



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

L-dopa como inductor de especies reactivas
de oxígeno y su impacto sobre las espinas
dendríticas de neuronas del núcleo estriado, el
hipocampo y la corteza motora

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

ALMA LILIANA CASTRO CRUZ



DIRECTORA DE TESIS:
DRA. VERÓNICA ANAYA MARTÍNEZ

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo. de México, 2018



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.

*Dedico con todo mi amor este trabajo a Maayi y
Enrique, mis queridos padres*

A mis hermanos, gran inspiración, Toño y Angélica

A Toffy y Amy

Agradecimientos

A mi **mamá**, porque tú eres la persona que más amo en la vida y la mujer a quien más admiro; has sido una gran inspiración y ejemplo de que aunque las cosas parezcan imposibles, con perseverancia y pasión por lo que se hace, se pueden alcanzar. Porque nunca te has rendido, incluso cuando el panorama era tan adverso; porque actúas como si fueras incansable e inquebrantable, pero sé que eres un ser tan delicado y frágil como cualquiera, llena de hermosos sentimientos. Porque sé de todos los esfuerzos y sacrificios que has hecho para sacarme adelante y darme cosas a las que tú no tuviste acceso. Te doy mi palabra de que nada de eso ha sido en vano y que cada día te agradezco todo lo que has hecho por mí, no sólo para la tesis, sino en todos los aspectos. ¡A ti que mereces lo mejor de la vida!

A mi **papá**, porque sé que me has dado lo que más has podido dentro de tus posibilidades, por tu amor y cuidados, por ser mi compañero de juegos y por tu ayuda al enfrentarme al mundo.

A mis **hermanos: Angélica** por ser mi confidente y cómplice, sin embargo guía y consejera cuando lo necesito; mientras nos tengamos y apoyemos, nadie logrará hacernos daño y a **Toño** por ser mi sostén y mi guía, ejemplo de nunca rendirme y siempre ir a lo grande.

A **Toffy**, amorcito de mi vida y **Amy**, por hacer mis días tan felices con su presencia. Gracias por su hermosa compañía mientras escribía ésta tesis... y mientras hacía tareas o estudiaba durante la carrera... y siempre.

A mis amiguitos de toda la carrera, el *Club de los Krelboynes*: Ale axolote, Ewilio Wejía, Fran metanefros, Chucho Siddartha; juntos hemos aprendido y crecido tanto académica como personalmente en cuatro años. Llegamos siendo unos desconocidos que difícilmente tenían idea de lo que hacían (sí, en la carrera y en la vida) y ahora somos todos unos profesionales. Espero que los proyectos que cada uno tenga prosperen y seamos unos biólogos dignos de admiración. Los quiero muchísimo a todos y agradezco por este tiempo de amistad.

A la familia T.: Miguelow, Efraín, Baduel, Richi, Orlando, porque aunque sólo fue un semestre el que compartimos, fue el más divertido. Las mejores prácticas y las más divertidas; porque aunque no tengan idea, me ayudaron a mejorar en muchos aspectos cuando más lo necesitaba.

A Normiwis, porque te abrí la puerta al equipo Krelboyne, sin imaginar que te convertirías en una gran amiga y confidente; me diste tu apoyo cuando más lo necesitaba. Pd. ¡Me debes una comida por ganar ésta apuesta!

A Javi, porque aunque al principio creí que eras un malhumorado y te temía, después descubrí en ti un gran amigo con quien contar y hasta viajar.

A Bruno, porque siempre conté con tu apoyo, tanto para el proyecto como en lo personal. Gracias por el tiempo que compartimos.

A los T. Neurons: Carlos, Sandra, Fer, Miguel, Maribel y Tort, por hacerme más llevaderos los días haciendo Golgis y peroxidaciones con tantas risas y tonterías que nos inventábamos, pero en especial porque en ustedes encontré amigos y no sólo compañeros de laboratorio.

A las personas del laboratorio de Neuromofología, particularmente a Ana por su apoyo en las técnicas y a Chucho, porque eres la persona más noble que conozco, siempre dispuesto a ayudar a los demás por encima de tus necesidades, siempre amable. Ahora es momento de que tú te dejes ayudar, querido Chucho. Eres un alma radiante y te tengo en gran estima, mil gracias por tu apoyo.

A mi asesora Vero, porque has tenido una paciencia abismal conmigo y me has guiado con tu conocimiento siempre que me sentía confundida. A María Rosa, por tus acertadas observaciones que me ayudaron a acomodar mis ideas todas revueltas (también por tus deliciosos brownies, aunque no tenga que ver). Al resto de mi comité, la Dra. Mara Garín que es un amor, la Dra. Norma Laura García y a Enrique Montiel.

A todos los profesores que fueron parte de mi formación durante la carrera, porque me contagiaron de su amor por cada materia y compartieron su conocimiento. Gracias a su pasión me fue tan difícil decidirme por una sola rama.



Al lugar que me formó como bióloga, mi querida FESI ☺

A la UNAM, por abrirme un panorama totalmente nuevo desde mi ingreso al bachillerato en prepa 5 y luego llenar mi espíritu con la mejor carrera que puede existir: ♥BIOLOGÍA♥. La más hermosa y enriquecedora de todas, tan compleja y bella, tan apasionante. En verdad no pude haber hecho una mejor elección que colmara de tal forma mi corazón.

“El magnífico espectáculo de la Naturaleza que en muchos otros corazones despierta sólo admiración, era para el suyo objeto de un culto lleno de la más encendida pasión”

Mary Shelly

“No basta con enseñar a conocer la Naturaleza, deberíamos enseñar a amarla”

Fernando González Bernáldez

“La ciencia es más que un conjunto de conocimientos, es una forma de pensar, una forma de interrogar al Universo con escepticismo”

Carl Sagan

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN.	1
INTRODUCCIÓN	3
Qué es la Enfermedad de Parkinson	3
Etiología	5
Estrés Oxidativo	6
Radicales Libres y Especies Reactivas de Oxígeno.	7
Disfunción Mitocondrial	10
Excitotoxicidad	11
Neuroinflamación	11
Envejecimiento	12
Ganglios basales	13
Las vías directa e indirecta	15
Dopamina	17
Degradación enzimática de DA y producción de metabolitos neurotóxicos	19
Auto-oxidación no enzimática y producción de quinonas reactivas	20
Tratamientos	22

L-DOPA, el tratamiento por excelencia	22
ANTECEDENTES	23
JUSTIFICACIÓN	27
OBJETIVOS	28
MATERIALES Y MÉTODOS	28
RESULTADOS	31
Neuronas Inmunoreactivas a TH	32
Espinass dendríticas	33
Peroxidación de lípidos	40
DISCUSIÓN	42
CONCLUSIONES	47
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

ABREVIATURAS

AACD	L-aminiácido descarboxilasa	ERO	especies reactivas de oxígeno	O2	oxígeno
ADH	aldehído deshidrogenasa	GABA	ácido γ - aminobutírico	O2^{-•}	radical superóxido
AVT	área ventral tegmental	GB	ganglios basales	\cdotOH	radical hidroxilo
BH₄	tetrahidrobiopteridinas	GP	globo pálido	ONOO⁻	peroxinitrito
BHE	barrera hematoencefálica	GSH	glutati3n	RL	radical libre
CAT	catalasa	H₂O₂	peróxido de hidrógeno	ROCH	aldehído reactivo
CL	cuerpos de Lewy	HVA	ácido homovanílico	ROO	peroxil
CMH	complejo mayor de histocompatibilidad	L-DOPA	L-3,4 dihidroxifenilalanina	SNc	sustancia nigra compacta
DA	dopamina	MAO	monoaminoxidasas	SNr	sustancia nigra reticulada
DAT	transportador de dopamina	MDA	malonaldehído	SOD	superóxido dismutasa
DAQ	quinonas de dopamina	NE	núcleo estriado	TH	tirosín hidroxilasa
DOPAC	3,4- dihidroxifenilacético	NEM	neuronas espinosas medianas	TBARS	sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
EA	Enfermedad de Alzheimer	NET	transportador de norepinefrina	VMAT	transportador vesicular de monoaminas tipo 2
EP	Enfermedad de Parkinson	NO\cdot	óxido nítrico	α-SYN	alfa sinucleínas
ERN	especies reactivas de nitr3geno	NST	núcleo subtalámico		

RESUMEN

La Enfermedad de Parkinson es la segunda más común de las enfermedades neurodegenerativas y se estima que afecta a más de 10 millones de individuos alrededor del mundo. Se caracteriza por la degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra compacta, provocando la reducción en el nivel de dopamina (DA) estriatal, provocando disfunción en los ganglios basales, un grupo de núcleos implicados en la iniciación y ejecución del movimiento. La complejidad de la integridad neuronal es un intrincado proceso que sugiere que son diversas vías y/o factores los que ocasionan la muerte celular, entre ellos los más estudiados son el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial. Desde los años 60 hasta la fecha, la L-DOPA es el tratamiento más usado y eficaz para atenuar los síntomas motores de la enfermedad, sin embargo también es el que más efectos secundarios provoca luego de su administración a largo plazo, debido a las reacciones adversas que se cree están correlacionadas con la neurotoxicidad que el exceso de DA y/o L-DOPA pueden producir; por ello se ha sugerido que el medicamento pudiera estar contribuyendo o acelerando el progreso de la enfermedad. Para poner a prueba dicha hipótesis, se medicó por tres meses a ratas intactas con una dosis diaria de 10 mg/kg de L-DOPA, luego de lo cual se extrajeron diferentes núcleos para procesar el tejido con las técnicas de inmunocitoquímica para TH (en sustancia nigra) y así contabilizar el número de neuronas dopaminérgicas, impregnación de Golgi (en núcleo estriado, corteza motora e hipocampo) para evidenciar alteraciones en el número de espinas dendríticas y peroxidación lipídica (sustancia nigra, núcleo estriado, globo pálido, hipocampo y corteza) para evaluar daño celular.

Se observó que la administración crónica de la L-DOPA produjo disminución significativa en el número de neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra compacta, así como en el número de espinas dendríticas en los tres núcleos evaluados. También se observó incremento en la cantidad de lípidos peroxidados

en el globo pálido, y aunque sólo en este núcleo fue de manera significativa, se mostró una tendencia a aumentar en el estriado, sustancia nigra e hipocampo. Así, los resultados obtenidos en este trabajo corroboran los efectos tóxicos a nivel celular y molecular que la administración de L-DOPA tiene incluso en sistemas sanos.

INTRODUCCIÓN

-ENFERMEDAD DE PARKINSON

La EP es la segunda más común de las enfermedades neurodegenerativas, se trata de un padecimiento crónico y progresivo que afecta el movimiento y se estima que más de 10 millones de individuos alrededor del mundo la padecen, afectando a una de cada 1000 personas, con aproximadamente 1% en personas de más de 60 años, e incrementando hasta 4% en personas de 85 años o más (Taylor *et al.*, 2013; Hindle, 2010; Santiago y Rivas, 2008; de Lau y Breteler, 2006). Fue descrita por primera vez en 1917 por James Parkinson, que le dio inicialmente el nombre de *parálisis agitante* o *parálisis temblorosa* (Tanner y Goldman, 1996).

Se caracteriza principalmente por la degeneración progresiva de las neuronas dopaminérgicas de la SNc, lo que provoca reducción en los niveles de DA estriatal, provocando disfunción en los ganglios basales, un grupo de núcleos implicados en la iniciación y ejecución del movimiento (Rodríguez *et al.*, 2009; Bartels y Leenders, 2009); así como la aparición de inclusiones citoplasmáticas proteicas conocidas como cuerpos de Lewy (Lees *et al.*, 2009; Braak *et al.*, 2003). Puede

requerir muchos años antes de alcanzar el grado total de extensión del daño (Braak *et al.*, 2004).

Los síntomas incluyen: temblor en reposo, rigidez muscular, bradicinesia, inestabilidad postural, postura encorvada y el “congelamiento” repentino de la marcha; éstos suelen empeorar con el tiempo. Comúnmente empiezan de un lado del cuerpo, llegando eventualmente al otro lado (Jankovic y Stacy, 2007; Savitt *et al.*, 2006; Smeyne y Jackson, 2005).

-Temblor en reposo: es por lo general el primer síntoma que se reconoce de la enfermedad en el paciente, siendo temblor de la mano (donde se presenta más frecuentemente) o el pie cuando la extremidad se encuentra en estado de reposo. Al principio puede ser sólo intermitente, presentándose solamente en situaciones de estrés. Posteriormente se vuelve más constante y persistente

-Bradiscinecia: se refiere a la lentitud y amplitud reducida de los movimientos, que dificulta que éstos sean sucesivos, asimismo afecta la ejecución motora fina

-Rigidez muscular: se detecta cuando el médico que examina al paciente mueve los músculos de sus extremidades, cuello y hombros y éstos experimentan mayor resistencia.

De los seis principales síntomas de la EP mencionados, tres de ellos ocurren en las etapas más tempranas (descritos anteriormente) y los otros cuando la enfermedad ha avanzado. Mientras que los primeros desaparecen cuando el paciente está siendo medicado para activar los receptores estriatales de DA (agonistas dopaminérgicos), los otros no lo hacen, lo que sugiere que son resultado de procesos no involucrados con la depleción dopaminérgica (Fahn *et al.*, 2004).

Asimismo, se presentan síntomas no motores, como disminución de las funciones cognitivas, ansiedad, depresión, trastornos del sueño, incapacidad autonómica y demencia, entre otras que pueden resultar de la vulnerabilidad de poblaciones neuronales selectas en varias regiones del sistema nervioso central y periférico (Licker y Burkhard, 2014; Braak *et al.*, 2006; Shulman *et al.*, 2001).

Estos síntomas en conjunto, derivan en numerosas discapacidades funcionales que impactan radicalmente en la calidad de vida, la capacidad de trabajo y la expectativa de vida de las personas que padecen la EP (Diem *et al.*, 2010; Martikainen *et al.*, 2006). Todos ellos se vuelven evidentes cuando aproximadamente el 80% de las terminales neuronales en el núcleo estriado, y del 50 al 60% de los cuerpos celulares dopaminérgicos se han perdido en la SNc (Lang y Obeso, 2004).

-ETIOLOGÍA

Aunque la mayoría de los casos son esporádicos, ya que únicamente 10% de ellos están ligados a causas genéticas, es bastante improbable que sea un solo factor el que ocasione la muerte celular propia de la enfermedad (Martin *et al.*, 2011). La complejidad de la integridad neuronal es un intrincado proceso que sugiere que son diversas vías y/o factores los que ocasionan la muerte celular (Abdullah *et al.*, 2014; González *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2011), donde convergen la susceptibilidad genética y los factores ambientales (Martino *et al.*, 2016). Al ser un padecimiento tan complejo, algunos autores han sugerido que se trata de varios síndromes agrupados en una sola enfermedad (Giroux, 2007; Tanner *et al.*, 1999).

Aunque la etiología no está del todo clara, el estilo de vida, la exposición a agentes tóxicos y el envejecimiento natural, son algunos de los factores de riesgo

más importantes que favorecen el desarrollo de la EP (Santiago y Rivas, 2008; Giroux, 2007; Sulzer, 2007); de hecho, se ha demostrado que son muchos los mecanismos que sensibilizan a las neuronas conduciéndolas a la muerte, como estrés oxidativo, disfunción mitocondrial, deterioro de los sistemas de degradación de proteínas, neuroinflamación, excitotoxicidad y desregulación de calcio intracelular (Licker y Burkhard, 2014; Ho *et al.*, 2012). No obstante, el papel exacto de cada uno de estos factores no está definido (Dauer y Przedborski, 2003).

-ESTRÉS OXIDATIVO

El cuerpo humano mantiene un balance de óxido-reducción constante, preservando el equilibrio entre la producción de pro-oxidantes que se generan como resultado del metabolismo celular y los sistemas de defensa antioxidantes. Cuando la producción de RL y especies reactivas se incrementa en exceso y sobrepasa a los sistemas antioxidantes endógenos, se rompe el equilibrio, llevando a un estado de estrés oxidativo, el cual es citotóxico (Santiago y Rivas, 2008; Dorado *et al.*, 2003; Venereo, 2002). Las neuronas están expuestas constantemente a estrés oxidativo, por lo cual dependen de los mecanismos enzimáticos antioxidantes para que la exposición prolongada no provoque daños; entre dichos mecanismos se encuentra la SOD, CAT, el glutatión peroxidasa y el glutatión-S-transferasa, cuyo papel es neutralizar a las moléculas nocivas, ya que la alteración del balance entre pro-oxidantes y antioxidantes, puede tener diversos grados de magnitud (Padurariu *et al.*, 2013; Padurariu *et al.*, 2010). En el estrés oxidativo leve, los mecanismos antioxidantes bastan para restablecer el equilibrio, pero en el estrés oxidativo grave, ocasiona alteraciones importantes en el metabolismo celular, como peroxidación de lípidos, daño a proteínas,

rompimiento de la cadena de ADN, aumento en la concentración de calcio intracelular y daño a los transportadores membranales de iones, lo que en consecuencia puede provocar la muerte de la célula (Abdullah *et al.*, 2014; Myrthri *et al.*, 2011; Dorado *et al.*, 2003). Cabe mencionar que se ha encontrado un alto grado de daño a estas biomoléculas en pacientes con EP (Nakabeppu *et al.*, 2007).

El exceso de EO contribuye a la muerte celular en la EP debido a que gradualmente disminuye la capacidad de la célula para enfrentar los daños con el tiempo (Obeso *et al.*, 2010). Este daño puede ser reversible o irreversible, dependiendo de factores como el tiempo que dure el estado de estrés, la efectividad de las defensas antioxidantes, la edad del organismo, el estado nutricional y factores genéticos (Gilbert y Colton, 1999).

