



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA

**“EFECTO NEUROPROTECTOR DEL  
HIDROXITIROSON, ACETATO DE  
HIDROXITIROSON Y NITROHIDROXITIROSON  
EN EL MODELO DE MPP<sup>+</sup> DE LA ENFERMEDAD  
DE PARKINSON EN RATA”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**DOCTOR EN FARMACIA**

**PRESENTA:**

**M. F. GABRIELA ALEJANDRA PÉREZ BARRÓN**

**DIRECTOR DE TESIS**

**Dr. ANTONIO MONROY NOYOLA**

**CUERNAVACA, MORELOS**

**FECHA: SEPTIEMBRE**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA  
Doctorado

"1919-2019 en memoria del General Emiliano Zapata Salazar"

Cuernavaca, Mor., a 17 de junio de 2019  
Folio: FF/D/Sac/CIP/DF/036/2019

**M. F. GABRIELA ALEJANDRA PÉREZ BARRÓN**  
**ESTUDIANTE DEL PROGRAMA DE DOCTORADO**  
**PRESENTE**

Por este conducto le informo que Consejo Interno de Posgrado en la sesión del 12 de junio de 2019, le asignó el siguiente jurado para presentar la defensa oral de la tesis titulada:

**"Efecto neuroprotector del hidroxitirosol, acetato de hidroxitirosol y nitrohidroxitirosol en el modelo MPP+ de la enfermedad de Parkinson en rata"**

Dr. Samuel Enoch Estrada Soto	PRESIDENTE
Dr. Germán Bernal Fernández	SECRETARIO
Dr. Guillermo Ávila Acevedo	VOCAL 1
Dr. Sergio Montes López	VOCAL 2
Dra. Yoshajandith Aguirre Vidal	VOCAL 3
Dr. Camilo Ríos Castañeda.	VOCAL 4
Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez	VOCAL 5

De acuerdo al Artículo 101° (Reglamento General de Posgrado). - *Será requisito previo al examen de grado, que los integrantes de la Comisión Revisora, emitan su voto y opinión favorables en términos de que la tesis reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el examen correspondiente. Lo cual no compromete el dictamen de la evaluación de examen.*

Asimismo, le recuerdo que es responsabilidad de usted enviar los respectivos ejemplares a su comité sinodal y dar seguimiento a las correspondientes revisiones para poder concluir este importante proceso. Sin más por el momento, me despido de usted, no sin antes felicitarla por estar próxima a obtener el título de Doctora en Farmacia.

Atentamente  
**Por una humanidad culta**  
*Una universidad de excelencia*

**DR. JULIO CÉSAR RIVERA LEYVA**  
**JEFE DE POSGRADO**

C.c.p. Dr. Samuel Estrada Soto, Dr. Germán Bernal Fernández, Dr. Guillermo Ávila Acevedo, Dr. Sergio Montes López, Dra. Yoshajandith Aguirre Vidal, Dr. Camilo Ríos Castañeda, Dr. Juan Gabriel Navarrete.

JCRL/dirm

Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México. C.P. 62209, edificio 61 ala C 2° piso, Tel. (777) 329 79 86, 329 7000, Ext. 7986/ doctoradofarmacia@uaem.mx



**UAEM**

*Una universidad de excelencia*

RECTORÍA  
2017-2023

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco el apoyo otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, con el No. de becario: 349836 para realizar los estudios de Doctorado en Farmacia en el período 2013-2016, con el cual se hizo posible la realización y culminación de este proyecto.

También agradezco al Programa de Doctorado en Farmacia y CONACYT-MORELOS (FOMIX 2013-1 # 224038) por la beca otorgada para realizar una estancia de investigación en el extranjero. Así como al Programa de Becas Mixtas para becarios Conacyt nacionales: BECAS MIXTAS 2014 - MZO2015 MOVILIDAD EN EL EXTRANJERO (290842).

Al programa de Posgrado en Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos por mantener sus puertas abiertas y por brindarme la oportunidad de realizar los estudios del Doctorado en Farmacia.

A mi asesor de tesis, el Dr. Antonio Monroy Noyola por guiarme en la realización del proyecto de tesis doctoral, y por la confianza brindada durante la realización de este proyecto de investigación.

Es muy importante agradecer, a la Dra. Sara García, al Dr. Moisés Rubio y al Dr. Guillermo Ávila, miembros de mi comité tutorial, por sus muy valiosos e indispensables comentarios y consejos durante el desarrollo de este proyecto.

Al Departamento de Neuroquímica del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía por su valiosa colaboración en la realización de este proyecto, especialmente al Dr. Sergio Montes por su gran apoyo en la parte experimental.

También quiero expresar mis sinceros agradecimientos al Dr. Marti Santiago y al Dr. José Luis Espartero de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla.

Agradezco al Honorable Jurado designado para la defensa oral de esta tesis por el tiempo y apoyo brindado para el mejoramiento de este escrito, ya que en algún momento han sido parte de mi motivación e inspiración en el mundo de la ciencia.

Y, por último, pero no por eso menos importante, quiero agradecer afectuosamente a mis compañeras del laboratorio 11: Yosahandit y Laura, por su valiosa amistad y su apoyo incondicional durante todo el posgrado.

