res Bull* 1992; 29: 699-701.
123. Martin A, Prior R, Shukitt-Hale B, Cao G, Joseph J. Effect of fruits, vegetables, or vitamin E-rich diet on vitamins E and C distribution in peripheral and brain tissues: implications for brain function. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2000; 55: 144-151.
124. VanItallie T, Nufert T. Ketones: metabolism's ugly duckling. *Nutr Rev* 2003; 61: 327-341.
125. Jiménez-Jiménez F, Molina J, Hernández A, Fernández-Vivancos E, de Bustos F, Barcenilla B, et al. Cerebrospinal fluid levels of thiamine in patients with Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 1999; 271: 33-36.
126. Frey P. Coenzymes and radicals. *Science* 2001; 5551: 2489-2490.
127. Hawkins C, Borges R, Perham R. A common structural motif in thiamin pyrophosphate binding enzymes. *FEBS Lett* 1989; 255: 77-82.
128. Shikata H, Koyama S, Egi Y, Yamada K, Kawasaki T. Cytosolic adenylate kinase catalyzes the synthesis of thiamine triphosphate from thiamine diphosphate. *Biochem Int* 1989; 18: 933-941.
129. Meghal S, O'Neal R, Koeppe R. Effect of thiamine deficiency, pyridithiamine and oxythiamine on pyruvate metabolism in rat and brain *in vivo*. *J Nutr Sci Vitaminol* 1977; 23: 385-393.
130. Butterworth R. Effects of thiamine deficiency on brain metabolism: implications for the pathogenesis of the Wernicke-Korsakoff syndrome. *Alcohol Alcohol* 1989; 24: 271-279.
131. Bettendorff L, Mastrogiacomo F, LaMarche J, Dozic S, Kish S. Brain levels of thiamine and its phosphate esters in Friedreich's ataxia and spinocerebellar atrophy type 1. *Mov Disord* 1996; 11: 437-439.
132. Larrieu A, Kao R, Yazdanfar S, Redovan E, Silver J, Ghosh S, et al. Preliminary evaluation of cocarboxylase on myocardial protection of the rat. *Heart Ann Thorac Surg* 1987; 43: 168-171.
133. Larrieu A, Yazdanfar E, Redovan E, Eftychiadis A, Kao R, Silver J, et al. Beneficial effects of cocarboxylase in the treatment of experimental myocardial infarction in dogs. *Am Surg* 1987; 53: 721-725.