Las neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra son sumamente susceptibles al EO debido al alto consumo de oxígeno de esta región, junto con los bajos niveles de enzimas antioxidantes, como la SOD, GSH y CAT (Floyd, 2009; Fahn y Cohen, 1992).

Si bien la presencia de EO es innegable, aún es incierto si éste constituye la causa primaria (la que inicia la enfermedad), o la secundaria (que sólo contribuye) de los factores pato-genéticos (Smeyne y Smeyne, 2013; Jenner, 2007; Andersen, 2004).

-Radicales Libres y Especies Reactivas de Oxígeno

Los RL son todas las especies atómicas o moleculares, capaces de existir de forma independiente, que en su estructura presentan un electrón desapareado en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera gran inestabilidad, por lo cual son altamente reactivos (Padurariu *et al.*, 2010;

Venereo, 2002). Sus características bioquímicas y estructurales es lo que hace la diferencia crucial entre ellos, ya que les confiere su poder oxidativo, que se traduce en su toxicidad (Padurariu et al., 2013).

Las ERO son moléculas derivadas, que se generan durante la reducción completa del oxígeno molecular a agua, proceso en el que se incorporan cuatro electrones en diversas etapas, produciendo moléculas intermedias, las cuales pueden ser o no radicales libres (Martín, 2007). En la Figura 1 se enlistan los RL y las ERO.

Radicales libres:	
O_2^{\bullet}	= Anion superóxido
OH^{\bullet}	= Radical hidroxilo
ROO^{\bullet}	= Peroxil lipídico
RO^{\bullet}	= Alkoxyl
RS^{\bullet}	= Thiyl
ON^{\bullet}	= Oxido nítrico
NO_2^{\bullet}	= Dióxido de nitrógeno
$ONOO$	= Peroxinitrito
CCL_3^{\bullet}	= Triclorometil

No – radicales:	
H_2O_2	= Peróxido de hidrógeno
$HOCL$	= Acido hipocloroso
$ONOO$	= Peroxinitrito
O_2	= Oxígeno

Figura 1. Lista de los radicales libres y los no-radicales, así como sus fórmulas (Fuente: <http://www.actamedicacolombiana.com/anexo/articulos/04-2001-12.htm>)

Cabe mencionar que existen varios tipos de RL y especies reactivas dependiendo de su estructura, la cual puede se observa en la Figura 2. De ellos los más

estudiados son: radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxilo ($\bullet OH$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), óxido nítrico ($NO\bullet$), peroxil (ROO) y aldehído reactivo ($ROCH$) (Padurariu *et al.*, 2013).

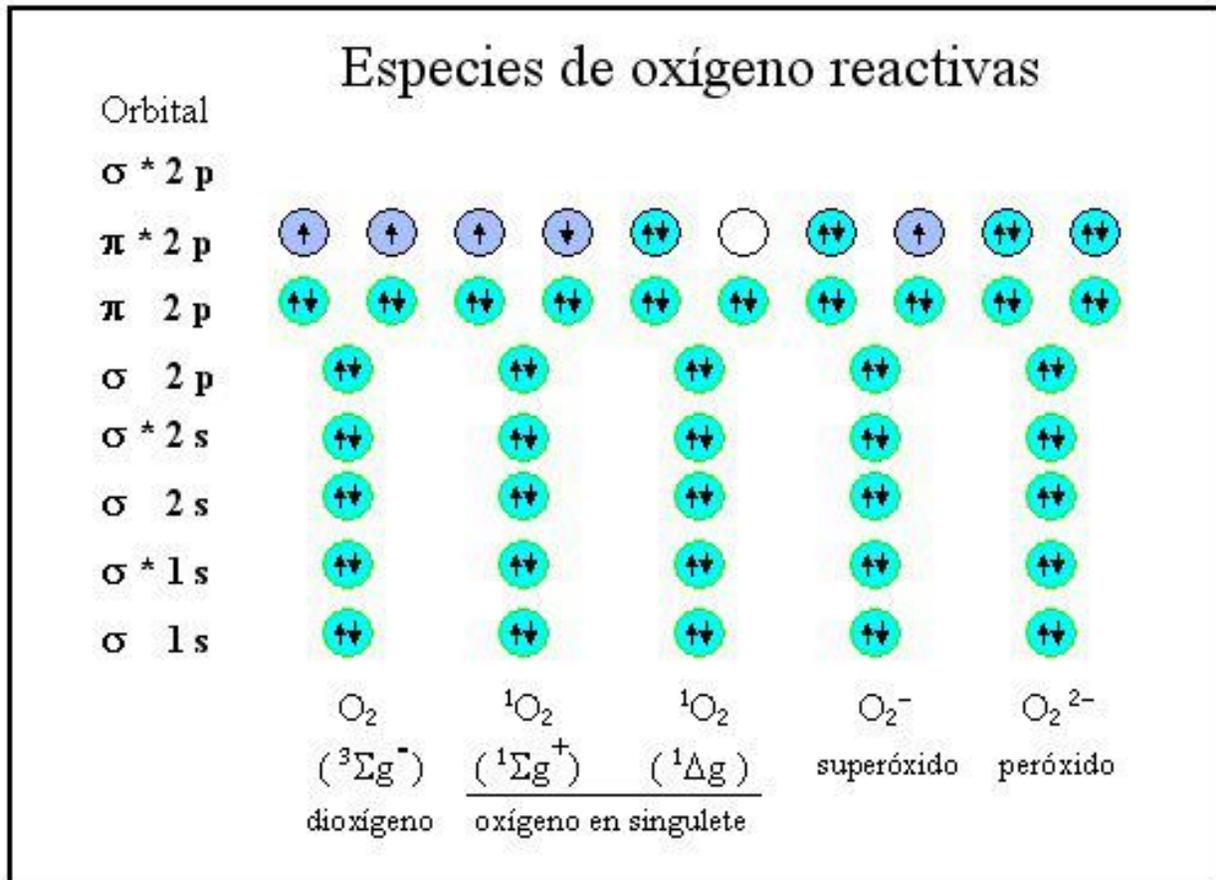


Figura 2. Configuración electrónica de algunas moléculas de oxígeno diatómico. A diferencia del superóxido y del ion peróxido, el oxígeno singulete puede aceptar pares de electrones, lo cual lo hace muy reactivo (Hansberg, 2002).

Las ERO forman parte del metabolismo celular al facilitar algunas funciones como la proliferación, defensa, supervivencia y muerte celular programada (Brieger *et al.*, 2012).

Además, las ERO pueden activar vías pro-inflamatorias, promoviendo un ambiente perjudicial para las poblaciones neuronales vulnerables (Hirsch *et al.*, 2012; Varcin *et al.*, 2012).

-DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL

Al ser la mitocondria el organelo con mayor consumo de oxígeno en la célula, se encuentra expuesta a una gran cantidad de ERO (Subramaniam y Chesselet, 2013). Por ello, se considera que la disfunción mitocondrial es el principal mecanismo responsable de la degeneración de las neuronas de la SNC en la EP (Mounsey y Teismann, 2010; Gupta *et al.*, 2008), ya que presentan una alta tasa metabólica, y debido a su contenido de DA y neuromelanina, así como niveles basales relativamente altos de calcio, se cree que se encuentran en un estado “pro oxidante” incluso en condiciones fisiológicas normales (Hastings, 2009). De este modo, cualquier factor patológico o genético adicional (o, en el peor de los casos, la combinación de ambos), pueden causar disfunción mitocondrial, provocando la producción insuficiente de ATP, generación excesiva de ERO, daño oxidativo en proteínas mitocondriales y citosólicas, liberación de citocromo c y otros factores pro apoptóticos, pérdida de balance en la homeostasis del calcio y eventualmente, la muerte de la neurona (Cho *et al.*, 2010; Sulzer, 2007).

En condiciones anormales, se establece un círculo vicioso en el que la mitocondria es a la vez productora y el blanco de las ERO y RL, provocando la muerte de la célula (Schapira, 2009; Zhou *et al.*, 2008).

El Complejo I de la cadena transportadora de electrones, es el que se ve más afectado dentro de la mitocondria, e incluso se ha demostrado una clara

disminución en su actividad dentro de las neuronas de la SNc en cerebros de pacientes a los que se les practicó la autopsia (Parker *et al.*, 2008).

-EXCITOTOXICIDAD

Se refiere básicamente al daño celular causado por la liberación excesiva de glutamato o disfunción de los transportadores de glutamato (Lau y Tymianski, 2010). Se debe principalmente a la sobreactivación de los receptores NMDA de glutamato, incrementando la entrada de calcio y subsecuentemente la activación de enzimas proteolíticas dependientes de calcio (calpainas, fosfolipasas, endonucleasas, etc.), y finalmente el incremento en la producción de ERO en la mitocondria (Zündorfand y Reiser, 2011). Además, la activación de los receptores metabotrópicos de glutamato del Grupo I (mGluR1 y 5), movilizan el calcio de los depósitos intracelulares, contribuyendo a la sobrecarga de calcio (Caudle y Zhang, 2009).

-NEUROINFLAMACIÓN

Las respuestas inmunes en el cerebro están estrictamente reguladas (Medawar, 1948). Dicha regulación es en parte dependiente de la BHE, así como de las células de la glía (y en menor medida, de las neuronas). La microglía es el principal tipo celular que provee al cerebro de inmunidad innata. Por su parte, los astrocitos y oligodendrocitos, también están implicados en la respuesta neuroinflamatoria (Tansey *et al.*, 2007). Asimismo, la microglía mantiene la homeostasis del cerebro mediante la producción de varios tipos de factores neurotróficos, como el BDNF, IGF-1 y el IL-10, que influyen en los astrocitos y neuronas adyacentes (Lee *et al.*, 2009).

En un cerebro sano, la microglía se encuentra en un estado latente, sin embargo, en estado de estrés como la invasión de patógenos, daño, o acumulación de proteínas tóxicas, la microglía se activa iniciando la respuesta inmune para estimular la reparación de tejidos, eliminando desechos celulares y células apoptóticas, y liberando factores neurotróficos (Aloisi, 1999).

En condiciones normales, la respuesta inmune se detendrá una vez que el estrés haya sido erradicado, pero si persiste o falla, el estímulo conducirá a la sobreproducción de factores neurotóxicos, incluyendo citocinas, quimiocinas y prostaglandinas. La respuesta inflamatoria provocada por estos factores, puede además potenciar el daño neuronal, al generar ERO y ERN (Taylor *et al.*, 2013; Tansey y Goldberg, 2010).

En 1988, se dispuso por primera vez de evidencia para asegurar que la neuroinflamación es una pieza clave, al presentar en estudios post mortem con cerebros de pacientes con EP, cifras elevadas del CMH clase II-positivo (activada) en la glía (McGeer, 1988). Asimismo, múltiples estudios clínicos subsecuentes han provisto de más evidencia que involucra la respuesta inflamatoria en la patología de la EP (Gerhard *et al.*, 2006; Mogi *et al.*, 1995).

-ENVEJECIMIENTO

Aunque se ha señalado a muchos factores como los causantes de la EP, el envejecimiento aún sigue siendo el más significativo y el mejor documentado (Vanitallie, 2008). Se ha propuesto que mientras el cerebro envejece, el inherente debilitamiento de los sistemas de reparación celular incrementa la susceptibilidad de desarrollar EP (Abdullah *et al.*, 2014; Hindle, 2010).

Con la edad, el cerebro tiende a acumular metales de manera natural, lo cual promueve su acumulación en las neuronas, haciéndolas más susceptibles a la muerte celular. La evidencia también sugiere que la toxicidad por metales como tal, no incrementa necesariamente el riesgo de padecer EP, pero sí en adición con mutaciones genéticas (Björkblom *et al.*, 2013).

Aunque la EP y el envejecimiento están altamente correlacionados, aún se carece de la información detallada acerca de la interacción entre las diferentes vías y procesos que pueden influenciar la patogénesis de la enfermedad (Abdullah *et al.*, 2014).

-GANGLIOS BASALES

Son un grupo de núcleos subcorticales interconectados que están involucrados en una gran variedad de procesos, incluyendo funciones motoras, asociativas, cognitivas y de memoria (Albin *et al.*, 1989). La principal entrada de información a estos núcleos proviene de la corteza cerebral y el tálamo y se dirige al tallo cerebral, donde se le da salida y, por vía del tálamo, de vuelta a la corteza prefrontal, premotora y motora.

De acuerdo con estudios clínicos, se ha determinado que los ganglios basales están implicados en el control del movimiento y por lo tanto, los desórdenes motores (Graybiel *et al.*, 1994).

Los cuatro núcleos principales que integran a los ganglios basales son el NE, que se divide en núcleo caudado y putamen por la cápsula interna, en primates y otras especies, el GP, la sustancia nigra, que contiene neuromelanina, un pigmento oscuro derivado de la DA oxidada y polimerizada; dicho pigmento se acumula paulatinamente en gránulos lisosomales dentro de los cuerpos celulares, lo cual

le da la particular coloración a esta estructura y se divide en las porciones pars reticulata y pars compacta (SNr y SNc, respectivamente) y el NST. Además de estas estructuras, existen otros núcleos en la división ventral: el estriado ventral o núcleo accumbens y el AVT que es la continuación de la SNc. Dicha división está asociada con funciones límbicas (Kandel *et al.*, 2000). En la Figura 3 se puede apreciar la representación gráfica de los núcleos mencionados.

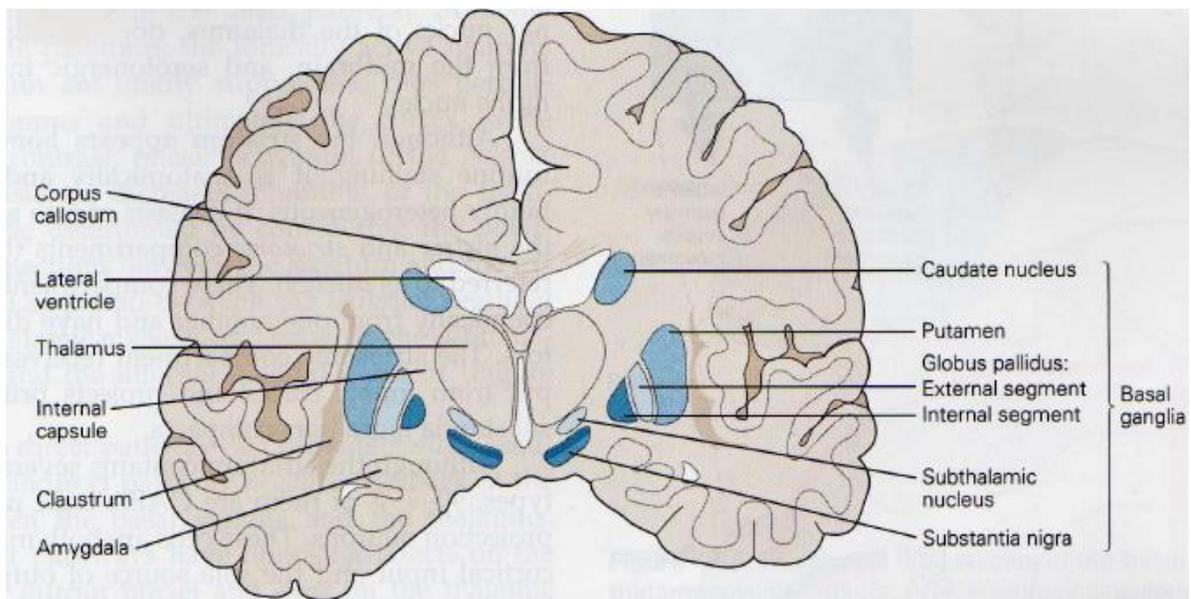


Figura 3. Sección coronal que muestra los ganglios basales y otras estructuras cercanas (Kandel, Schwartz y Jessel, 2000).

El ácido γ -aminobutírico (GABA) es el principal neurotransmisor de las neuronas de los GB, siendo el 97% de ellas GABAérgicas (en roedores). Las únicas excepciones son las neuronas glutamatérgicas del NST, las neuronas dopaminérgicas de la SNc y una pequeña población de interneuronas colinérgicas en el NE.

Las principales entradas a los GB son de tipo glutamatérgico y provienen de la corteza cerebral y el tálamo, dirigiéndose primordialmente al NE, aunque también hay un considerable número de proyecciones hacia el NST. Las

proyecciones córticoestriatales derivan de poblaciones de neuronas piramidales que hacen sinapsis con las NEM del estriado (Gubellini *et al.*, 2010).

-Las vías directa e indirecta

En el ahora considerado “esquema clásico” del circuito de los GB, una vez que la información llega al NE, es procesada y transmitida a los núcleos de salida por medio de dos rutas, la vía directa y la vía indirecta.

En la vía directa, la información es enviada directamente a los núcleos de salida, aunque se han encontrado proyecciones colaterales que inervan el GPe y las neuronas expresan los neuropéptidos sustancia P y dinorfina.

En la vía indirecta la información pasa primero por el GPe y se dirige luego al NST, en un recorrido meramente GABAérgico y finalmente a los núcleos de salida, ahora en una proyección glutamatérgica; en este caso el neuropéptido es encefalina.

Ambas vías son moduladas por las proyecciones dopaminérgicas provenientes de la SNc hacia el NE. Las neuronas estriatales que proyectan a los núcleos de salida directamente expresan receptores de dopamina tipo D1, que facilitan la transmisión, mientras que las que proyectan por la vía indirecta expresan receptores tipo D2, que reducen la transmisión.