## **DEDICATORIAS**

*A mis padres, Juan Leonardo y María Raquel*

*A la niña de mis ojos, Raquel*

*A mis hermanos, Leonardo y Alejandro*

## INDICE

	Página.
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>9</b>
<b>1. Abstract</b> .....	<b>11</b>
<b>2. Resumen</b> .....	<b>12</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>13</b>
<b>4. ANTECEDENTES</b> .....	<b>16</b>
<b>4.1 ENFERMEDAD DE PARKINSON</b> .....	<b>16</b>
4.1.1 Epidemiología.....	16
4.1.2 Reseña histórica de la EP.....	17
4.1.3 Cuadro clínico de la EP.....	18
<b>4.2 ORGANIZACIÓN FUNCIONAL DE LOS GANGLIOS BASALES</b> .....	<b>20</b>
<b>4.3 ANATOMÍA PATOLÓGICA DE LA EP</b> .....	<b>24</b>
<b>4.4 DOPAMINA (DA)</b> .....	<b>26</b>
4.4.1 <i>Sistemas dopaminérgicos</i> .....	26
4.4.2 <i>Biosíntesis de DA</i> .....	27
4.4.3 <i>Almacenamiento, liberación y recaptura de DA</i> .....	28
4.4.4 <i>Receptores dopaminérgicos</i> .....	30
4.4.5 <i>Metabolismo de DA</i> .....	31
<b>4.5 ALTERACIONES BIOQUÍMICAS DE LA EP</b> .....	<b>32</b>
<b>4.6 ETIOLOGIA DE LA EP</b> .....	<b>33</b>
<b>4.7 MECANISMOS DE NEURODEGENERACIÓN EN LA EP</b> .....	<b>34</b>
4.7.1 <i>Estrés Oxidativo</i> .....	34
4.7.2 <i>Dopamina como fuente de EO</i> .....	36
4.7.3 <i>Disfunción mitocondrial en la patogénesis de la EP</i> .....	39
4.7.4 <i>Deficiencia de glutatión</i> .....	40
4.7.5 <i>Sobreproducción de Óxido Nítrico en la EP</i> .....	41
<b>4.8 MODELO EXPERIMENTAL DE LA EP</b> .....	<b>43</b>
4.8.1 <i>Modelo experimental por MPTP/MPP<sup>+</sup></i> .....	44
4.8.2 <i>Defectos mitocondriales y estrés oxidativo por MPP<sup>+</sup></i> .....	45

<b>4.9 TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO DE LA EP</b> .....	<b>47</b>
4.9.1 <i>Levadopa (L-Dopa)</i> .....	47
4.9.2 <i>Agonistas dopaminérgicos</i> .....	48
4.9.3 <i>Inhibidores de la MAO</i> .....	48
4.9.4 <i>Inhibidores de la COMT</i> .....	48
<b>4.10 HIDROXITIRO SOL (HT)</b> .....	<b>49</b>
4.10.1 <i>Actividad Antioxidante del HT</i> .....	51
4.10.2 <i>Actividad neuroprotectora del HT</i> .....	53
4.10.3 <i>Estudios de toxicidad de HT en animales</i> .....	54
4.10.4 <i>Estudios de absorción y metabolismo del HT</i> .....	54
<b>4.11 DERIVADOS ÉSTERES DE HT</b> .....	<b>56</b>
<b>4.12 NITOHIDROXITIRO SOL (NO<sub>2</sub>HT)</b> .....	<b>58</b>
<b>5. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>62</b>
<b>6. HIPÓTESIS</b> .....	<b>63</b>
<b>7. OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>64</b>
7.1 <i>Objetivos específicos</i> .....	64
<b>8. MÉTODO</b> .....	<b>65</b>
<b>9. RESULTADOS</b> .....	<b>75</b>
<b>10. DISCUSIÓN</b> .....	<b>99</b>
<b>11. CONCLUSIONES</b> .....	<b>105</b>
<b>12. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>106</b>
<b>13. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b> .....	<b>107</b>
<b>14. ANEXOS</b> .....	<b>125</b>

## Índice de figuras.

	<b>Página.</b>
<b>Figura 1.</b> Síntomas motores de la EP.....	19
<b>Figura 2.</b> Anatomía de los ganglios basales.....	20
<b>Figura 3.</b> Representación del circuito funcional formado por la corteza cerebral, los GB y el tálamo.....	21
<b>Figura 4.</b> Señalización intracelular de los receptores a DA presentes en las neuronas estriatales de proyección.....	23
<b>Figura 5.</b> Comparación del flujo sináptico en los GB en condiciones normales y en la EP.....	24
<b>Figura 6.</b> Degeneración neuronal de las células dopaminérgicas en la SN.....	25
<b>Figura 7.</b> Origen y proyecciones de los sistemas dopaminérgicos más importantes.....	27
<b>Figura 8.</b> Síntesis de la dopamina.....	28
<b>Figura 9.</b> Almacenamiento, liberación y recaptura de DA.....	30
<b>Figura 10.</b> Metabolismo de DA. ....	31
<b>Figura 11.</b> Metabolismo de la DA por acción de la enzima MAO-B, así como la autooxidación de la DA.....	38
<b>Figura 12.</b> Representación de glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG).....	40
<b>Figura 13.</b> Mecanismo propuesto para la actividad de la sintasa de ON.....	42
<b>Figura 14.</b> Diagrama de la interacción de eventos bioquímicos del ON y el hierro en la expresión de la neurotoxicidad en la EP.....	43
<b>Figura 15.</b> Mecanismo hipotético de la toxicidad del MPTP/MPP <sup>+</sup> .....	45
<b>Figura 16.</b> Mecanismo de acción de los fármacos utilizados en la clínica de la EP.....	49
<b>Figura 17.</b> Estructura química del hidroxitirosol.....	50
<b>Figura 18.</b> Clasificación simplificada de los distintos tipos de polifenoles.....	50
<b>Figura 19.</b> Evolución de los documentos relacionados con HT publicados a lo largo de los últimos años.....	51
<b>Figura 20.</b> Mecanismo antioxidante del HTy por donación de hidrógeno.....	53
<b>Figura 21.</b> Vías del metabolismo de la administración exógena del HT en ratas.....	56
<b>Figura 22.</b> Estructura del HT y de sus derivados esteres.....	57
<b>Figura 23.</b> Estructuras químicas de tolcapona y entacapona.....	60
<b>Figura 24.</b> Estructura química del HT y su derivado NO <sub>2</sub> HT.....	60
<b>Figura 25.</b> Microdiálisis cerebral.....	71

<b>Figura 26.</b> Protocolo experimental de perfusión intracerebral.....	<b>72</b>
<b>Figura 27.</b> Cromatograma que muestra los estándares de DA, DOPAC, HT, 5-HIAA y HVA..	<b>73</b>
<b>Figura 28.</b> Evaluación conductual por efecto del pretratamiento con HT, AceHT y NO <sub>2</sub> HT...	<b>76</b>
<b>Figura 29.</b> Cuantificación de DA estriatal por efecto del tratamiento con HT.....	<b>77</b>
<b>Figura 30.</b> Efecto de la administración del HT en el contenido de DOPAC y HVA estriatal.....	<b>78</b>
<b>Figura 31.</b> Efecto de la administración del HT, Ace-HT y NO <sub>2</sub> -HT en el contenido de DA, DOPAC y HVA estriatal.....	<b>79</b>
<b>Figura 32.</b> Efecto de la administración del HT, Ace-HT y NO <sub>2</sub> -HT, en el contenido de 5-HT, 5-HIAA y NA estriatal.....	<b>80</b>
<b>Figura 33.</b> Efecto de la administración de HT sobre la actividad de la enzima total MAO y sus isoformas (MAO-A y MAO-B).....	<b>82</b>
<b>Figura 34.</b> Efecto de la administración de HT y L-deprenil sobre la actividad total de la enzima MAO y sus isoformas (MAO-A y MAO-B).....	<b>83</b>
<b>Figura 35.</b> IC <sub>50</sub> del HT sobre la actividad de la enzima MAO.....	<b>84</b>
<b>Figura 36.</b> Cromatogramas de muestras de dializado cerebral. ....	<b>85</b>
<b>Figura 37.</b> Efecto de la administración de HT y la perfusión de MPP <sup>+</sup> en los niveles de DA extracelular del cuerpo estriado .....	<b>88</b>
<b>Figura 38.</b> Efecto de la administración de HT y la perfusión de MPP <sup>+</sup> en los niveles de DOPAC extracelular del cuerpo estriado .....	<b>89</b>
<b>Figura 39.</b> Efecto de la administración de HT y la perfusión de MPP <sup>+</sup> en los niveles de HVA extracelular del cuerpo estriado .....	<b>90</b>
<b>Figura. 40.</b> Efecto de la administración de HT y la perfusión de MPP <sup>+</sup> en los niveles de 5-HIAA extracelular del cuerpo estriado .....	<b>91</b>
<b>Figura 41.</b> Efecto del HT en la captura de [ <sup>3</sup> H]-dopamina por sinaptosomas del neostriado de rata.....	<b>92</b>
<b>Figura 42.</b> Efecto del HT, Ace-HT y NO <sub>2</sub> -HT sobre la formación de productos lipídicos fluorescentes inducidos por MPP <sup>+</sup> .....	<b>94</b>
<b>Figura 43.</b> Efecto del HT, Ace-HT y NO <sub>2</sub> -HT sobre la actividad GPx en el modelo MPP <sup>+</sup> en rata.....	<b>95</b>
<b>Figura 44.</b> Niveles de GSH por efecto del HT, AceHT y NO <sub>2</sub> HT en el modelo MPP <sup>+</sup> .....	<b>96</b>
<b>Figura 45.</b> Contenido de GSSG por efecto del HT y sus derivados en el modelo MPP <sup>+</sup> .....	<b>97</b>
<b>Figura 46.</b> Efecto del HT, AceHT y NO <sub>2</sub> HT en la relación GSH/GSSG en el modelo MPP <sup>+</sup> .	<b>98</b>

## ABREVIATURAS

AAD	L-aminoácido aromático descarboxilasa
Ace-HT	Acetato de hidroxitirosol
AMPc	3'-5'-monofosfato cíclico de adenosina
BH <sub>4</sub>	Tetrahidrobiopterina
BHE	Barrera hematoencefálica
CAT	Catalasa
CL	Cuerpos de Lewy
COMT	Catecol <i>orto</i> -metiltransferasa
CTEM	Cadena de transporte de electrones mitocondrial
DA	Dopamina
DAQ's	Quinonas de dopamina
DOPAC	Acido dihidroxifenilacético
EO	Estrés oxidativo
EP	Enfermedad de Parkinson
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
ERO	Especies reactivas de oxígeno
GABA	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
GB	Ganglios basales
GP	Globo pálido
GPx	Glutación peroxidasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
HT	Hidroxitirosol
HVA	Ácido homovanílico
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
L-DOPA	L-3,4-dihidroxifenilalanina
MAO	Monoamina oxidasa
MPP <sup>+</sup>	1-metil-4-fenilpiridino
MPDP <sup>+</sup>	1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridina

MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO <sup>-</sup>	Óxido nítrico
NO <sub>2</sub> -HT	Nitrohidroxitirosol
NST	Núcleo subtalámico
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superóxido
•OH	Radical hidroxilo
OONO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
PKA	Cinasa A de proteína
PUFAs	Ácidos grasos poliinsaturados
SN	Sustancia nigra
SNc	Substancia nigra pars compacta
SNpr	<i>Sustancia nigra pars reticulada</i>
SNC	Sistema nervioso central
SOD	Superóxido dismutasa
TH	Tirosina hidroxilasa
VTA	Área tegmental ventral
VMAT2	Transportadores de monoaminas vesiculares de tipo 2
6-OHDA	6-hidroxidopamina

## 1. Abstract.

Parkinson's disease is a neurological syndrome characterized by the irreversible loss of dopaminergic neurons in the nigrostriatal pathway of unknown etiology, environmental causes have been proposed through molecules, such as 1-methyl 4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>), which induce a selective toxicity towards dopaminergic neurons. Another hypothesis is the loss of dopaminergic neurons by an increase in the catabolism of dopamine across the monoamine oxidase (MAO) enzyme that produced reactive oxidant species. *In vivo* and *in vitro* studies have demonstrated that hydroxytyrosol and its derivatives are potent antioxidants in the central nervous system. In the present study, it was evaluated the effect of hydroxytyrosol (HT), hydroxytyrosol acetate (Ace-HT) and nitrohydroxytyrosyl (NO<sub>2</sub>-HT) in rat MPP<sup>+</sup>-model. Wistar male rats received a single dose of 1.5 mg/Kg HT, Ace-HT and NO<sub>2</sub>-HT intravenously. Five minutes later, the animals received an intrastriatal stereotaxic micro-injection of 10 µg MPP<sup>+</sup> dissolved in 8 µL of sterile saline solution. Six days after, the animals were treated with apomorphine (1 mg/Kg subcutaneously) and then ipsilateral rotations were recorded during 1 hour. Twenty four hours after, the animals were sacrificed by decapitation and lesioned striatum was dissected out to dopamine quantification. Other groups of animals were sacrificed 2 hours after and lesioned striatum was dissected to assay MAO activity, the formation of lipidic fluorescent products quantification and glutathione content. Pretreatment with HT, Ace-HT and NO<sub>2</sub>-HT significantly reduced ( $p < 0.05$ ) the number of ipsilateral rotations ~70% induced by MPP<sup>+</sup>. This neuroprotection was corroborated with the preservation of dopamine levels ~80% ( $p < 0.05$ ). Also, pretreatment with HT significantly reduced the MAO-B activity in the striatum ( $p < 0.05$ ) ( $IC_{50} = 295.3 \mu M$ ). On the other hand, pretreatment with HT, Ace-HT and NO<sub>2</sub>-HT significantly decreased the formation of lipidic fluorescent products and addition altered glutathione content. These results demonstrate the neuroprotective effect of HT and its derivatives in rat MPP<sup>+</sup>-model of Parkinson's disease. This neuroprotective effect may be due to the participation of phenolic compounds in different mechanisms involved in the neuronal degeneration implicated in Parkinson's disease.

## 2. Resumen.

La enfermedad de Parkinson es un síndrome de etiología desconocida, se han considerado factores ambientales, a través de moléculas como el metabolito 1-metil-4-fenilpiridino (MPP<sup>+</sup>) que destruye las neuronas dopaminérgicas nigroestriales. Otra hipótesis sobresaliente es que la pérdida de neuronas dopaminérgicas resulta por un aumento del metabolismo de la dopamina por la enzima monoamina oxidasa (MAO), produciendo neurotoxinas endógenas. Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que el hidroxitirosol (HT) y sus derivados, acetato de hidroxitirosol (Ace-HT) y nitrohidroxitirosol (NO<sub>2</sub>-HT) son potentes antioxidantes y ejercen varias actividades biológicas. En este estudio los animales fueron administrados con una única dosis de 1.5 mg/Kg de HT, Ace-HT y NO<sub>2</sub>-HT por vía intravenosa. Cinco minutos después, las ratas recibieron una microinyección estereotáxica intraestriatal de 10 µg de MPP<sup>+</sup> disueltos en 8 µL de solución salina estéril. Seis días después, los animales fueron administrados con 1 mg/Kg de apomorfina y se contaron las rotaciones ipsilaterales durante 1 hora. Al siguiente día todas las ratas fueron sacrificadas por decapitación y el estriado lesionado fue disecado para la cuantificación de catecolaminas. Otros grupos experimentales fueron sacrificados 2 horas después de la microinyección intraestriatal de MPP<sup>+</sup> y el estriado lesionado fue disecado para la medición de la actividad de la enzima MAO, la formación de los productos lípidicos fluorescentes y la cuantificación del contenido de GSH y GSSH. El pretratamiento con HT, Ace-HT y NO<sub>2</sub>-HT disminuyó significativamente ( $p < 0.05$ ) el número de rotaciones ipsilaterales en un ~70% inducidas por el daño generado por MPP<sup>+</sup>. Esta protección fue corroborada con la preservación de los niveles de dopamina estriatal ~80% ( $p < 0.05$ ). Además, el pretratamiento con HT disminuyó significativamente la actividad de la enzima MAO-B ( $p < 0.05$ ) ( $IC_{50} = 295.3 \mu M$ ). Por otro lado, el pretratamiento con HT, AceHT y NO<sub>2</sub>HT disminuyó significativamente la formación de productos lípidicos fluorescentes (~180%), además de que modifico el contenido de GSH y GSSH. Estos resultados demuestran claramente el efecto neuroprotector del hidroxitirosol y sus derivados en el modelo de MPP<sup>+</sup> de la enfermedad de Parkinson en rata. Dicho efecto neuroprotector puede ser por la participación de los compuestos fenólicos en diferentes mecanismos involucrados en la degeneración neuronal implicada en la enfermedad de Parkinson.