Ambas vías en conjunto tienen efectos opuestos en los núcleos de salida y por lo tanto, en las regiones blanco del tálamo a las que se dirigen. La activación de la vía directa desinhibe al tálamo, incrementando la actividad tálamo-cortical, facilitando el movimiento, mientras que la activación de la vía indirecta cesa la actividad de las neuronas tálamo-corticales, frenando el movimiento (Bolam *et al.*, 2009. En la Figura 4 se presenta un diagrama simplificado de las conexiones entre los núcleos de los GB.

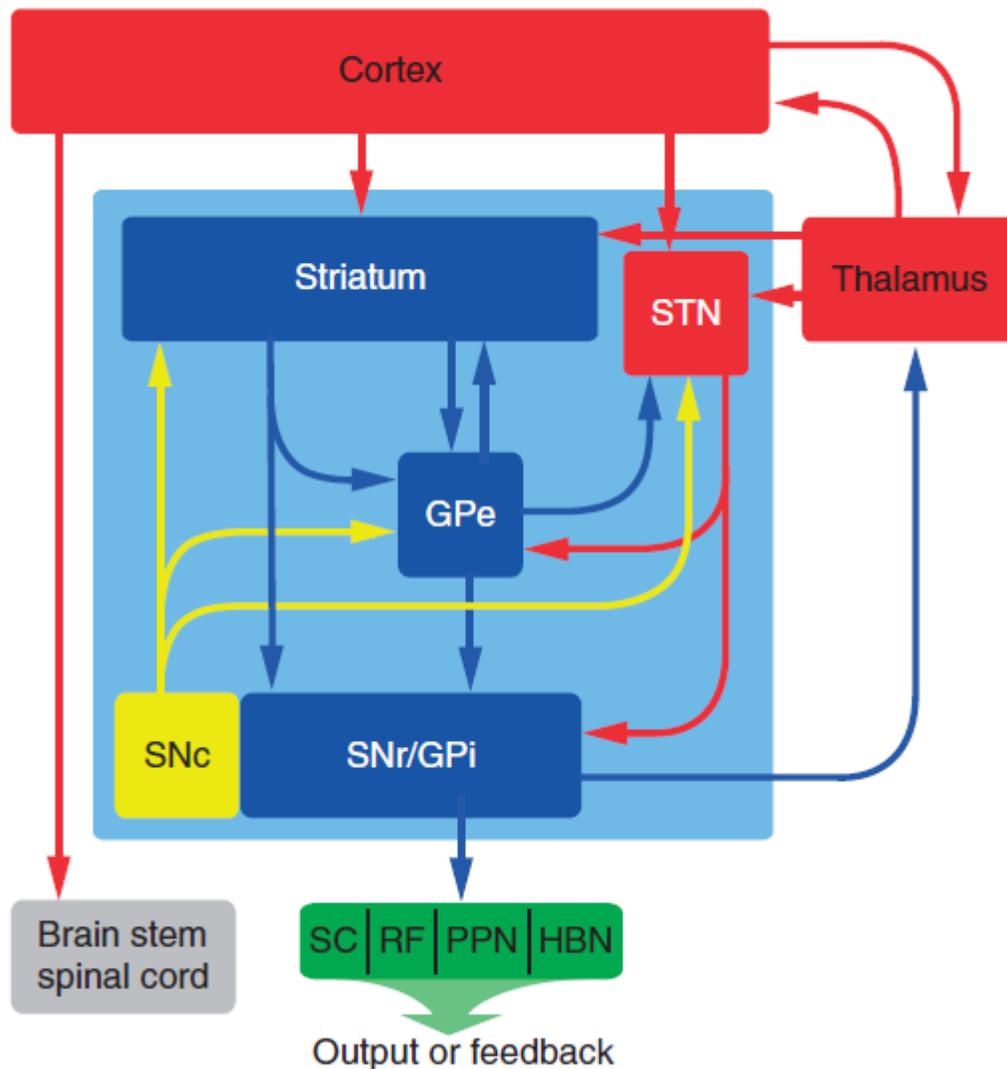


Figura 4. Diagrama simplificado de los ganglios basales y sus principales conexiones. STN: núcleo subtalámico, GPe,i: globo pálido externo e interno, SNc,r: sustancia nigra compacta y reticulada (Bolam *et al.*, 2009)

Es importante señalar que en este complejo sistema se encuentran núcleos que si bien no son parte de los ganglios basales, también reciben proyecciones de los mismos. Ejemplo de ello son la corteza motora y el hipocampo, que se ha

demostrado que reciben proyecciones dopaminérgicas de la sustancia nigra (Debeir *et al.*, 2005; Höglinger *et al.*, 2004).

-DOPAMINA

Las catecolaminas son compuestos formados por un núcleo catecol (un anillo de benceno con dos hidroxilos) y una cadena de etilamina o alguno de sus derivados. Las catecolaminas: dopamina, adrenalina y noradrenalina actúan como mensajeros químicos en el sistema nervioso y la primera es el transmisor catecolaminérgico más importante del SNC, donde participa en una gran variedad de funciones que incluyen la actividad locomotora, la afectividad, la regulación neuroendócrina, entre otras funciones en el SNP (Bahena *et al.*, 2000).

La DA es el neurotransmisor producido por las neuronas de la SNc que proyectan al NE. Es una monoamina que se sintetiza a partir del aminoácido L-tirosina, que mediante la acción de la enzima tirosina hidroxilasa (TH) y en conjunto con O_2 y tetrahidrobiopteridinas (BH_4) como cofactor, se convierte en L-DOPA, la cual a su vez, por medio de la L-aminoácido descarboxilasa (AADC) se convierte finalmente en DA, como se muestra en la Figura 5 (Rahman *et al.*, 1982).

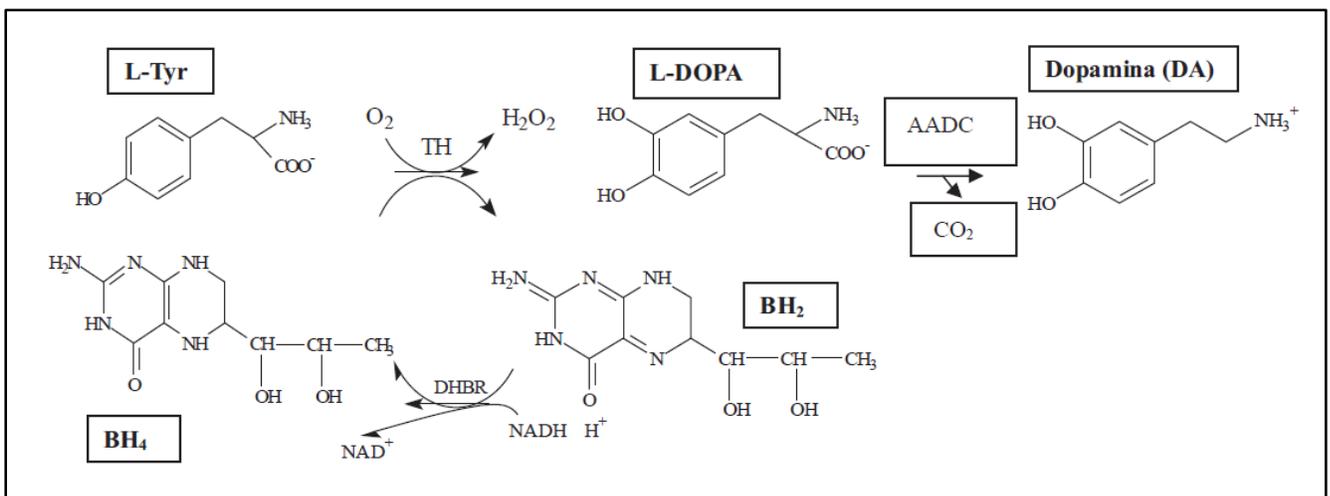


Figura 5. Síntesis de la dopamina (Malgor y Valsecia, s.f.)

La TH es la enzima limitante de la reacción en la síntesis de DA, se localiza en las terminales nerviosas dopaminérgicas y su actividad está controlada principalmente por la inhibición de los productos finales, es decir, una alta concentración citoplasmática de DA inhibirá la actividad de la TH y la disminución de la actividad neuronal de los niveles de DA reactivan a la TH.

Una vez que la DA se encuentra en el citoplasma, es incorporada a las vesículas sinápticas mediante los transportadores vesiculares de monoaminas tipo 2 (VMAT2), los cuales la concentran dentro de las vesículas a través de una bomba ATP-protón dependiente (Wimalasena, 2011). La liberación de la DA es un proceso mediado por la acción de canales de calcio dependientes de voltaje, el cual promueve la fusión de las vesículas sinápticas con la membrana neuronal, que resulta en la liberación de la DA al espacio sináptico. Después de la acción de ésta sobre el receptor postsináptico, el neurotransmisor sobrante es recapturado por transportadores de dopamina (DAT), proteína presente en la membrana plasmática de las neuronas dopaminérgicas. Dicho transportador es dependiente de sodio y cloro (Eisenhofer *et al.*, 2004).

-Degradación enzimática de DA y producción de metabolitos neurotóxicos

La DA es un neurotransmisor estable estando dentro de la vesícula sináptica, sin embargo, cuando se encuentra de forma excesiva fuera de la misma, en el citosol, es metabolizada enzimáticamente (Miyazaki y Asanuma, 2008).

El metabolismo de la DA, que en condiciones de homeostasis es en sí mismo oxidativo, involucra a tres enzimas principales, que actúan por medio de procesos de oxidación y desaminación:

- monoaminooxidasas (MAO) A y B
- catecol-o-metiltransferasa (COMT)

- aldehído-deshidrogenasa (ADH)

Las MAO-A y MAO-B son enzimas mitocondriales que usan FADH como cofactor para convertir la DA en DOPAL, un aldehído derivado que es extremadamente reactivo y potencialmente nocivo para las células (Goldstein, 2013). Éste es convertido rápidamente por aldehído deshidrogenasas en DOPAC, un metabolito ácido poco activo. El DOPAC es expulsado de la neurona a través de un transportador dependiente de protones y catabolizado por la COMT en HVA, que aparentemente carece de actividad biológica (Miyamoto *et al.*, 1991).

Por su parte, la COMT en presencia de Mg^{2+} , cataliza la transferencia de un grupo metilo de S-adenosil-L-metionina a uno de hidroxilo de las catecolaminas o de los aldehídos generados por las MAO (Myohanen *et al.*, 2010).

La MAO oxida la DA vía catabólica primaria hasta DOPAC, generando peróxido de hidrógeno. Éste en presencia de ion hierro, que es relativamente abundante en los ganglios basales, puede generar $\cdot OH$ en una reacción conocida como Fenton (Roland *et al.*, 2000). El $\cdot OH$ es el más reactivo de los radicales, al reaccionar con cualquier biomolécula, especialmente con aquellas que contengan grupos $-SH$ (Chen *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1997). De igual forma, en la reacción de Haber-Weiss, el $O_2\cdot^-$ reacciona con H_2O_2 para generar $\cdot OH$ (Haber and Weiss, 1934).

-Auto-oxidación no enzimática y producción de quinonas reactivas

Por otro lado, la oxidación espontánea no enzimática de la DA produce $O_2\cdot^-$ y quinonas reactivas, entre ellas DAQ y DOPAQ. El superóxido generado puede reaccionar con radicales $NO\cdot$ y subsecuentemente generar peroxinitrito ($ONOO\cdot$). Además, las quinonas son fácilmente oxidadas a aminocromos ciclados: DA-cromo y DOPA-cromo (Lipski *et al.*, 2012; Coyle y Puttfarcken, 1993). Estos

productos son precursores para la formación de neuromelanina en la SNc y melanina en la piel (Sulzer y Zecca, 2000).

Dichas quinonas pueden también conjugarse con el grupo –SH del aminoácido cisteína, resultando en la formación de 5-cisteinil-DA/DOPA, y puesto que el grupo sulfhidrilo es a menudo el sitio activo de las proteínas, la modificación covalente de la cisteína, puede alterar de forma irreversible o incluso inhibir la función de muchas proteínas, entre ellas el DAT (Asuma *et al.*, 2003; Sabens *et al.*, 2010); de igual forma afectan la función mitocondrial al disminuir la producción de ATP por bloqueo de la cadena respiratoria e incrementar la permeabilidad de los poros de transición (Berman y Hastings, 1999; Olanow, 1993); asimismo, pueden modificar de forma covalente e inactivar a la TH (Kuhn *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 1998). Este proceso metabólico se muestra de forma gráfica en la Figura 6.

-TRATAMIENTOS

A pesar de que la degeneración neuronal es el gran problema a solucionar, a la fecha no se ha logrado deshacer la gran maraña para averiguar por dónde atacar y lograr atenuarla. Por ello, constantemente surgen investigaciones tanto experimentales como clínicas para retardar o incluso detener la neurodegeneración y por lo tanto, el progreso de la enfermedad; sin embargo, hasta ahora no ha sido posible, y por ello los tratamientos actuales más frecuentes se enfocan básicamente en controlar los síntomas motores (Taylor *et al.*, 2013; Olesen *et al.*, 2012; Birkmayer y Hornykiewicz, 1962).

- **L-DOPA, el tratamiento por excelencia**

La disminución de DA por la administración de reserpina, produce acinesia parecida a la EP en animales y suplirla con la administración de L-DOPA, aminora el desorden en el movimiento. Fue gracias a estos resultados que se sugirió que la deficiencia de DA en el sistema nigro-estriatal causa la EP en los humanos y se podía suplir su falta con L-DOPA como tratamiento clínico.

Investigadores alrededor de todo el mundo, como Sano y colaboradores en 1960, Birkmayer y Hornykiewicz en 1961, y Barbeau y colaboradores en 1962, fueron quienes dieron la pauta de la terapia de remplazo de la DA, pero fue hasta 1969 que Cotzias y colaboradores reportaron que la administración de altas dosis de L-DOPA vía oral, mejoraba drásticamente la función motora de pacientes con EP (Nagatsu y Sawada, 2009; Kordower y Goetz, 1999; Cotzias *et al.*, 1969).

Posteriormente, se demostró que las altas dosis de L-DOPA necesarias para ejercer un efecto biológico en el cerebro, podían disminuirse si ésta se co-administraba con inhibidores de la AADC, que no cruza la BHE, permitiendo que el precursor llegue intacto y sea convertido a DA en la región deseada (Bartholini *et al.*, 1967). De esta forma, quedó establecida la eficacia de la L-DOPA como el tratamiento por excelencia para combatir los síntomas de la enfermedad.

Aunque los agonistas directos de receptores de DA como el pramipexol o el ropinirol se usan con frecuencia en el tratamiento de la EP, el fármaco más eficaz para reducir los síntomas motores sigue siendo la L-DOPA (Olanow *et al.*, 2009; Mercuri y Bernardi, 2005; Ahlskog, 2003).

Sin embargo, después de un periodo de 4-6 años de tratamiento, la L-DOPA gradualmente se vuelve menos efectiva y aproximadamente del 40-70% de los pacientes desarrollan algunos efectos secundarios, que incluyen discinesias,

distonias y fluctuaciones en la efectividad del medicamento (Bastide *et al.*, 2015; Hurley y Jenner, 2006; Schrag y Quinn, 2000). El incremento en la presencia de dichos efectos secundarios se hace notar en los siguientes 10 años de tratamiento, en algunos estudios, hasta el 95% de los individuos presentaron alguna complicación motora (Ahlskog y Muentner, 2001). De hecho, es relevante mencionar que la L-DOPA no sólo es el tratamiento más efectivo para atenuar los síntomas de la EP, sino también en causar efectos secundarios motores, quizás peores que los que ocasiona la enfermedad en sí (Holloway and the Parkinson Study Group CALM Cohort Investigators, 2009; Rascol *et al.*, 2000).

ANTECEDENTES

Existen numerosos reportes que indican que la L-DOPA resulta tóxica para las neuronas dopaminérgicas, especialmente cuando se usa en concentraciones relativamente altas. A continuación, algunos de los estudios que soportan dicha aseveración:

Ya desde principios de los años noventa, se reportó que la administración crónica de L-DOPA aumentó notablemente la concentración de TBARS, indicador de peroxidación lipídica, en el estriado y corteza frontal de ratones lesionados por inyección de 6-OHDA. Estos resultados sugieren que la administración a largo plazo de L-DOPA contribuye a la progresión del daño neuronal en pacientes con EP (Ogawa *et al.*, 1993, 1994).

En células catecolaminérgicas PC12, la L-DOPA ocasiona muerte celular por apoptosis, pero se evitó cuando se agregaron diferentes antioxidantes, entre ellos ascorbato, α -tocoferol, GSH, y reactivos tiol, pero no con inhibidores de la MAO. Estos resultados sugieren que la muerte celular fue ocasionada por la generación

de ERO a partir de la auto-oxidación de la L-DOPA, no por un proceso enzimático (Offen *et al.*, 1996; Basma *et al.*, 1995).

Se incubaron cultivos primarios de células mesencefálicas con L-DOPA, lo que ocasionó la pérdida de neuronas dopaminérgicas debido a la generación de ERO y quinonas reactivas. Sin embargo, cuando se agregó ascorbato como antioxidante, se evitó la muerte celular inducida por L-DOPA y se previno la formación de quinonas de DOPA (Pardo *et al.*, 1995; Mytilineou *et al.*, 1993).