### 3. INTRODUCCIÓN.

El hidroxitirosol (HT) es un compuesto fenólico que está presente principalmente en el reino vegetal, como en los frutos, hojas, flores y otros órganos vegetales, como en el olivo y la aceituna (Vázquez, 1978); además, se ha demostrado su presencia como metabolito del verbascósido, principal compuesto fenólico presente en plantas como *Buddleja cordata* (Pérez-Barrón, 2014).

En los últimos años, el HT se ha convertido en objeto de numerosos estudios por parte de diferentes grupos de investigación de todo el mundo, debido a que, además de poseer propiedades antioxidantes, se ha demostrado que el HT presenta una variada gama de actividades biológicas como son: actividad antimicrobiana, antihipertensiva, hipoglucémica, antiagregante plaquetaria, cardioprotectora y antiinflamatoria (Visioli, 2002a; Tuck y Hayball, 2002a; Bianco y Ramunno, 2006; Covas, 2006a y b; Bendini, 2007), aparte de inhibir la proliferación y promover la apoptosis en numerosas líneas celulares tumorales humanas (Fabiani, 2009). Su biodisponibilidad y metabolismo han sido bien elucidados, el HT es rápidamente absorbido en animales y humanos (De la Torre, 2007; Pinto, 2011), y se ha evidenciado que tiene una alta penetrabilidad en el cerebro (D'Angelo, 2001; Geelings, 2003; Gallardo, 2014).

En el área de las neurociencias se ha demostrado su efecto neuroprotector en modelos neuronales *in vitro* contra el daño ocasionado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Hashimoto, 2003) y contra el daño neuronal inducido por sales ferrosas y nitroprusiato de sodio (Schaffer, 2010). A pesar de que existen muchas propiedades descritas *in vitro*, son pocos los estudios *in vivo* que demuestran su posible efecto neuroprotector en el daño cerebral en modelos animales. Se evidenció su potente actividad antioxidante en un modelo animal de hipoxia-reoxigenación por una inhibición significativa del flujo de LDH (González-Correa, 2008); así como en un modelo de la enfermedad de Huntington en rata por la disminución de los niveles de peróxidos lipídicos y el aumento de GSH en el estriado y el resto del cerebro (Tasset, 2011).

Por otra parte, en los últimos años, se han preparado varios tipos de derivados de HT con el fin de modular su balance hidrófilo/lipófilo para aumentar su biodisponibilidad en el organismo. Entre estos derivados cabe destacar los derivados ésteres, como el acetato de HT, (Geelings, 2003; Alcudia, 2004; Torres, 2005; Trujillo, 2006; Grasso, 2007), y los

derivados éteres (Madrona, 2009). Estos derivados han mostrado actividades similares o incluso mejoradas (Trujillo, 2006; Lorenz, 2006; Pereira-Caro, 2009) respecto al propio HT libre, siendo, en la mayoría de los casos, más liposolubles. Recientemente se ha propuesto el estudio de un nuevo antioxidante derivado de HT, en el que se introduce una modificación fundamental en el anillo fenólico, como es la incorporación de un grupo nitro (NO<sub>2</sub>), dando lugar al nitrohidroxitirosol. Ya que esta incorporación podría permitir la modulación de la actividad antioxidante, además de que se ha sugerido que la introducción del grupo nitro en este tipo de compuesto le podría conferir la capacidad de inhibir el catecol *orto*-metiltransferasa (COMT), enzima implicada en la degradación de la dopamina, neurotransmisor cuyo déficit produce la enfermedad de Parkinson (Gallardo, 2015).

La enfermedad de Parkinson (EP) es el segundo síndrome neurológico más común, este complejo desorden neurodegenerativo crónico y progresivo se caracteriza por una disminución de los niveles de dopamina (DA) estriatal a causa de la degeneración y muerte de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra pars compacta (SNc) (Dexter, 2013). En la actualidad no existe algún tratamiento capaz de revertir o detener el progreso de la EP. El principal obstáculo para el desarrollo de un tratamiento neuroprotector se debe a que es un síndrome de etiología desconocida, y se han considerado factores ambientales, a través de moléculas como el metabolito 1-metil-4-fenilpiridina (MPP<sup>+</sup>) que destruye las neuronas dopaminérgicas nigroestriales (Agid, 1987). Otra hipótesis importante es que la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la EP resulta por un aumento del metabolismo de la DA, produciendo neurotoxinas endógenas (Fahn, 1992).

La enzima monoamina oxidasa (MAO) existe en dos isoformas, A y B, y es la principal enzima intracelular que metaboliza DA en el sistema nervioso central (Glover, 1977). El aumento de la oxidación de DA por la MAO-B implica la producción de peróxido de hidrógeno, una molécula tóxica capaz de inducir la formación de radicales libres, los cuales podrían dañar potencialmente las neuronas dopaminérgicas de la vía nigroestriatal (Cohen, 1986). Se ha demostrado que pacientes con la EP presentan una elevada actividad de la MAO-B en la sustancia nigra (Riederer, 1983). Entre los fármacos que han recibido mayor atención en relación con su potente efecto neuroprotector en la EP, destacan la selegilina (deprenil) y rasagilina, los cuales son inhibidores de la MAO-B. Ambos fármacos han demostrado eficacia neuroprotectora en modelos celulares y animales (Wu, 2000), y en pacientes con la EP (Boll, 2011).