Más recientemente, en 2010 Sabens y colaboradores encontraron que en cultivos celulares de neuronas dopaminérgicas, la L-DOPA disminuyó la actividad de la glutaredoxina, tioredoxina (antioxidantes) y tioredoxin reductasa, implicadas en procesos de supervivencia celular. La inhibición de estas enzimas parece ocurrir por la generación de aductos en sus sitios activos, como consecuencia de la formación de quinonas de la L-DOPA o DA, resultando en el incremento de la muerte celular.

Cabe resaltar que la mayoría de estos estudios reportan resultados *in vitro*, pero no *in vivo*, lo cual quizás se deba al rápido proceso de fagocitosis de las células moribundas por las células intactas de los alrededores, como reportaron Walkinshaw y Waters (1995).

Sin embargo, también hay evidencia tanto clínica como experimental que sugiere que la L-DOPA no acelera la progresión de la enfermedad ni resulta tóxica y de hecho tiene efectos anti-oxidantes y neurotróficos:

En 2006, Agil y colaboradores midieron los niveles de peroxidación lipídica en pacientes con la EP que estaban siendo medicados con L-DOPA en comparación con un grupo control. Como era de esperarse, el grupo de pacientes con la EP presentó niveles de peroxidación lipídica en plasma más altos respecto al grupo

control, sin embargo, no encontraron relación dosis-dependiente respecto a la toma de la L-DOPA.

Por su parte, Lyras y colaboradores en 2002 analizaron el tejido de macacos sanos medicados a diario por un periodo de 13 semanas con altas dosis de L-DOPA en combinación con carbidopa y/o entacapona. Para ello, analizaron los cambios en los niveles de carbonilos de proteína (marcador de daño proteico), peroxidación lipídica y daño oxidativo al ADN. Los resultados mostraron un pequeño incremento en la peroxidación de lípidos, daño a proteínas y el uracilo 5-OH, pero no en otros productos de oxidación que potencialmente afectarían el ADN, para el grupo que recibió la L-DOPA+carbidopa (80mg/kg+20mg/kg) y para el grupo de L-DOPA/carbidopa/entacapona (80mg/kg+20mg/kg+80mg/kg). A pesar de esto, concluyen que los resultados no son contundentes para afirmar que la administración crónica del fármaco, incluso en altas dosis, pueda provocar daño oxidativo marcado.

En el 2000(b), Fornai y colaboradores examinaron los efectos de la administración crónica de L-DOPA en ratones intactos y tratados con MPTP para simular un modelo de EP. Ambos grupos recibieron la medicación diariamente con una dosis de 50 mg/kg, por un periodo de 5, 30, 60 y 90 días. Se midieron los niveles de metabolitos, los sitios de recepción y la cantidad de DA. No se observaron resultados significativos en los ratones intactos con respecto a los medicados con L-DOPA, a pesar de la ligera disminución en los niveles de DA estriatal en los días 5 y 30; sin embargo, dicho efecto no se repitió al administrar dosis mayores del medicamento (400 mg/kg) durante el mismo periodo.

Por su parte, Mena y colaboradores en 1998, encontraron que en cultivos celulares de la línea PC12, la L-DOPA ejerce un efecto sinérgico al co-administrarse con NGF (factor de crecimiento nervioso), el cual promueve el

crecimiento de neuritas y por lo tanto, mejora la función pre-sináptica. Asimismo, en un reporte previo de 1997, demostraron que la L-DOPA en co-cultivo de células mesencefálicas ventrales con cultivos de astrocitos corticales, ejerce efectos neurotróficos en las neuronas dopaminérgicas al protegerlas de la muerte celular y estimular la formación de neuritas, esto debido a la regulación de GSH por los astrocitos, cumpliendo además funciones antioxidantes. En un estudio realizado por Okazawa y colaboradores (1992) incluso se demostró el incremento en la expresión de ARNm para BDNF en el NE de ratones después de 2-16 horas de una única dosis oral de L-DOPA (0.2 mg/g peso corporal).

No obstante de toda la evidencia tanto a favor como en contra de la L-DOPA, en 2003 Mytilineou y colaboradores, notaron la falta de modelos *in vivo* e innovadoramente, reportaron que dicho fármaco sí produce toxicidad en cultivos de neuronas dopaminérgicas, pero no las daña ni causa cambios en los niveles de DA estriatal ni en sus metabolitos en ratas neonatas, incluso inhibiendo la síntesis de GSH, lo que ayudó a simular el estado deteriorado de los mecanismos de defensa que se presentan en la EP (inducción de estrés oxidativo).

Por si la falta de resultados concretos no era suficiente, en el 2004 “The Parkinson Study Group” presentó un estudio en el que se evaluaron a 361 pacientes que recibían una dosis diaria variable de L-DOPA por 40 semanas, luego de las cuales se les retiró el tratamiento por 2 semanas. Los resultados mostraron que el medicamento, o bien disminuye el progreso de la EP o incrementa los síntomas secundarios. Además con técnicas de neuroimagen a 142 de los pacientes, se encontró que acelera la pérdida de las terminales nerviosas nigroestriatales y sus efectos farmacológicos modifican al DAT. Por ello concuerdan en que las consecuencias de su administración a largo plazo son inciertas.

Con toda la evidencia presentada arriba, además de muchos más reportes, en 2008 Schaphira (a) presentó una revisión en la que concluye que, a pesar de que la L-DOPA tiene el potencial para generar radicales libres que activen vías oxidativas, existen limitaciones significativas de los modelos *in vitro* usados que evitan la extrapolación de dichos resultados a la clínica.

JUSTIFICACIÓN

Si bien la L-DOPA sigue siendo el tratamiento más usado y eficaz para atenuar los síntomas motores de la EP, aún es incierto si la administración crónica puede resultar perjudicial, debido a la correlación que se ha propuesto con la neurotoxicidad que el exceso de DA y/o L-DOPA pueden producir, esto debido a que la comunidad científica aún no ha logrado llegar a resultados contundentes que esclarezcan si, independientemente de los efectos secundarios, el medicamento contribuye o acelera la progresión de la enfermedad.

Aunque los experimentos en cultivos celulares abundan tanto a favor como en contra de la L-DOPA, hasta ahora es incierto si los resultados obtenidos *in vitro* puedan ser extrapolados a los procesos que ocurren *in vivo*, o son mera consecuencia de usar modelos inapropiados que favorecen los altos niveles de estrés oxidativo y excitotóxico.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Evaluar el efecto a nivel celular y molecular de la administración de L-DOPA en núcleos de los ganglios basales (SNc, NE, GP) y núcleos con innervación dopaminérgica (corteza e hipocampo) de ratas intactas

Objetivos particulares:

•Determinar si la administración del fármaco disminuye el número de neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra compacta de ratas intactas

•Establecer el efecto del fármaco en el número de espinas dendríticas del núcleo estriado, corteza e hipocampo de ratas intactas

•Comprobar si la administración del fármaco incrementa la peroxidación lipídica en la sustancia nigra, núcleo estriado, globo pálido, corteza e hipocampo de ratas intactas

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 20 ratas macho de la cepa Wistar, con un peso inicial de entre 180-200 g al inicio del experimento, mantenidas en periodos de luz/oscuridad de 12 horas, teniendo además libre acceso a agua y alimento.

Administración del fármaco:

Se formaron dos grupos: el experimental (n=12) al que se administró diariamente por vía oral 10 mg/kg de levodopa/carbidopa comercial (Sinemet),

durante un periodo de tres meses; y el grupo control (n=8) al que no se le dio medicación alguna.

Transcurridos los tres meses, se sacrificó a una parte de los roedores por perfusión intracardiaca (para impregnación de Golgi e inmunocitoquímica para TH), otra parte de los animales recibió una inyección letal de pentobarbital sódico, en este caso el tejido se empleó para medir peroxidación de lípidos; posteriormente se realizó la decapitación para extraer el cerebro y así obtener las siguientes estructuras: corteza, estriado, globo pálido, sustancia nigra e hipocampo.

Inmunocitoquímica para Tirosina Hidroxilasa (TH):

Para el conteo de neuronas dopaminérgicas, se obtuvieron de igual forma rebanadas del mesencéfalo de diez cerebros, cuatro del grupo control y seis del grupo medicado; para esta técnica se usaron cortes de 50 μm que fueron procesados con la técnica de inmunocitoquímica para TH, empleando el anticuerpo primario anti-TH 1:1000 (Millipore), usando diaminobenzidina como cromógeno y finalmente se montaron en portaobjetos gelatinizados, que posterior al secado, fueron cubiertos con resina sintética.

Se realizó el conteo de las neuronas positivas a TH localizadas en la SNc en los cortes resultantes. Se identificó a la sustancia nigra de acuerdo a González y Rodríguez (2000).

Impregnación de Golgi:

La técnica consiste en impregnación argéntica en la que se sumergen las muestras (rebanadas de 4 mm) en una mezcla de osmio-dicromato de potasio (OsO_4 0.3% $\text{K}_2\text{Cr}_{207}$ 2.7% en H_2O bidestilada) durante siete días a temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente las muestras son lavadas rápidamente con agua bidestilada y con nitrato de plata al 0.75%, se dejan 24 horas en la misma solución acuosa de nitrato de plata, para después realizar los cortes. Los fragmentos de tejido se encastran en parafina y se obtienen cortes de 100 μm , que se colocan secuencialmente en OH al 95% dos veces y OH al 100% dos veces por 10 minutos en cada uno; para aclarar el tejido se pasa a baño de eugenol 100% por 20 minutos y finalmente se pasa por xilol al 100%. Se procede entonces al montaje en un portaobjetos y se cubre con resina sintética y un cubreobjetos.

Para el conteo de las espinas dendríticas de las neuronas espinosas medianas del núcleo estriado, las neuronas piramidales de la corteza, así como las del hipocampo, se utilizaron diez cerebros de rata, cuatro del grupo control y seis del grupo medicado.

El conteo de las espinas dendríticas mediante microscopía de luz, se hizo en cuatro dendritas de diez neuronas por estructura por animal, en segmentos de 10 μm , posteriores a los cinco primeros de la dendrita secundaria a partir de la primera bifurcación, observando directamente el tejido con el objetivo de 40X.

Peroxidación de lípidos:

Después de sacrificar a los animales y obtener los cerebros por decapitación, se extrajo y separó el tejido de los núcleos de interés en un tubo Eppendorf y se les procesó con la técnica de TBARS. Finalmente, se realizó una lectura al

espectrofotómetro, en cubetas de cuarzo a 532 nm para determinar la cantidad de lípidos peroxidados respecto a la curva patrón; muestras del mismo tejido se emplearon para determinar proteínas con el método de Bradford.

Análisis estadístico:

Para evaluar el efecto de la medicación con L-DOPA en los animales, se analizaron los resultados obtenidos aplicando la prueba U de Mann-Whitney, considerándose una significancia mínima de $p < 0.05$

RESULTADOS

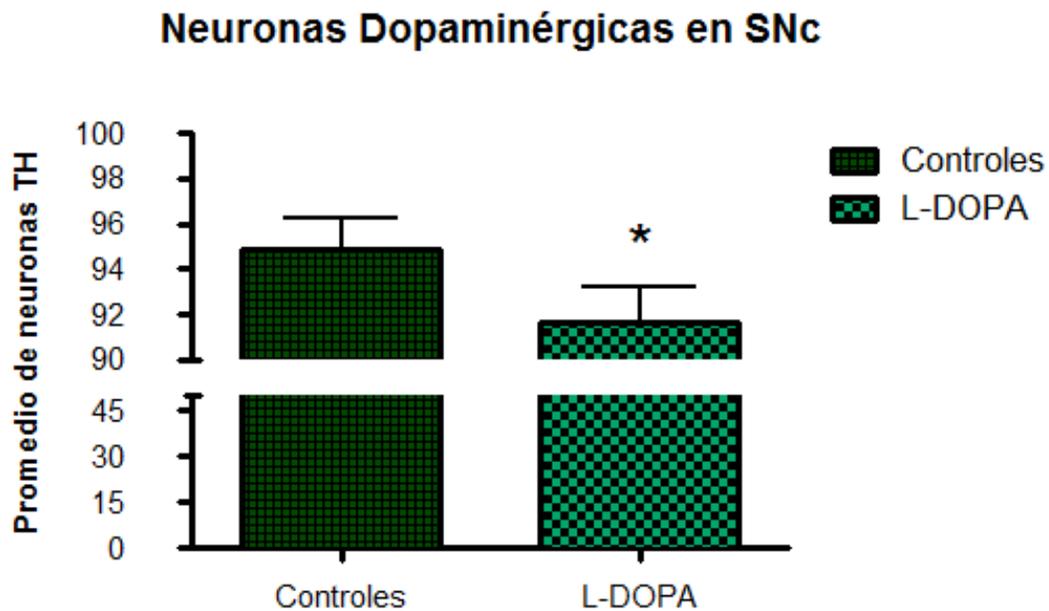
La administración de L-DOPA produjo las siguientes alteraciones a nivel histológico y molecular en los animales medicados: disminución del número de neuronas dopaminérgicas y en el número de espinas dendríticas, así como aumento en la cantidad de lípidos peroxidados en algunos de los núcleos evaluados.

Neuronas Inmunoreactivas a TH

Se realizó la técnica de inmunocitoquímica para hacer el conteo de células positivas a TH y determinar si el fármaco tiene algún efecto negativo en la sobrevivencia de las neuronas en la SNc (Los datos que se presentan son el promedio \pm EEM).

El conteo se llevó a cabo de forma bilateral y de acuerdo a lo que se puede observar en la gráfica 1 y la figura 6, se aprecia disminución significativa en el

promedio del número de neuronas dopaminérgicas del grupo medicado con L-DOPA durante 3 meses (91.62 ± 1.6), respecto al grupo control (94.82 ± 1.4).



Gráfica 1. Conteo bilateral de neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra compacta (SNc). Se representa el promedio \pm EEM. $*=p<0.05$ vs control

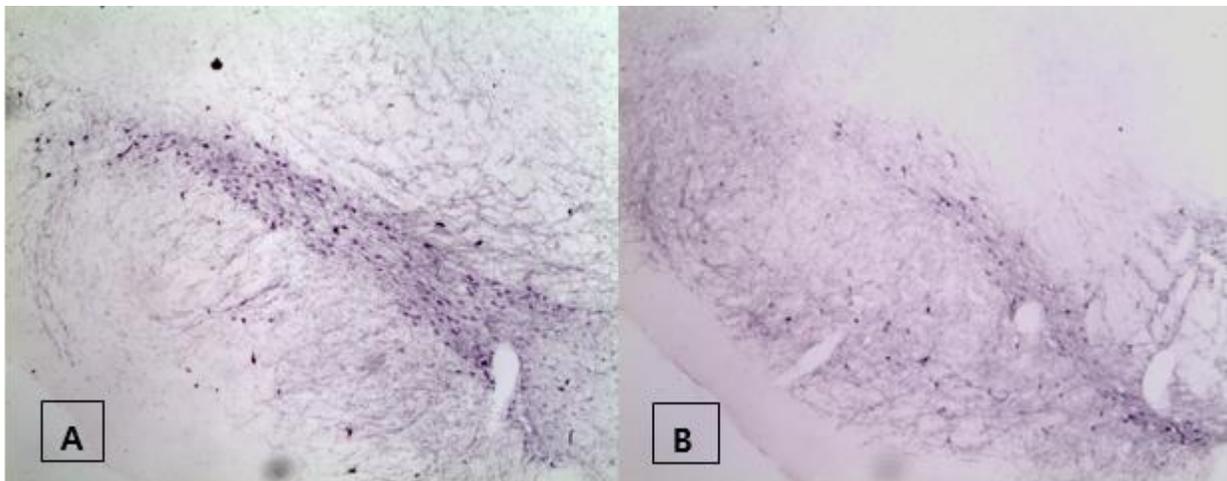


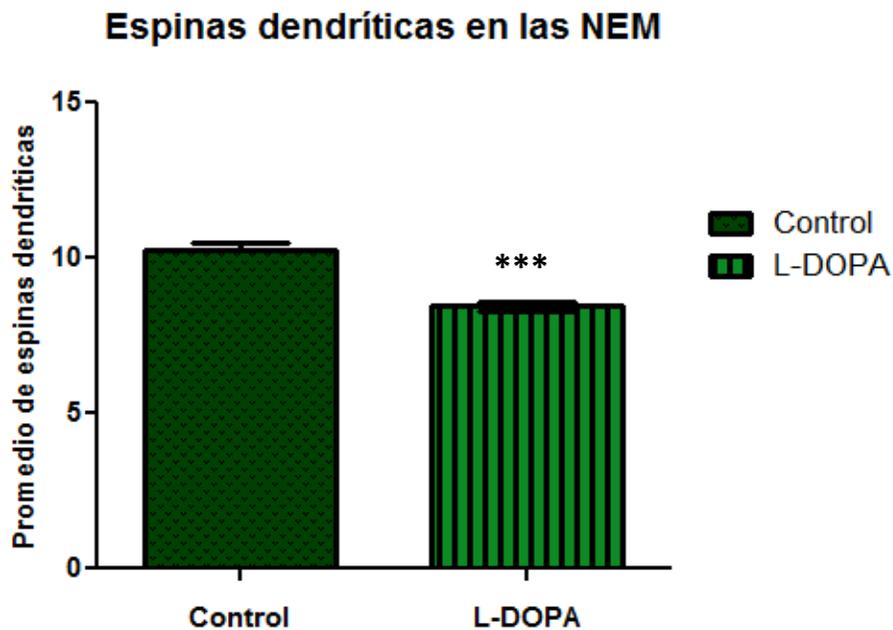
Figura 6. Micrografías de cortes coronales de la SNc, donde se aprecia la disminución del número de neuronas dopaminérgicas en los animales medicados con L-DOPA (B) respecto al grupo control (A). 10x.

Espinas dendríticas

Se realizó el conteo de las espinas dendríticas en las neuronas del NE, corteza motora e hipocampo para determinar si el tratamiento con L-DOPA provoca alteraciones a nivel estructural en dichos núcleos (se presentan los promedios \pm EEM). Todos los datos se compararon con el grupo control.

Núcleo estriado

En la gráfica 2 se muestra el promedio de espinas dendríticas en las NEM, el cual disminuyó de manera significativa (8.43 ± 0.15) en el grupo medicado con respecto al grupo control (10.27 ± 0.2).



Gráfica 2. Promedio del número de espinas dendríticas en neuronas espinosas medianas del NE. El conteo se realizó en una longitud de 10 micras de las dendritas secundarias de las neuronas. Se representa el promedio \pm EEM
***= $p < 0.001$ vs control

En la figura 7 se observan las micrografías de las NEM del NE del grupo control (A - D) cuya densidad de espinas es mayor que la del grupo que fue medicado con L-DOPA (E - H). Se incluyen imágenes de acercamientos al área de conteo.

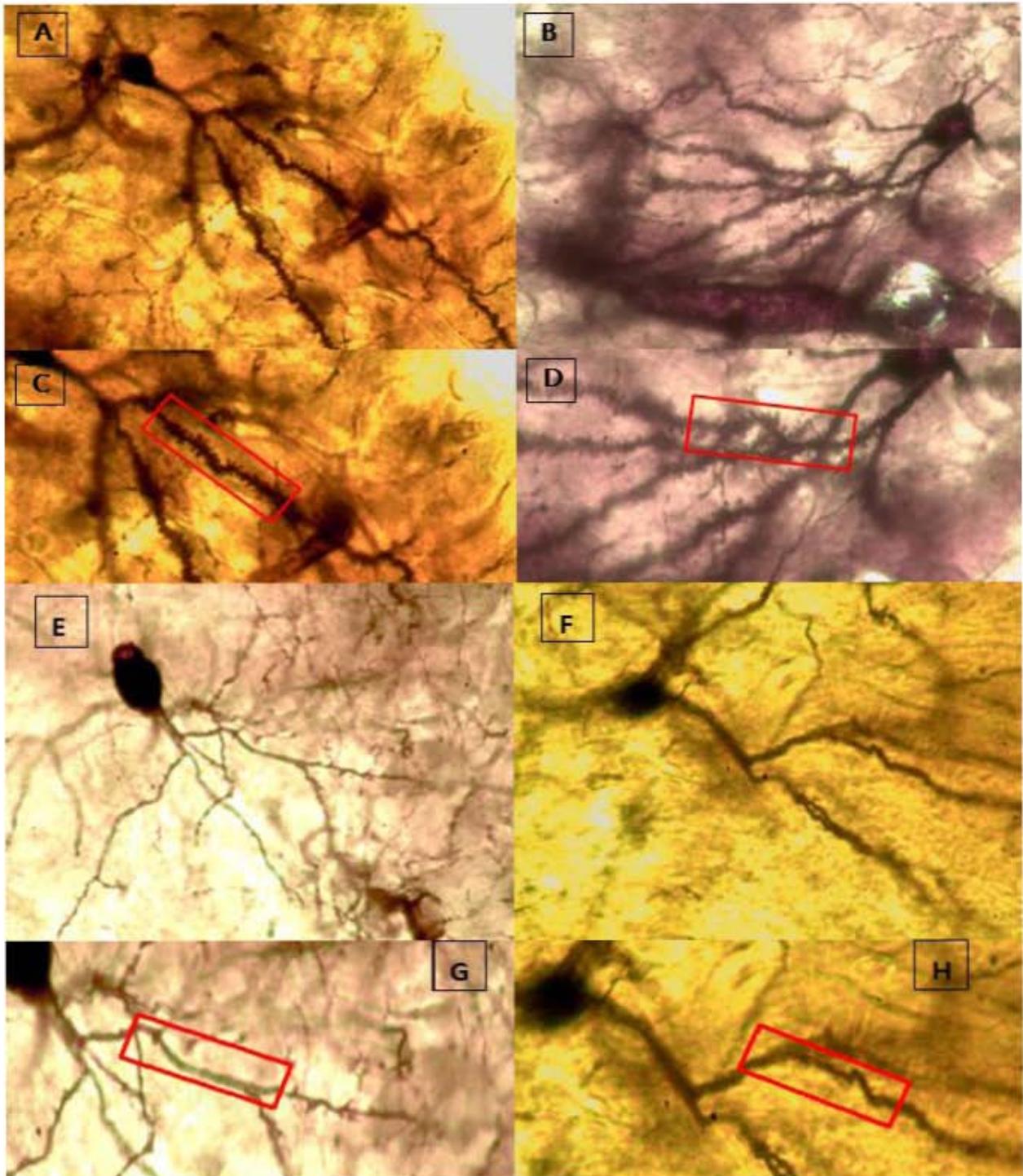


Figura 7. Micrográficas de neuronas espinosas medianas del núcleo estriado del grupo control (A-B) y el medicado con L-dopa (E-F) con acercamiento a la sección donde se realizó el conteo, señalada con el rectángulo rojo (C-D y G-H, respectivamente); 40x.

Corteza motora

Asimismo se contó el número de espinas en las neuronas piramidales de la corteza motora ubicadas en el área frontal medial. Al igual que en el NE, se encontró disminución significativa en la cantidad de espinas (10.27 ± 0.13) con respecto a las que presentó el grupo control (12.86 ± 0.12) (Gráfica 3).

En la figura 8 se muestran imágenes de las neuronas piramidales donde claramente se aprecia la densidad espinosa que mostró el grupo control y un acercamiento al área donde se realizó el conteo.

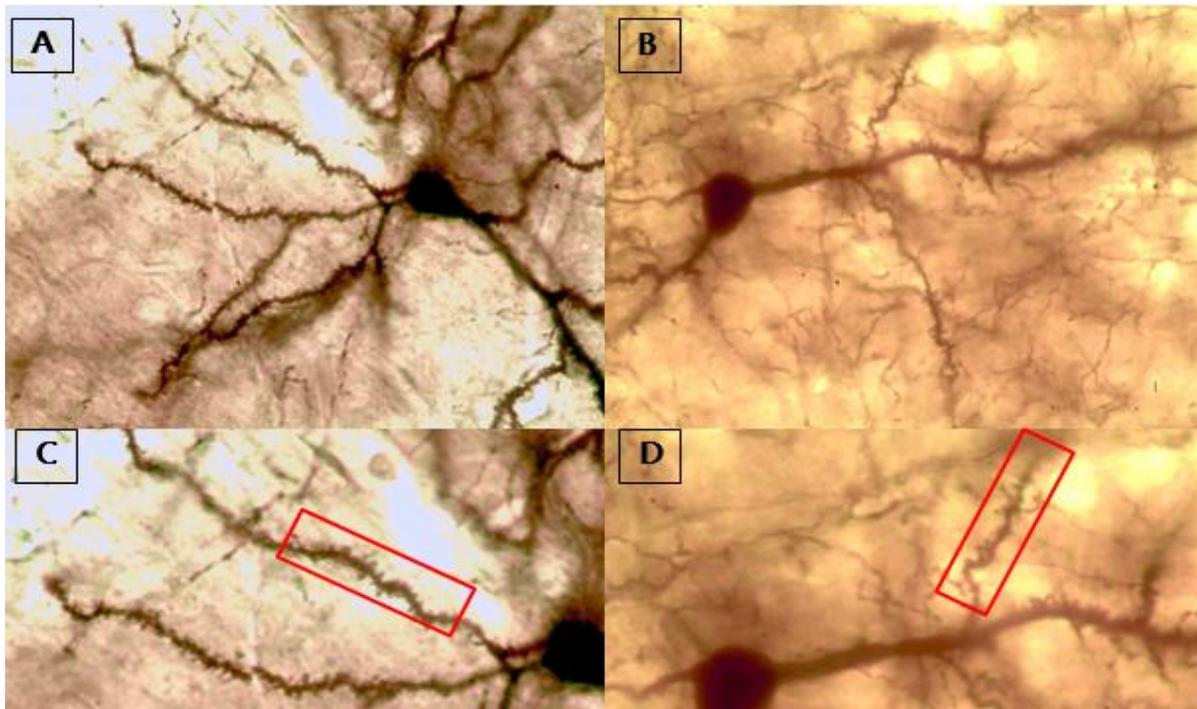


Figura 8. Micrográficas de neuronas piramidales en corteza motora (A y B) con acercamiento a la sección donde se realizó el conteo (C y D) en el grupo control; 40x.

En la figura 9 se presentan las fotografías de los cortes del grupo que recibió la L-DOPA así como el acercamiento al área de conteo, mostrando disminución en la densidad de espinas; si bien dentro de los objetivos no estaba el medir la longitud de las espinas, cabe destacar que se notó un ligero incremento en el tamaño de las mismas (Figura 9I).

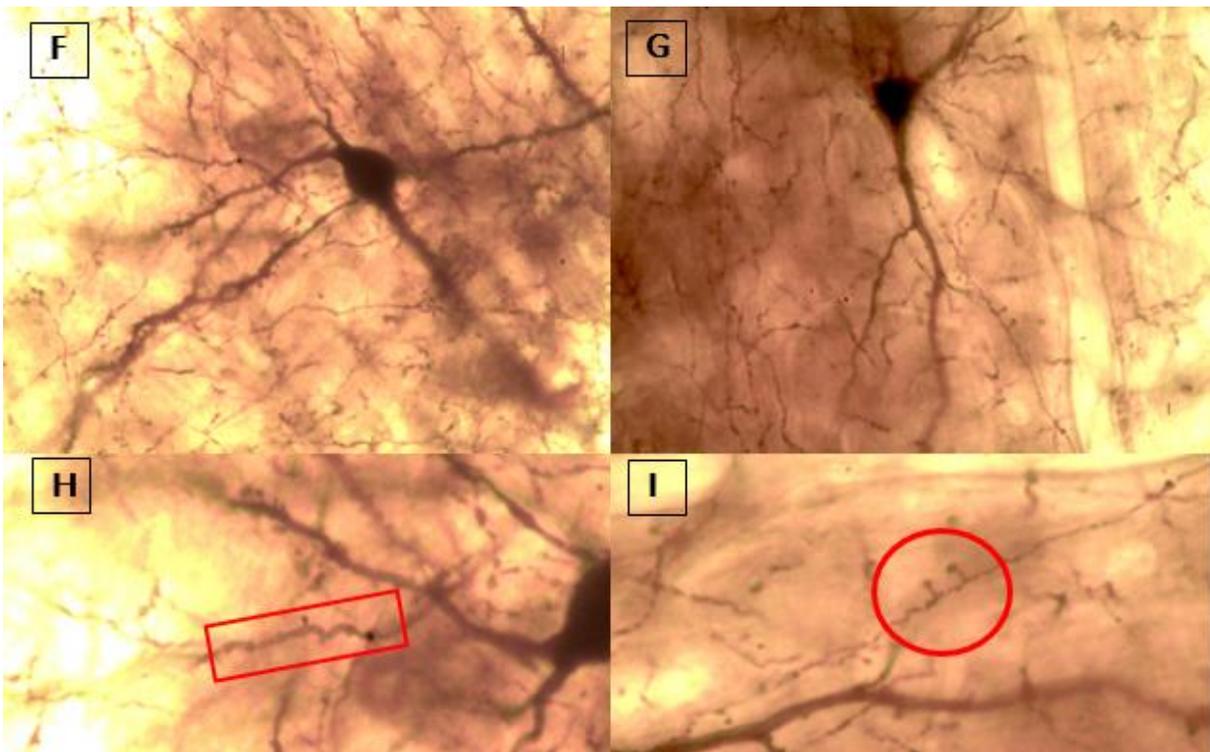
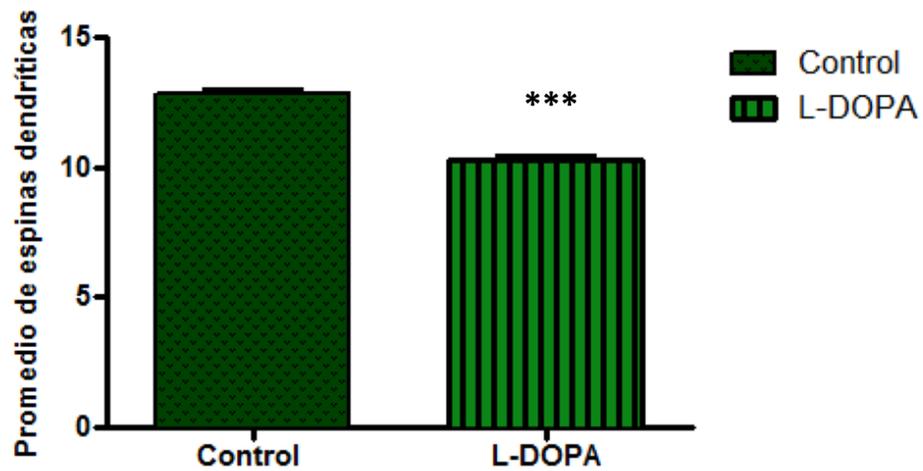


Figura 9. Micrografías de neuronas piramidales en corteza motora del grupo medicado por tres meses con L-DOPA (F y G) con acercamiento a la sección donde se realizó el conteo (H y I); 40x. Dentro del círculo rojo, se aprecia un notable incremento en el tamaño de las espinas dendríticas.

Espinas dendríticas en neuronas piramidales de Corteza motora

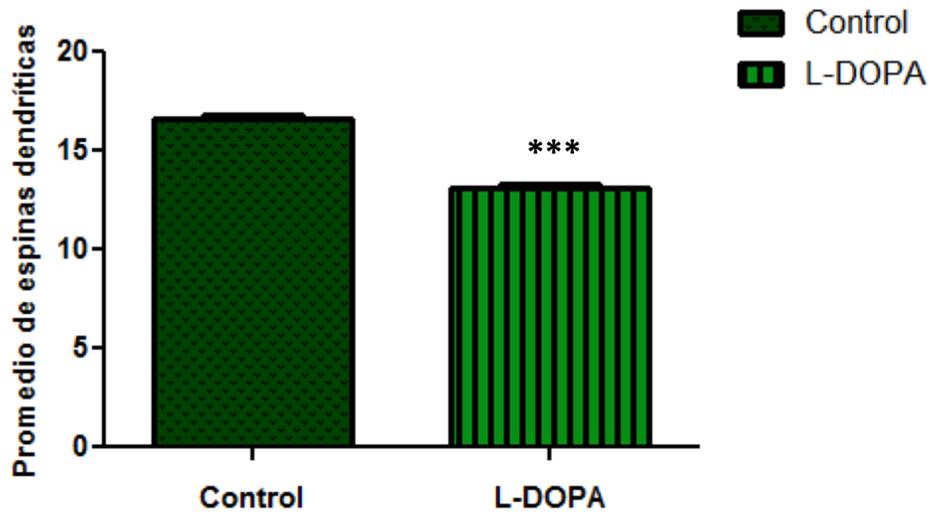


Gráfica 3. Promedio del número de espinas dendríticas en neuronas piramidales de la corteza motora. El conteo se realizó en una longitud de 10 micras de las dendritas secundarias de las neuronas. Se representa la media \pm EEM. ***= $p < 0.001$ vs control

Hipocampo

Finalmente se contabilizaron las espinas en las neuronas del hipocampo localizadas en las áreas C1 y C3, donde también se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos (resultados expresados en promedio \pm EEM. Experimental: 16.28 ± 0.18 ; Control: 11.77 ± 0.18).

Espinas dendríticas en neuronas piramidales de Hipocampo



Gráfica 4. Promedio del número de espinas dendríticas en neuronas piramidales del hipocampo. El conteo se realizó en una longitud de 10 micras de las dendritas secundarias de las neuronas. Se representa la media \pm EEM. ***= $p < 0.001$ vs control.

En la figura 10 se muestran las micrografías del grupo control (A, B), que presentó gran cantidad de espinas dendríticas y el grupo que recibió el tratamiento con L-DOPA (C,D), donde se aprecia que hay menor densidad espinosa. De igual manera se muestran los acercamientos a la parte donde se realizó el conteo de las espinas dendríticas.