Además, de que el HT penetra rápidamente en el cerebro y que es un potente antioxidante, también se ha reportado que actúa como quelador de metales y que actúa inhibiendo a la enzima MAO-B en estudios *in vitro* (Geelings, 2003; Goldstein, 2016). La combinación de estas características hace al HT, así como a sus derivados, idóneos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto neuroprotector del hidroxitirosol y sus derivados; acetato de hidroxitirosol y nitrohidroxitirosol, en un modelo de estrés oxidativo inducido por MPP<sup>+</sup> de la enfermedad de Parkinson en rata.

## **4. ANTECEDENTES.**

### **4.1 ENFERMEDAD DE PARKINSON.**

La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno crónico y progresivo, que se manifiesta por una combinación variable de temblor, rigidez, bradicinesia y una alteración característica de la marcha y postura (Gómez-Chavarín, 2012). La característica patológica de esta enfermedad es la pérdida pronunciada de neuronas productoras de dopamina (DA) que se localizan en la *substancia nigra pars compacta* (SNc); estas células normalmente liberan DA en sus terminales axónicas en el cuerpo estriado y forman parte del sistema extrapiramidal de regulación motora, por lo mismo, su pérdida se traduce en los trastornos del movimiento antes mencionados. El diagnóstico es eminentemente clínico y el principal tratamiento son los fármacos dopaminérgicos, la rehabilitación y el tratamiento quirúrgico. El desarrollo de la forma idiopática de la EP se ha asociado con la exposición a factores ambientales, aunque también hay formas familiares o hereditarias; en estos casos la enfermedad se ha asociado a mutaciones en los genes que codifican para proteínas como  $\alpha$ -sinucleína y parkina (Gómez-Chavarín, 2012). En los pacientes que carecen de una clara carga genética los mecanismos patogénicos son difíciles de entender, debido a la variedad de factores que participan, entre los que están toxinas ambientales, estrés oxidativo y disfunción mitocondrial (Sherer, 2001). Sin embargo, la ruta final común de los mecanismos patógenos que deterioran a las neuronas de la SN es la muerte neuronal, proceso en el que participa de manera importante el estrés oxidativo dependiente de la DA (Gómez-Chavarín, 2012).

En algunas formas familiares de la EP se han encontrado proteínas mutantes, en particular en la proteína  $\alpha$ -sinucleína; la pérdida de la función normal de esta proteína, aunada al efecto tóxico de sus formas alteradas, favorece la acumulación de DA en los sitios donde se sintetiza y acumula, como son el citoplasma y terminales nigroestriatales, donde inician cambios neurodegenerativos en los sujetos con EP.

#### **4.1.1 Epidemiología.**

En los países industrializados, la EP es el segundo trastorno neurodegenerativo más frecuente después de la enfermedad de Alzheimer, que afecta al 1% de la población mayor de 55 años y a 3% de la población mayor de 70 años (Chávez-León, 2013), asociado con una carga socioeconómica trascendental y un sufrimiento humano inconmensurable. La edad es el factor de riesgo más importante para el desarrollo de esta enfermedad, que

representa el parkinsonismo idiopático más frecuente, por lo que, teniendo en cuenta el envejecimiento progresivo de la población, su prevalencia continuará aumentando en los próximos años (Clarke, 2004). La edad promedio de inicio son los 60 años de edad y en 80% de los casos los pacientes desarrollan esta enfermedad entre los 40 y 70 años; sólo 5% presentan síntomas antes de los 40 años. Las personas que desarrollan esta enfermedad entre los 21 y los 40 años son diagnosticadas con EP de aparición temprana y de origen genético; el inicio a distintas edades puede limitar su diagnóstico (Marsh, 2009). Puede afectar a personas de todo los orígenes étnicos y los varones son ligeramente más propensos (1.5 veces) (Lang, 1998). La Organización Mundial de la Salud considera que cerca de 40 millones de personas padecen la enfermedad y un 30% adicional no ha sido diagnosticado (Malaspina, 2008). En nuestro país, de acuerdo con la Secretaría de Salud, afecta a medio millón de mexicanos mayores de 60 años (Chávez-León, 2013).

#### **4.1.2 Reseña histórica de la EP.**

El primero en describir la enfermedad que lleva su nombre fue James Parkinson, en 1817. Parkinson pensaba que la causa de la enfermedad era una alteración en el funcionamiento de la médula espinal, que podría extenderse al bulbo raquídeo, resaltando que no existía “modificación del intelecto ni de los sentidos” (Parkinson, 2002). En 1880, Jean-Martin Charcot bautizó la parálisis agitante como “Enfermedad de Parkinson”, y utilizó la escopolamina para el tratamiento del temblor (Goetz, 1986). En 1893, Paul Blocq y Georges Marinesco establecieron el papel de la SN en la EP a partir de un hallazgo, en un paciente tuberculoso que padecía de temblor en el hemicuerpo contralateral, de un absceso en la SN. En 1913, el patólogo alemán Friederich Lewy describió los cuerpos que llevan su nombre y los propuso como marcador de la enfermedad. En 1919 Constantin Trétiakoff, validó la hipótesis propuesta por Brissaud al describir la pérdida de las neuronas en esa área del mesencéfalo tanto en el Parkinson idiopático como en el postencefalítico. Hacia la década de 1940, el tratamiento original de la EP era quirúrgico basado en los trabajos originales de Spiegel y Wycis en los ganglios basales, concretamente la lesión en el tálamo, los campos de Forel y la región subtalámica, para posteriormente ser modificado por Cooper al ligar la arteria coroideo posterior, y usarse el globo pálido también como blanco. Fenelon y Guiot, en 1955, al lesionar el *globus pallidus*, tuvieron éxito en 73% de sus pacientes. Sin embargo, en 1956, Arvid Carlsson descubrió la alteración en la concentración de DA y sostuvo que la sintomatología parkinsónica se debía a la disminución de este neurotransmisor, por lo que recibió, en el año 2000, el Premio Nobel de Fisiología. En 1960,