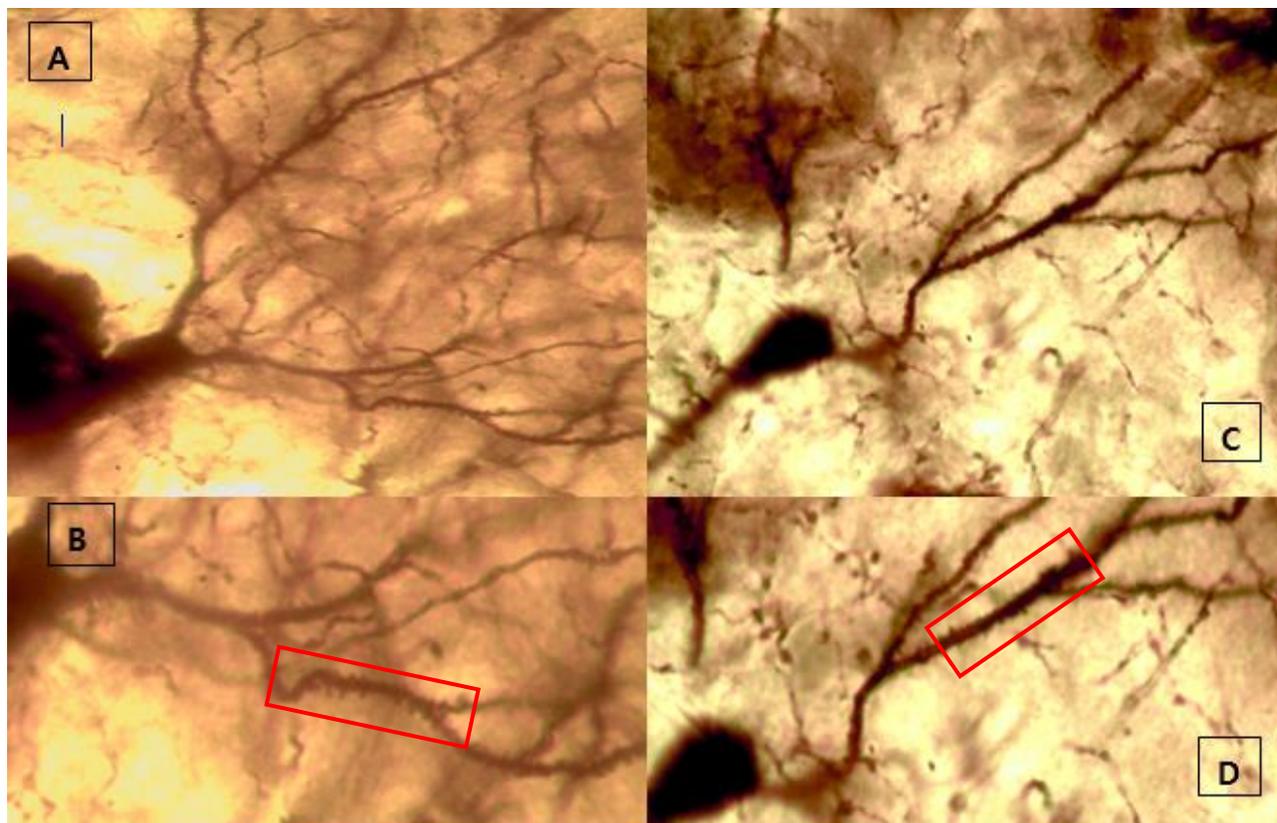
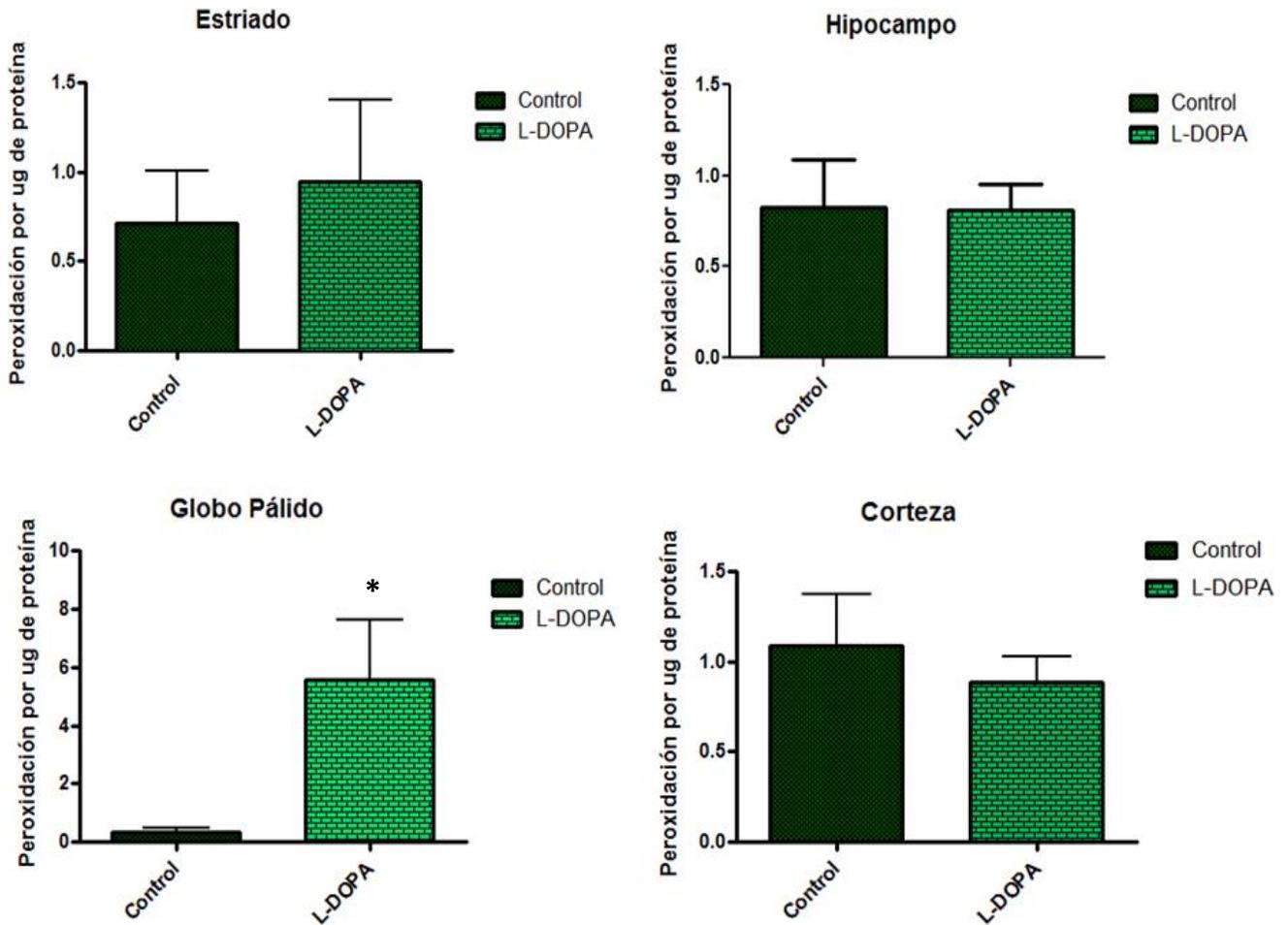


Figura 10. Micrografías de neuronas piramidales en hipocampo del grupo control (A) y del grupo medicado con L-DOPA (C) con acercamiento a la sección donde se realizó el conteo (B y D, respectivamente); 40x.

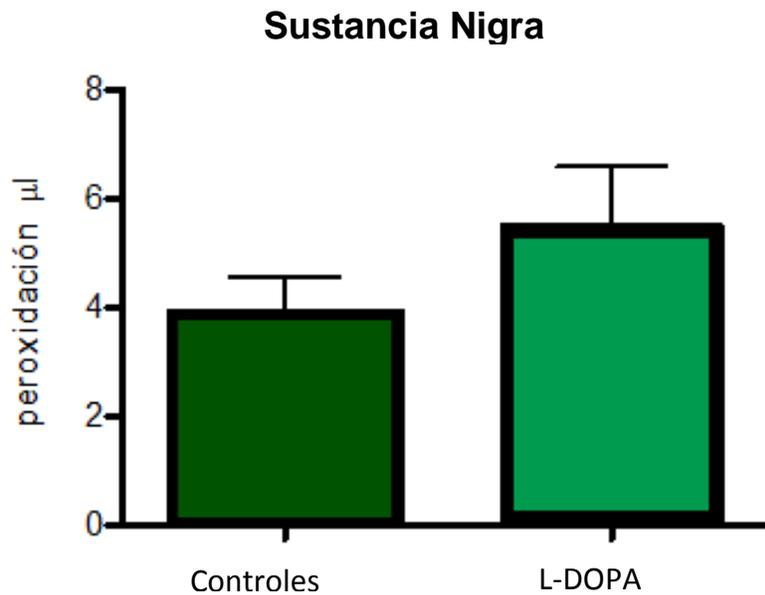
Peroxidación de lípidos

Asimismo, se determinó la cantidad de lípidos peroxidados (concentración de TBARS; se presentan los promedios \pm EEM) en el homogenizado de los núcleos cerebrales extraídos y como se puede observar en la gráfica 5, ésta aumentó de manera significativa (5.59 ± 2.04) con respecto al control únicamente en el globo pálido (0.33 ± 0.13), en comparación con los demás núcleos. Sin embargo, es importante destacar la evidente tendencia al incremento de TBARS en núcleos como el hipocampo, el estriado y la sustancia nigra.



Gráfica 5. Efecto del tratamiento con L-DOPA en distintos núcleos cerebrales de rata con respecto a la cantidad de lípidos peroxidados por μg de proteína. La diferencia sólo es significativa en el globo pálido (GP), sin embargo se observa cierta tendencia a que la cantidad aumente en el hipocampo y núcleo estriado. Se representan los promedios \pm EEM $*=p<0.05$ vs control

Los datos de la sustancia nigra se exponen por separado (gráfica 6) debido a que el resultado no se expresa en relación a la cantidad de proteína, ya que al ser tan pequeño el núcleo y por lo tanto obtener muestras mínimas, no se pudo realizar dicha técnica; para normalizar sólo se tomaron igual número de rebanadas disecadas.



Gráfica 6. Efecto del tratamiento con L-DOPA en la sustancia nigra de rata con respecto a la cantidad de lípidos peroxidados. Se presentan los promedios \pm EEM. $P < 0.05$ vs control

DISCUSIÓN

Los datos mostrados en este trabajo indican que en animales intactos que recibieron diariamente una dosis de L-DOPA (10 mg/kg) durante tres meses, hubo disminución significativa de la población de neuronas TH positivas a nivel de la SNc, disminución de espinas dendríticas en las neuronas de varios núcleos y un aumento significativo de la peroxidación lipídica.

Gran parte del exceso de la dopamina que se sintetiza por la administración de L-DOPA, se acumula en el citoplasma de la neurona y no dentro de las vesículas (Melamed, 1990) lo que puede provocar daño a causa del estrés oxidativo. Esto debido a que las catecolaminas que se auto-oxidan rápidamente

a pH citoplasmático por procesos no enzimáticos acelerados por hierro, formando quinonas reactivas de dopamina (DAQ), L-DOPA y $O_2^{\bullet-}$, el cual es subsecuentemente convertido a H_2O_2 por la SOD o reacciona con radicales de NO^{\bullet} para generar ONOO-, un agente en extremo oxidante y otros RL (Taylor *et al.*, 2013; Lipski *et al.*, 2012; Asanuma *et al.*, 2003; Przedborski *et al.*, 1993; Slivka y Cohen, 1985). Otro de los mecanismos implicados en su toxicidad es la unión covalente de las quinonas resultantes con sulfhidrilos, que pueden llevar a la inactivación de proteínas críticas en la supervivencia celular, modificando sus sitios activos (Sabens *et al.*, 2010; Lipski *et al.*, 2010; Graham, 1978). Khan y colaboradores (2005) incluso sugieren que resultan más peligrosas que las ERO y los RL, ya que además inhiben enzimas críticas en la función de la cadena transportadora de electrones, provocando la reducción del ATP disponible en la neurona, conduciendo al deterioro de la bomba Na^+/K^+ con las consecuencias tóxicas asociadas.

De particular importancia son los siguientes metabolitos: la TOPA quinona, que se genera extracelularmente y resulta tóxica para las neuronas dopaminérgicas e incluso neuronas no catecolaminérgicas (Newcomer *et al.*, 1995); DOPAL, producido por la MAO, que es altamente reactivo debido a la cantidad de aldehídos que posee en su estructura, que generan $\bullet OH$ y otros RL, (Fornai *et al.*, 2000a) y 3-O-metil-DOPA, que en pacientes con EP y modelos animales (ratas y monos) incrementa luego de la administración crónica de L-DOPA, provocando estrés oxidativo (Smith *et al.*, 2014; Tohgi *et al.*, 1991).

Por ello, retomando varios estudios previos, en 2003 Asuma y colaboradores concluyen que el tratamiento a largo plazo y con dosis relativamente altas de L-DOPA, promueve la formación de quinonas de DA y L-DOPA, lo que implicó la subsecuente citotoxicidad que se vio reflejada en los resultados de éste trabajo.

Como se mencionó, las neuronas dopaminérgicas de la SNc inervan varias estructuras además del NE, como el GP, la corteza y el tálamo (Mena *et al.*, 2004), por lo cual la toxicidad de la L-DOPA o DA sintetizada a partir de la misma, afecta a varios tipos celulares, entre ellos las neuronas estriatales y corticales (Kostrzewa *et al.*, 2002). De hecho se ha reportado que la L-DOPA incrementa la liberación de DA en varias regiones extraestriatales del cerebro como el globo pálido interno (GPi), el hipocampo y la corteza frontal (De Deurwaerdere *et al.*, 2016).

Loeffler y colaboradores (1998) demostraron que la administración de L-DOPA incrementa la síntesis de DA y sus metabolitos en regiones con inervación dopaminérgica mínima, así como en aquellas ampliamente inervadas; asimismo mostraron que la DA y sus productos metabólicos son eliminados más lentamente en regiones no dopaminérgicas. La lenta eliminación de DA se debe al bajo rango de recaptura en estas regiones y a que su degradación por medio de la MAO ocurre principalmente dentro de las terminales dopaminérgicas. Es por ello que regiones inervadas por la SN como el globo pálido y el hipocampo resultaron afectadas a pesar de no ser núcleos dopaminérgicos.

El hipocampo recibe proyecciones dopaminérgicas de la SNc y el AVT (Höglinger *et al.*, 2004; Gasbarri *et al.*, 1994), sin embargo a diferencia del NE, expresa pobremente o nada de DAT (Kwon *et al.*, 2008), por lo que al igual que en otras regiones cerebrales, como la corteza prefrontal, la recaptura de la DA extracelular depende de otros mecanismos, particularmente del NET, por el cual debe de competir con la norepinefrina y por lo tanto favorece el incremento en la cantidad de DA libre en el hipocampo, aumentando su susceptibilidad a los efectos del metabolismo de la L-DOPA/DA (Borgkvist *et al.*, 2012).

La AACD, enzima encargada de convertir la L-DOPA en dopamina, se localiza ampliamente en todo el cerebro, en algunas regiones con mayor concentración que otras. En contraste, la actividad de la MAO y la COMT se ha registrado ampliamente por todo el cerebro, promoviendo la conversión de DA en metabolitos y ERO. Además de que mientras más tiempo pasa la DA en el sistema, incrementa la posibilidad de que se generen productos de auto-oxidación.

En la misma línea, se demostró que la administración del fármaco por 40 días (50 mg/kg, intraperitonealmente) provocó la disminución de la actividad del Complejo I mitocondrial, pero dicho efecto se revierte en promedio a los siete días, lo que prueba que la salida del compuesto del sistema es lenta y si la administración se realiza de forma continua y por más tiempo como en éste trabajo, se satura impidiéndole recuperarse y provocando daño celular (Przedborski *et al.*, 1993).

Está bien establecido que la DA tiene un papel crítico en la integridad morfológica de las espinas dendríticas de las NEM, y si bien varios autores coinciden en que el exceso de dopamina por el abuso de drogas como la cocaína y la metanfetamina incrementan el número de espinas en las NEM (Li *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2006 y Singer *et al.*, 2009), debe tenerse en cuenta que cuando disminuye la cantidad de DA estriatal por la pérdida de neuronas dopaminérgicas, disminuye en consecuencia la densidad de espinas dendríticas en este núcleo (Villalba and Smith, 2010; Fasano *et al.*, 2013), como lo corroboraron los conteos de este trabajo.

En el caso de las neuronas piramidales de la corteza motora, Ueno y colaboradores (2014) reportan que al administrar de manera crónica 50 mg/kg

de L-DOPA dos veces al día por 14 días en ratas sanas, no encontraron disminución en el número de espinas en comparación con ratas que recibieron solución salina por el mismo lapso, sin embargo mencionan que previo a su publicación, no había otros trabajos que reportasen la disminución de la densidad de espinas en animales controles tratados con el fármaco. Midiéron también la longitud de las espinas y tampoco encontraron cambios respecto al control, pero señalaron el aumento de tamaño como un elemento clave respecto a la inducción de discinesias ocasionadas por la L-DOPA (Matzusaki *et al.*, 2001). Si bien en el presente trabajo no se midió la longitud de las espinas dendríticas, al realizar los conteos se pudo observó que las mismas eran ligeramente más largas que las de los controles.

Por otra parte, las estructuras lipídicas, en particular los ácidos grasos poliinsaturados, son los más propensos a la peroxidación lipídica que los saturados y los monoinsaturados debido a que los metilenos entre dos dobles ligaduras pueden perder fácilmente un hidrógeno, por ello son el principal blanco de las ERO y el estrés oxidativo resultante impacta severamente la función de los lípidos para mantener la fluidez y permeabilidad de las membranas celulares, así como promover la generación de subproductos que son químicamente muy activos, así como otros compuestos estables, entre ellos aldehídos reactivos como malonaldehído (MDA), 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) y 2-propenal e isoprostanos (Jiang *et al.*, 2016; Padurariu *et al.*, 2013; Hansberg, 2002).

En estudios previos se ha demostrado el daño que los productos metabólicos de la L-DOPA pueden ocasionar a nivel de peroxidación de lípidos. Ejemplo de ello es el trabajo que llevaron a cabo Nikolova y colaboradores (2016) en el que encontraron que la administración aguda del medicamento está involucrada en

los procesos de peroxidación lipídica, al encontrar los niveles de MDA aumentados tanto en el cerebro como en plasma de ratones sanos tratados con el fármaco. De hecho, otros autores corroboran que la administración del fármaco, solo o acompañado de un inhibidor de la descarboxilasa de L-DOPA, incrementa de manera significativa la peroxidación de lípidos en el mesencéfalo (Alirezai et. al., 2015).

Además, Rossab y colaboradores (1998), encontraron que la tasa de intercambio de fosfolípidos en la membrana de las neuronas dopaminérgicas es muy bajo y se refleja en la baja capacidad para reparar el daño oxidativo que ésta llega a sufrir.

En el mismo estudio de Loeffler mencionado previamente (1998), se midieron los niveles de MDA en varios núcleos cerebrales (mesencéfalo ventral, estriado, corteza frontal y cerebelo) luego de la administración de L-DOPA (100 mg/kg vía intraperitoneal, dosis única) en ratas. Contrario a lo que esperaban, encontraron que los niveles de MDA sólo aumentaron en el cerebelo y sugieren que esto se debe tanto a la sensibilidad del núcleo, como a que los mecanismos antioxidantes proveyeron la protección necesaria para evitar la peroxidación lipídica del resto, situación que cambiaría si la administración del fármaco hubiese sido crónica, como en el caso de este experimento.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran el efecto tóxico a nivel celular y molecular que la administración vía oral de L-DOPA tiene incluso en sistemas sanos:

-Si bien las neuronas dopaminérgicas en sí mismas son una población particularmente sensible, la administración crónica de la L-DOPA y el metabolismo de la misma, promovió el daño en estas células, mostrándose en la disminución significativa del número de neuronas en la SNc

-La disminución en el número de neuronas dopaminérgicas en la SNc, provocó el descenso en los niveles de DA que llega al estriado, probablemente causando a su vez la disminución en el número de espinas dendríticas en las NEM

- El globo pálido mostró un pronunciado incremento en la cantidad de lípidos peroxidados y el estriado, la corteza y el hipocampo disminución del número de espinas dendríticas, probablemente porque la administración del fármaco aumentó la disponibilidad de DA en el sistema, al igual que de sus productos metabólicos. La eliminación de estos metabolitos es más lenta en núcleos no dopaminérgicos, haciéndolos más lábiles a sufrir daño a nivel molecular.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdullah R., Basak I., Patil K., Alves G., Larsen J.P. and Geir-Moller S. 2014. Parkinson's disease and age: The obvious but largely unexplored link. *Exp. Geronto*
- Agil A., Durán R., Barrero F., Morales B. Araúzo M., Alba F., Miranda M.T., Prieto I., Ramírez M. and Vives F. 2006. Plasma lipid peroxidation in sporadic Parkinson's disease. Role of the L-dopa. *J. of the Neurol. Sci.* 240, 31-36
- Ahlskog J.E. 2003. Slowing Parkinson's disease progression: recent dopamine agonist trials. *Neurology* 60 (3) 381-389
- Albin R.L., Young A.B. and Penney J.B. 1989. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci.* 12, 366-375
- Alirezaei M., Khoshdel Z., Dezfoulian O., Rashidipour M., and Taghadoshi V. 2015. Beneficial antioxidant properties of betaine against oxidative stress mediated by levodopa/benserazide in the brain of rats. *J. Physiol. Sci.*
- Aloisi F. 1999. The role of microglia and astrocytes in CNS immune surveillance and immunopathology. *Adv. Exp. Med. Biol.* 468, 123-133
- Andersen J.K. 2004. Oxidative stress in neurodegeneration: case or consequence? *Nat. Med.* 10, S18-S25
- Arai R., Karasawa N., Geffard M. and Nagatsu I. 1995. L-DOPA is converted to dopamine in serotonergic fibers of the striatum of the rat: a double-labeling immunofluorescence study. *Neurosci. Lett.* 195, 195-198
- Asuma M., Miyazaki I. and Ogawa N. 2003. Dopamine- or L-DOPA-induced neurotoxicity: The role of dopamine quinone formation and tyrosinase in a model of Parkinson's disease. *Neurotox. Res.* 5 (3) 165-176
- Bahena T.R., Flores G. y Arias-Montaña J.A. 2000. Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central. *Rev. Biomed.* 11: 39-60
- Bartels A.L. and Leenders K.L. 2009. Parkinson's disease: the syndrome, the pathogenesis and pathophysiology. *Cortex* 45, 915-921
- Bartholini G., Burkard W., Pletscher A. and Bates H.M. 1967. Increase of cerebral catecholamines caused by 3,4-dihydroxyphenylalanine after inhibition of peripheral decarboxylase. *Nature* 215, 852-853
- Basma A.N., Morris E.J., Nicklass W.J. and Geller H.M. 1995. L-dopa cytotoxicity to PC12 cells in culture is via its autoxidation. *J. Neurochem.* 64, 825-832
- Bastide M.F., Meissner W.G., Picconi B., Fasano S., Ferafud P.O., Feyder M., Francardo V., Alcacer C., Ding Y., Branbilla R., Fisone G., Jon Stoessl A., Bourdenx M., Engeln M., Navailles S., De Deurwaerdere P., Ko W.K., Simola N., Morelli M., Groc L., Rodríguez M.C., Gurevich E.V., Quik M., Morari M., Mellone M., Gardoni F., Tronci E., Ghehl D., Tison F., Crossman A.R., Kang U.J., Steece C.K., Fox S., Carta M y Bezard E. 2015.

Pathophysiology of L-dopa induced motor and non-motor complications in Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* 132, 96-168

- Berman S.B. and Hastings T.G. 1999. Dopamine oxidation alters mitochondrial respiration and induces permeability transition in brain mitochondria: implications for Parkinson's disease. *J. Neurochem* 73, 1127-1137
- Birkmayer W. and Hornykiewicz O. 1962. The L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) effect in Parkinson's syndrome in man: on the pathogenesis and treatment of Parkinson akinesia. *Arch. Psychiatr. Nervenkr. Z. Gesamte. Neurol. Psychiatr.* 203, 560-574
- Björkblom B., Adilbayeva A., Maple-Grodem J., Piston D., Ökvist M., Xu X.M., Brede C., Larsen J.P. and Moller S.G. 2013. Parkinson's disease protein DJ-1 binds metals and protects against metal-induced cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* 208, 22809- 22820
- Bolam J.P, Brown M.T., Moss J. and Magill P.J. 2009. Basal Ganglia: Internal organization. *Encyclopedia of Neuroscience*: p. 98
- Borgkvist A., Malmlöf T., Feltmann K., Lindskog M. and Schilström B. 2012. Dopamine in the hippocampus is cleared by the norepinephrine transporter. *Intern. J. of Neuropsychopharmacology* 15, 531-540
- Braak H., Del Tredici K., Rüb U., de Vos R., Jansen Steur ENH and Braak E. 2003. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging* 24: 197-211
- Braak H., Ghebremedhin E., Rub U., Bratzke H. and Del Tredici K. 2004. Stages in the development of Parkinson's disease related pathology. *Cell Tissue Res.* 318: 121-134
- Braak H., Rub U. and Del Tredici K. 2006. Cognitive decline correlate with neuropathological stage in Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci.* 248, 255-258
- Brieger K., Schiavone S., Miller Jr. F. and Krause K.H. 2012. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med. Wkly.* 142, w13659
- Caudle W.M. and Zhang J. 2009. Glutamate, excitotoxicity, and programmed cell death in Parkinson disease. *Exp. Neurol.* 220 (2) 230-233
- Chen C.S. Chao H.T., Pan R.L. and Wei Y.H. 1997. Hydroxyl radical-induced decline in motility and increase in lipid peroxidation and DNA modification in human sperm. *Biochem. Mol. Biol. Intl.* 43: 291-303
- Cho D.H., Nakamura T. and Lipton S.A. 2010. Mitochondrial dynamics in cell death and neurodegeneration. *Cell. Mol. Life Sci.* 67 (20) 3435-3447
- Cotzias G.C., Papavasiliou P.S. and Gellene R. 1969. Modification of parkinsonism- chronic treatment with L-dopa. *J. of Med.* 280 (7) 337-345
- Coyle J.T., and Puttfarcken P. 1993. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 262 (5124) 689-695
- Dauer W. and Przedborski S. 2003. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39 (6) 889-909

- De Deurwaerdere P., Di Giovanni G. and Millan M.J. 2016. Expanding the repertoire of L-DOPA's actions: A comprehensive review of its functional neurochemistry. *Prog. Neurobiol.*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2016.07.002>
- de Lau L.M. and Breteler M.M. 2006. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 5 (6) 525-535
- Debeir T., Ginestet L., François C., Laurens S., Martel J.C., Chopin P., Marien M., Colpaert F. and Vozari R. 2005. Effect of intrastriatal 6-OHDA lesion on dopaminergic innervation of the rat cortex and globus pallidus. *Exp. Neurol.* 193, 444-454
- Diem-Zangerl A., Seppi K., Oberaigner W. and Poewe W. 2010. Mortality in Parkinson's disease, a 20-year follow up study. *Mov. Disord.* 25: 661-662
- Dorado C., Vargas C. y Rivas S. 2003. Estrés oxidativo y neurodegeneración. *Rev. Fac. Med. UNAM* Vol. 46 (6) Noviembre-Diciembre.
- Eisenhofer G., Kopin I.J. and Goldstein D.S. 2004. Catecholamine metabolism: a contemporary view with implications for physiology and medicine. *Pharmacol. Rev.* 56, 331-349
- Fahn S. and Cohen G. 1992. The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it. *Ann. Neurol.* 32 (6) 804-812
- Fahn S., Oakes D., Shoulson I., Kieburtz K., Rudolph A. and Lang A. 2004. Levodopa and the progression of Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.*, 351, 2498-508
- Fasano C., Bourque M.J., Lapointe G., Leo D., Thibault D., Haber M., Kortleven C., DesGroseillers L., Murai K.K. and Trudeau L.E. 2013. Dopamine facilitates dendritic spine formation by cultured striatal medium spiny neurons through both D1 and D2 dopamine receptors. *Neuropharmacology* 67, 432-443
- Floyd R.A. 2009. Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 222 (3) 236-245
- Fornai F., Giorni F.S., Bassi L., Ferrucci M., Alessandri M.G. and Corsini G.U. 2000(a). Modulation of dihydroxyphenylacetaldehyde extracellular levels in vivo in the rat striatum after different kinds of pharmacological treatment. *Brain Res.* 861 (1), 126-134
- Fornai F., Battaglia G., Gesi M., Giorgi F.S., Orzi F., Nicoletti F. and Ruggieri S. 2000(b). Time-course and dose-response study on the effects of chronic L-DOPA administration on striatal dopamine levels and dopamine transporter following MPTP toxicity. *Brain Res.* 887, 110-117
- Gao H.M., Zhang F., Zhou H., Kam W., Wilson B. and Hong J.S. 2011. Neuroinflammation and alpha-synuclein dysfunction potentiate each other, driving chronic progression of neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease. *Environ. Health Perspect.* 119 (6) 807-814
- Gasbarri A., Verney C., Innocenzi R. and Campana E. 1994. Mesolimbic dopaminergic neurons innervating the hippocampal formation in the rat: a combined retrograde tracing and immunohistochemical study. *Brain Research* 668, 71-79

- Gerhard A., Pavese N., Hotton G., Turkheimer F., Es M., Hammers A., Eggert K., Oertel W., Banati R.B. and Brooks D.J. 2006. In vivo imaging of microglial activation with [11C](R)-PK11195 PET in idiopathic Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* 21 (2) 404-412
- Gilbert D.L. and Colton C.A. 1999. Reactive Oxygen Species in Biological Systems: An Interdisciplinary Approach. *Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York, USA.*
- Giroux ML. 2007. Parkinson disease: Managing a complex, progressive disease at all stages. *Cleav Clin J Med* 74: 313-328
- Goldstein D.S. 2013. Biomarkers, mechanisms, and potential prevention of catecholamine neuron loss in Parkinson's disease. *Adv. Pharmacol. (San Diego, Calif.)* 68, 235-272
- González H.T., Cruz M.I., Alfonso O.D., Salas H.J., and Castro H. J. 2010. Vulnerability of mesostriatal dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Front. Neuroanat.* 4 (140) 1-14
- González H.T. y Rodríguez M. 2000. Compartmental organization and chemical profile of dopaminergic and GABAergic neurons in the substantia nigra of the rat. *J. Comp. Neurol.* 421: 107-135
- Graham D.G. 1978. Oxidative pathways for catechocamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones. *Mol. Pharmacol.* 14 (4), 633-643
- Graybiel A.M., Aosaki T., Flaherty A.W. and Kimura M. 1994. The basal ganglia and adaptive motor control. *Science* 265, 1826-1831
- Gubellini P., Picconi B., Di Filippo M. and Calabresi P. 2010. Downstream mechanisms triggered by mitochondrial dysfunction in the basal ganglia; from experimental models to neurodegenerative diseases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1802, 151-161
- Gupta A., Dawson V.L. and Dawson T.M. 2008. What causes cell death in Parkinson's disease? *Ann. Neurol.* 64 (Suppl. 2) S3-S15
- Haber F. and Weiss J. 1934. The catalytic decomposition of H₂O₂ by iron salts. *Proc. Royal Soc. London (Biol.)* 147: 332-351
- Hansberg T.W. 2002. Biología de las especies de oxígeno reactivas. Mensaje Bioquímico. Cea Bonilla A, del Arenal Mena I.P., Riveros Rosas H., Vázquez-Contreras E. (eds). Vol. XXVI. UNAM, México.
- Hastings T.G. 2009. The role of dopamine oxidation in mitochondrial dysfunction: implications for Parkinson's disease. *J. Bioenerg. Biomembr.* 41 (6) 469-472
- Hindle J. 2010. Ageing, neurodegeneration and Parkinson's disease. *Age Aging* 39: 156-161
- Hirsch E.C., Vyas S. and Hunot S. 2012. Neuroinflammation in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 18 (Suppl. 1) S210-S212
- Hirsch E.C. and Hunot S. 2009. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet Neurol.* 8, 382-387
- Ho P.W., Ho J.W., Liu H.F., So D.H., Tse Z.H., Chan K.H., Ramsden D.B. and Ho S.L. 2012. Mitochondrial neuronal uncoupling proteins: a target for potential disease-modification in Parkinson's disease. *Transl. Neurodegener.* 2, 1-3

- Höglinger G., Rizk P., Muriel M., Duyckaerts C., Oertel W., Caille I. and Hirsch E. 2004. Dopamine depletions impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nature publishing group*
- Holloway R., the Parkinson Study Group CALM Cohort Investigators. 2009. Long-term effect of initiating pramipexole vs levodopa in early Parkinson disease. *Arch. Neurol.* 66 (5) 563-570
- Hurley M.J. and Jenner P. 2006. What has been learnt from study of dopamine receptors in Parkinson's disease? *Pharmacol. And Therap.* 111, 715-728
- Jankovic J. and Stacy M. 2007. Medical management of levodopa-associated motor complications in patients with Parkinson's disease. *CNS Drugs* 21 (8) 677-692
- Jenner P. 2007. Oxidative stress and Parkinson's disease. *Handb. Clin. Neurol.* 83, 507-520
- Jiang T., Qian S. and Chen S. 2016. Oxidative stress: A major pathogenesis and potential therapeutic target of antioxidative agents in Parkinson's disease and Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.* 147, 1-19
- Kandel E.R., Schwarts J.H. and Jessell T.M. (2000). The Basal Ganglia. En *Principles of Neural Science* 4th ed. (p. 855). The McGraw-Hill Companies, Estados Unidos.
- Khan F.H., Sen T., Maiti A.K., Jana S., Chatterjee U. and Chakrabarti S. 2005. Inhibition of rat brain mitochondrial electron transport chain activity by dopamine oxidation products during extended in vitro incubation: Implications for Parkinson's disease. *Biochem. Biophys. Acta.* 1741, 65-74
- Kordower J.H. and Goetz C.G. 1999. The first miracle in neurodegenerative disease: The discovery of oral levodopa. *Brain Res. Bull.* 50, 377-378
- Kostrzewa R.M., Kostrzewa J.P. and Brus R. 2002. Neuroprotective and neurotoxic roles of levodopa (L-DOPA) in neurodegenerative disorders relating to Parkinson's disease. *Amino acids* 23: 57-63
- Kuhn D.M., Arthur R.E., Thomas D.M. and Elferink L.A. 1999. Tyrosine hydroxylase is inactivated by catechol-quinones and converted to a redox-cycling quinoprotein: possible relevance to Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 73, 1309-1317
- Kwon O., Paredes D., González C.M. and Neddens J. 2008. Neuroregulin-1 regulates LTP at CA1 hippocampal synapses through activation of dopamine D4 receptors. *Proceed of the Nat Ac of Sci*, 105, 1587-1592
- Lang A.E. and Obeso J.A. 2004. Challenges in Parkinson's disease: restoration of the nigrostriatal dopamine system is not enough. *Lancet Neurol.* 3: 309-316
- Lau A. and Tymianksi M. 2010. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 460, 525-542
- Lee J.K., Tran T. and Tansey M.G. 2009. Neuroinflammation in Parkinson's disease. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 4 (4) 419-429
- Lee K.W., Kim Y., Kim A.M., Helmin K., Nairn A.C. and Greengard P. 2006. Cocaine-induced dendritic spine formation in D1 and D2 dopamine receptor-containing medium spiny neurons in nucleus accumbens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 3399-3404