Hornikewicz y Birkmayer inyectaron Dopa a pacientes con EP, y con ello observaron resultados espectaculares. En 1967, Geroge Constantin Cotzias, del Laboratorio Nacional Brookhaven de Nueva York, administró Levadopa (L-Dopa) por vía oral, creando así un método terapéutico efectivo. La utilización de la cirugía fue en declive hasta la década de 1980, cuando se evidenció que la sola utilización del medicamento no podía curar la enfermedad, además de la presencia de otros efectos secundarios.

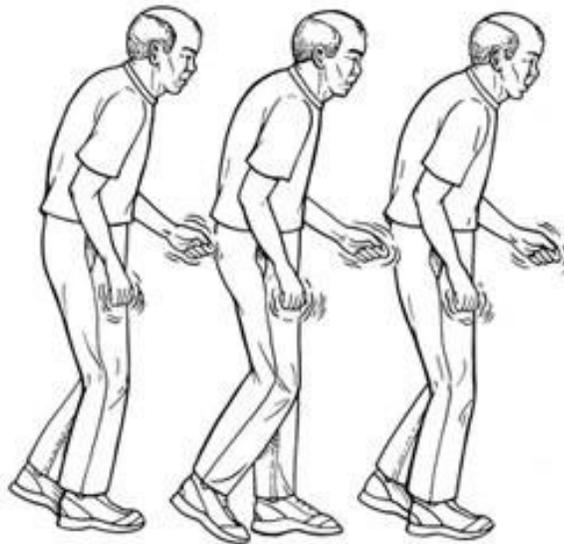
#### **4.1.3 Cuadro clínico de la EP.**

La EP, afección crónica y progresiva, pertenece al grupo de trastornos del movimiento. Sus síntomas claves son: a) el temblor en las manos, los brazos, las piernas o el maxilar inferior, b) la rigidez de las extremidades y el tronco, c) la lentitud de los movimientos, d) la inestabilidad postural o alteración del equilibrio, e) las alteraciones de la marcha. Además de los síntomas motores, los pacientes presentan: alteraciones cognitivas, mentales y de la conducta (Lerner, 2008), y alteraciones vegetativas como sialorrea, constipación y seborrea. Casi 20% de los pacientes con EP presentan sintomatología inicial que no es de tipo motor; los síntomas consisten en fatiga, molestias musculoesqueléticas y depresión. Muchos pacientes pasan entre cuatro y ocho años con esta sintomatología, antes de que hagan aparición los síntomas motores.

**Síntomas motores.** Las manifestaciones motoras comienzan focalmente, por lo común en una de las extremidades, cuando la concentración de DA cae por debajo de 60 a 70 % en la región motora del cuerpo estriado contralateral (putamen posterior). Al principio se manifiestan de un solo lado del cuerpo y gradualmente progresan al lado contrario. Los síntomas motores consisten en acinesia (hipoquinesia y bradiquinesia), aumento del tono muscular (rigidez) y temblor (**Figura 1**).

- a. Temblor. Es el síntoma más frecuente de comienzo de la enfermedad. El temblor en reposo es de 4-6 Hz y es de predominio distal. Los dedos de las manos son los más afectados, donde se observa el signo de “cuenta monedas”; también puede existir temblor en las extremidades inferiores. Pueden afectarse los músculos de la mandíbula y de la lengua, pero es muy raro que se afecten los del tronco y el cuello. El temblor se acrecienta cuando se movilizan otras partes del cuerpo, se realizan operaciones aritméticas y con el estrés, y desaparece durante el sueño (Rodríguez-Oroz, 2009).

- b. Alteraciones del tono muscular. Tanto los músculos flexores como los extensores están afectados en el paciente con EP, por lo que pueden observarse las siguientes alteraciones del tono muscular: aumento de la resistencia a la extensión y mayor facilidad para la flexión. En los pacientes puede existir la “fascies de jugador de póker” (inexpresiva), y al avanzar la enfermedad puede haber alteraciones en el habla y disfagia por alteraciones musculoesqueléticas.
- c. Acinesia. Se define como ausencia de movimiento y tiene distintas formas de manifestarse: 1) La hipocinesia consiste en la disminución de la frecuencia y la amplitud de los movimientos espontáneos (disminución en el parpadeo y en las expresiones faciales, reducción o ausencia en el braceo). 2) La marcha parkinsoniana se caracteriza por la tendencia a la flexión, la disminución en la amplitud de la zancada y en la elevación del pie al caminar. 3) La bradicinesia se caracteriza por disminución de su amplitud hasta la desaparición del movimiento; es difícil llevar a cabo movimientos secuenciales o simultáneos.



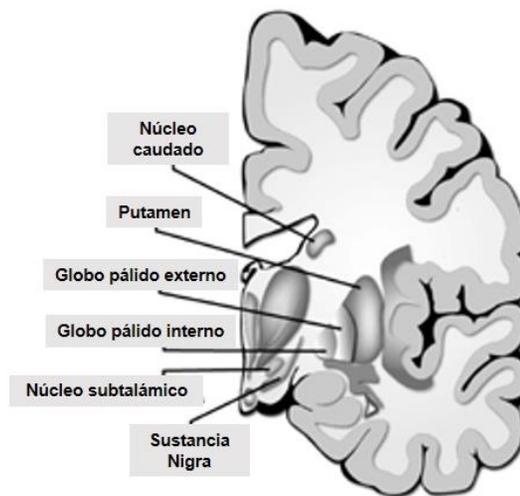
**Figura 1.** Síntomas motores de la EP.