- Lees A.J., Hardy J. and Revesz T. 2009. Parkinson's disease. *Lancet* 373 (9680) 2055-2066
- Li Y., Kolb B. and Robinson T.E. 2003. The location of persistent amphetamine-induced changes in the density of dendritic spines of medium spiny neurons in the nucleus accumbens and caudate-putamen. *Neuropsychopharmacology* 28, 1082-1085
- Licker V. and Burkhard P.R. 2014. Proteomics as a new paradigm to tackle Parkinson's disease research challenges. *Transl. Proteom.* (4) 1-17
- Lipski J., Nistico R., Berretta N., Guatteo E., Bernardi G. and Mercuri N.B. 2012. L-DOPA: a scapegoat for accelerated neurodegeneration in Parkinson's disease? *Prog. Neurobiol.* 94 (4) 389-407
- Lipski J., Guatteo E., McKerney J., Yee A., Cucchiaroni M.L., Beretta N. and Mercury N.B. 2010. Excitatory action of L-DOPA in the substantia nigra pars compacta (SNc) – a contributing factor to neurotoxicity?
- Liu T.Z., Lin T.F., Chiu D.T., Tsai K.J. and Stern A. 1997. Palladium or platinum exacerbates hydroxyl radical mediated DNA damage. *Free Radical Biol. Med.* 23: 155-161
- Loeffler D.A., LeWitt P.A., Juneau P.L., Camp D.M., Arnold L.A. and Hyland K. 1998. Time-dependent effects of levodopa on regional brain dopamine metabolism and lipid peroxidation. *Brain Res Bulletin* 47, 6. 663-667
- Malgor L.A. y Valsecia M.E. (s.f.) *Farmacología Médica* Vol. IV, cap. 5
- Martikainen K.K., Luukkaala T.H. and Marttila R.J. 2006. Parkinson's disease and working capacity. *Mov. Disord.* 21: 2187-2191
- Martín G. A. 2007. El peróxido de hidrógeno como mediador en el proceso de contracción-relajación. Estudios *in vitro* e *in vivo*. Tesis para obtener el grado de Doctor. Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina. Universidad de Alcalá.
- Martin I., Dawson V.L. and Dawson T.M. 2011. The impact of genetic research on our understanding of Parkinson's disease. *Prog. Brain Res.* 183, 21-41
- Martino R., Candundo H., van Lieshout P., Shin S., Crispo J. and Barak-Haddad C. 2016. Onset and progression factors in Parkinson's disease: A systematic review. *NeuroToxicology* 1-10
- Matzusaki M., Ellis G.C., Nemoto T., Miyashita Y., Iino M. and Kasai H. 2001. Dendritic spine morphology is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nat. Neurosci.* 4, 1086-1092
- McGeer P.L., Itagaki S., Boyes B.E. and McGeer E.G. 1998. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* 38 (8) 1285-1291
- Medawar P.B. 1948. Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *Br. J. Exp. Pathol.* 29 (1) 58-59
- Melamed E. 1990. Interactions of exogenous L-DOPA with nigrostriatal dopaminergic neurons in Parkinson's disease. In: Streifler M.B., Korczyn A.D., Melamed E., Youdim M.B.H., eds. *Parkinson's disease. Anatomy, pathology and therapy*. New York: Raven Press. pp. 61-66

- Mena M.A., Davila V. and Sulzer D. 1997. Neurotrophic effects of L-DOPA in postnatal midbrain dopamine neuron/cortical astrocyte cocultures. *J. Neurochem.* 69, 1398-1408
- Mena M.A., Davila V., Bogalovsky J. and Sulzer D. 1998. A synergistic neurotrophic response to L-Dyhydrophenylalanine and nerve growth factor. *Mol. Pharm.* 54, 678-686
- Mena S.J., Bolam J.P. and Magill P.J. 2004. Pedunculopontine nucleus and basal ganglia: distant relatives or part of the same family? *Trends Neurosci* 27, 585-588
- Mercuri N.B. and Bernardi G. 2005. The “magic” of L-dopa: why is it the gold standard Parkinson’s disease therapy? *Trends Pharmacol. Sci.* 26 (7) 341-344
- Miyamoto J.K., Uezu E. and Terashima S. 1991. Active transport pumps of HVA and DOPAC in dopaminergic nerve terminals. *Physiol. Behav.* 49, 141-147
- Miyasaki I. and Asanuma M. 2008. Dopaminergic neuron-specific oxidative stress caused by dopamine itself. *Acta Med. Okayama.* 62 (3) 141-150
- Mogi M., Harada M., Kondo T., Riederer P. and Nagatsu T. 1995. Brain beta 2-microglobulin levels are elevated in the striatum in Parkinson’s disease. *J. Neural. Transm. Park Dis. Dement Sect.* 9 (1) 87-92
- Mounsey R.B. and Teismann P. 2010. Mitochondrial dysfunction in Parkinson’s disease: pathogenesis and neuroprotection. *Parkinsons Dis.* 2011 (617472) 1-1
- Myohanen T.T., Schendzielorz N. and Mannisto P.T. 2010. Distribution of catechol-O-methyltransferase (COMT) proteins and enzymatic activities in wild-type and soluble COMT deficient mice. *J. Neurochem.* 113, 1632-1643
- Myrthri R.B., Venkateshappa C., Harish G., Mahadevan A., Muthane U.B., Yasha T.C., Srinivas Bharath M.M., and Shankar S.K. 2011. Evaluation of markers of oxidative stress, antioxidant function and astrocytic proliferation in the striatum and frontal cortex of Parkinson’s disease brains. *Neurochem. Res.* 36 (8) 1452-1463
- Mytilineou C., Han S.K. and Cohen G. 1993. Toxic and protective effects of L-dopa on mesencephalic cell cultures. *J. Neurochem.* 61, 1470-1478
- Mytilineou C., Walker R.H., Jnobaptiste R. and Olanow C.W. 2003. Levodopa is toxic to dopamine neurons in an in vitro but not in vivo model of oxidative stress. *J. Pharm. And Exp. Therap.* 304 (2) 792-800
- Nagatsu T. and Sawada M. 2009. L-dopa therapy for Parkinson’s disease: Past, present and future. *Park. And Rel. Dis.* 15 (Suppl. 1) S3-S8
- Nakabeppu Y., Tsuchimoto D., Yamaguchi H. and Sakumi K. 2007. Oxidative damage in nucleic acids and Parkinson’s disease. *J. Neurosci. Res.* 85: 919-934
- Nakamura K., Ahmed M., Barr E., Leiden J.M. and Kang U.J. 2000. The localization and functional contribution of striatal aromatic L-amino acid descarboxylase to L-3,4-dihydroxyphenilalanine decarboxylation in rodent parkinsonian models. *Cell Transplant.* 9, 567-576
- Newcomer T.A., Rosenberg P.A. and Aizenman E. 1995. Iron-mediated oxidation of 3,4-dihydroxyphenilalanine to an exitotoxin. *J. Neurochem.* 64 (4), 1742-1748

- Nikolova G., Karamalakova Y., Kovacheva N., Stanev S., Zheleva A. and Gadjeva V. 2016. Protective effect of two essential oils isolated from *Rosa damascene* Mill. and *Lavandula angustifolia* Mill. and two classic antioxidants against L-dopa oxidative toxicity induced in healthy mice. *Regulatory Tox. and Farm.* 81, 1-7
- Obeso J.A., Rodríguez M.C., Goetz C.G., Marín C., Kordower J.H., Rodríguez M., Hirsch E.C., Farrer M., Schapira A.H. and Halliday G. 2010. Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. *Nat. Med.* 16: 653-661
- Offen D., Ziv I., Sternin H., Melamed E. and Hochman A. 1996. Prevention of dopamine-induced cell death by thiol antioxidants: possible implications for treatment of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 141, 32-39
- Ogawa N., Edamatsu R., Mizukawa K., Asanuma M., Kohno M. and Mori A. 1993. Degeneration of dopaminergic neurons and free radicals. Possible participation of levodopa. *Adv. Neurol.* 60, 242-250
- Ogawa N., Asanuma M., Kondo Y., Kawada Y., Yamamoto M. and Mori A. 1994. Differential effects of chronic L-DOPA treatment on lipid peroxidation in the mouse brain with or without pre-treatment with 6-hydroxydopamine. *Neurosci. Lett.* 171, 55-58
- Okazawa H., Murata M., Watanabe M., Kamei M. and Kanazawa I. 1992. Dopaminergic stimulation up-regulates the in vivo expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the striatum. *FEBS Lett.* 313 (2), 138-142
- Olanow C.A. 1993. A radical hypothesis for neurodegeneration. *TINS* (6) 439-444
- Olanow C.W., Stem M.B. and Sethi K. 2009. The scientific and clinica basis for the treatment of Parkinson disease. *Neurology* 72 (21 Suppl. 4) S1-S136
- Olesen J., Gustavsson A., Svensson M., Wittchen H.U. and Jönsson B. 2012. The economic cost of brain disorders in Europe. *Eur. J. Neurol.* 19: 155-162
- Padurariu M., Ciobica A., Hritcu L., Stoica B., Bild W. and Stefanescu C. 2010. Changes of some oxidative stress markers in the serum patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 469, 6-10
- Padurariu M., Ciobica A., Lefter R. Lacromioara S.I., Stefanescu C. and Chirita R. 2013. The oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Psychiatria Danubina* 25 (4) 401-409
- Pardo B., Mena M.A., Casarejos M.J., Paino C.L. and de Yebenes J.G. 1995. Toxic effects of L-DOPA on mesencephalic cell cultures: protection with antioxidants. *Brain Res.* 682, 133-143
- Parker Jr.W., Parks J.K. and Swerdlow R.H. 2008. Complex I deficiency in Parkinson's disease frontal cortex. *Brain Res.* 119, 215-218
- Przedborski S., Jackson L.V., Muthane U., Jiang H., Ferreira M., Naini A.B. and Fabn S. 1993. Chronic levodopa administration alters cerebral mitochondrial respiratory chain activity. *Ann. Neurol.* 34: 715-723
- Rahman M.K., Nagatsu T., Sakurai T., Hori S. Abe M. y Matsuda M. 1982. Effect of pyrodoxal phosphate deficiency on aromatic L-amino acid descarboxylase activity with L-DOPA and L-5-hydroxytryptophan as substrates in rats. *Jnp. J. Pharmacol.* 32: 803-811

- Rascol O., Brooks D.J., Korczyn A.D., De Deyn P.P., Clarke C.E. and Lang A.E. 2000. A five-year study of the incidence of dyskinesia in patients with early Parkinson's disease who were treated with ropinirole or levodopa. 056 Study Group. *N. Engl. J. Med.* 342 (20) 1484-1491
- Rodríguez M.C., Jahanshahi M., Krack P., Litvan I., Macias R., Bezard E. and Obeso J.A. 2009. Initial clinical manifestations of Parkinson's disease: features and pathophysiological mechanisms. *Lancet Neurol.* 8 (12) 1128-1139
- Roland G., Staal W., Sonsalla P.K. 2000. Inhibition of brain vesicular monoamine transporter (VMAT2) enhances 1-methyl-4-phenylpyridinium neurotoxicity *in vivo* in rat striatal. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 74: 313-328
- Rossab B.M., Moszczynska A., Erlicha J. and Kishab S.J. 1998. Low activity of key phospholipid catabolic and anabolic enzymes in human substantia nigra: possible implications for Parkinson's disease. *Neuroscience* 83 (3), 791-798
- Sabens E.A., Distler A.M. and Miewal J.J. 2010. Levodopa deactivates enzymes that regulate thiol-disulfide homeostasis and promotes neuronal cell death: implications for therapy of Parkinson's disease. *Biochemistry* 49 (12) 2715-2724
- Santiago-López D. y Rivas-Arancibia S. 2008. Estrés oxidativo, metabolitos oxidados de dopamina y Enfermedad de Parkinson. *Rev. Fac. Med. UNAM* Vol. 51 (3) Mayo-Junio
- Savitt J.M., Dawson V.L. and Dawson T.M. 2006. Diagnosis and treatment of Parkinson's disease: molecules to medicine. *J. Clin. Invest.* 116: 1744-1754
- Schapira A.H. 2008. Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 7: 97-109
- Schapira A.H. 2008. The clinical relevance of levodopa toxicity in the treatment of Parkinson's disease. *Mov Dis.* 23 (3) S515-S520
- Schapira A.H. 2009. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurol. Clin.* 27 (3) 583-603
- Schrag A. and Quinn N. 2000. Dyskinesias and motor fluctuations in Parkinson's disease. A community-based study. *Brain* 123 (Pt. 11) 2297-2305
- Shulman L.M., Taback R.L., Bean J. and Weiner W.J. 2001. Comorbidity of nonmotor symptoms of Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 16: 507-510
- Singer B.F., Tanabe L.M., Gorny G., Jake-Matthews C., Li Y., Kolb B. and Vezina P. 2009. Amphetamine-induced changes in dendritic morphology in rat forebrain correspond to associative drug conditioning rather than nonassociative drug sensitization. *Biol. Psychiatry* 65, 835-840
- Slivka A. and Cohen G. 1985. Hydroxyl radical attack on dopamine. *J. Biol. Chem.* 260: 15466-15472
- Smeyne R. and Jackson L.V. 2005. The MPTP model of Parkinson's disease. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 134 (1) 57
- Smeyne M. and Smeyne R.J. 2013. Glutathione metabolism and Parkinson's disease. *Free Radic. Biol. Med.* 62, 13-25

- Smith M.L., King J., Dent L., Mackey V., Muthian G., Griffin B. and Charlton C.G. 2014. Effects of acute and sub-chronic L-dopa therapy on striatal L-dopa methylation and dopamine oxidation in an MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Life Sci.* 110, 1-7
- Subramaniam S.R. and Chesselet M.F. 2013. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* 106-107, 17-32
- Sulzer D. 2007. Multiple hit hypotheses for dopamine neuron loss in Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* 30 (5) 244-250
- Sulzer D. and Zecca L. 2000. Intraneuronal dopamine-quinone synthesis: a review. *Neurotoxicity Res.* 1, 11-195
- Surmeier D.J., Guzmán J.N., Sánchez P.J. and Goldberg J.A. 2010. Recent advances in Parkinson's disease: basic research. In: Cenci ABaMA, editor Elsevier. p. 59-77
- Tanaka M., Sotomatsu A., Kanai H. and Hirai S. 1991. L-DOPA and dopamine cause cultured neuronal death in the presence of iron. *J. Neurol. Sci.* 101 (2), 198-203
- Tanner C.M. y Goldman S.M. 1996. Epidemiology of Parkinson Disease. *Neurol. Clin.* 14: 317-3357
- Tanner C.M., Ottman R., Goldman S.M., Ellenberg J., Chan P. and Mayeux R. 1999. Parkinson's disease in twins: an etiologic study. *JAMA* 281: 341-6
- Tansey M.G., McCoy M.K. and Frank-Cannon T.C. 2007. Neuroinflammatory mechanisms in Parkinson's disease: potential environmental triggers, pathways and targets for early therapeutic intervention. *Exp. Neurol.* 208 (1) 1-25
- Tansey M.G. and Goldberg M.S. 2010. Neuroinflammation in Parkinson's disease: its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention. *Neurobiol. Dis.* 37 (3) 510-518
- Taylor J.M., Main B.S. and Crack P.J. 2013. Neuroinflammation and oxidative stress: Co-conspirators in the pathology of Parkinson's disease. *Neurochem. Intern.* 62: 803-819
- The Parkinson Study Group. 2004. Levodopa and the progression of Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.* 351, 2498-2508
- Tohgi H., Abe T., Kikuchi T., Takahashi S. and Nozari Y. 1991. The significance of 3-O-methyldopa concentrations in the cerebrospinal fluid in the pathogenesis of wearing-off phenomenon in Parkinson's disease, and their changes after L-dopa administration. *Neurosci. Lett.* 159, 135-138
- Ueno T., Yamada J., Nishijima H., Arai A., Migita K., Baba M., Ueno S. and Tomiyama M. 2014. Morphological and electrophysiological changes in intratelencephalic-type pyramidal neurons in the motor cortex of a rat model of levodopa-induced dyskinesia. *Neurobiol. Disci.* 64, 142-149
- Vanitallie T.B. 2008. Parkinson disease: primacy of age as a risk factor for mitochondrial dysfunction. *Metabolism* 57 (Suppl. 2) S50-S55
- Varcin M., Bentea E., Michotte Y. and Sarre S. 2012. Oxidative stress in genetic mouse models of Parkinson's disease. *Oxid, Med. Cell. Longev.* 624925

- Venero G.J.R. 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev. Cubana Med. Milit.* 31 (2) 126-133
- Villalba R.M. and Smith Y. 2010. Striatal spine plasticity in Parkinson's disease. *Front. Neuroanat.* 4, 133
- Walkinshaw G. and Waters C.M. 1995. Induction of apoptosis in catecholaminergic PC12 cells by L-DOPA. Implications for the treatment of Parkinson's disease. *J. Clin. Invest.* 95, 2458-2464
- Wimalasena K. 2011. Vesicular monoamine transporters: structure- function pharmacology, and medicinal chemistry. *Med. Res. Rev.* 31, 483-519
- Xu Y., Stokes A.H., Roskoski R. and Vrana K.E. 1998. Dopamine, in the presence of tyrosinase, covalently modifies and inactivates tyrosine hydroxylase. *J. Neurosci. Res.* 54, 691-697
- Zhou C., Huang Y. and Przedborski S. 2008. Oxidative stress in Parkinson's disease: a mechanism of pathogenic and therapeutic significance. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1147: 93-104
- Zündorf G. and Reiser G. 2011. Calcium dysregulation and homeostasis of neural calcium in the molecular mechanisms of neurodegenerative diseases provide multiple targets for neuroprotection. *Antioxid. Redox Signal.* 14 (7) 1275-1288