El diagnóstico se hace clínicamente. La mayoría de los expertos señalan que la presencia de dos de los tres síntomas cardinales (acinesia, rigidez y temblor) y una buena respuesta a L-Dopa permite establecer el diagnóstico. Al principio del padecimiento puede ser difícil establecer el diagnóstico, ya que los síntomas son sutiles e incluso el mismo paciente puede no notarlos; por otro lado, algunos de los síntomas aparecen por el envejecimiento normal. Además de la sintomatología antes señalada, ya se mencionó que los pacientes con EP

pueden presentar otros síntomas no motores como: sialorrea, disartria, sudoración, molestias visuales y genitourinarias, alteraciones del sueño, seborrea, edema, constipación, parestesias y disminución del olfato (Marsh, 2009).

#### 4.2 ORGANIZACIÓN FUNCIONAL DE LOS GANGLIOS BASALES.

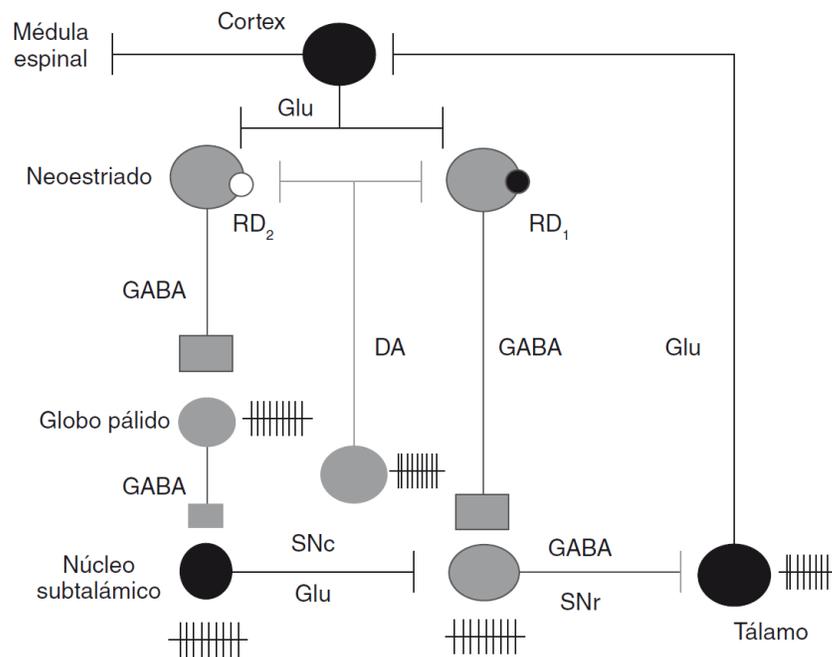
Los ganglios basales (GB) son un grupo de núcleos neuronales subcorticales que participan de manera coordinada en el control de la conducta motora. Los núcleos que se consideran parte de este sistema son el neostriado (núcleos caudado y putamen en los primates y el humano), el globo pálido externo, el globo pálido interno (núcleo entopeduncular en roedores y el gato), el núcleo subtalámico y la sustancia nigra (SN), dividida en las partes compacta y reticulada (Wichmann, 2011) (**Figura 2.**).



**Figura 2.** Anatomía de los ganglios basales.

Existe una importante relación funcional de los GB con la corteza cerebral y con el tálamo como se esquematiza en la **figura 3**. La corteza cerebral envía axones glutamatérgicos a las neuronas GABAérgicas (espinosas medianas) que conforman el 95% del total de células neuronales del neostriado. Estas neuronas se dividen en dos poblaciones de acuerdo con sus proyecciones. Una población proyecta directamente a la *sustancia nigra pars reticulada* (SNpr) formando la denominada **vía directa**. Una segunda población proyecta al globo pálido, cuyas neuronas GABAérgicas envían axones a las neuronas glutamatérgicas del núcleo subtalámico. A su vez, éstas establecen sinapsis con las mismas neuronas de la SNpr que reciben los axones de la vía directa. Las neuronas de la SNpr son GABAérgicas y proyectan al tálamo, en particular a las neuronas glutamatérgicas de relevo de los núcleos

ventromedial y ventrolateral, los cuales envían proyecciones a la corteza cerebral (Wichmann, 2011). Estos núcleos, sus proyecciones axonales y los neurotransmisores de las mismas se esquematizan en la **figura 3**. Cabe destacar que, con excepción de las neuronas de proyección del neostriado, las neuronas de los otros núcleos de los GB (globo pálido, núcleo subtalámico y SNpr) y del tálamo tienen actividad intrínseca, es decir, generan potenciales de acción de manera automática. Un componente adicional del circuito se debe a las neuronas dopaminérgicas localizadas en la SNpc, también con actividad espontánea y que proyectan principalmente al neostriado, donde establecen sinapsis con las neuronas GABAérgicas de proyección modulando su actividad.



**Figura 3.** Representación del circuito funcional formado por la corteza cerebral, los GB y el tálamo. Se muestran los núcleos involucrados, sus principales conexiones sinápticas, los neurotransmisores correspondientes y la localización diferencial de los receptores a DA D<sub>1</sub> (RD<sub>1</sub>) y D<sub>2</sub> (RD<sub>2</sub>). En negro se representan las neuronas glutamatérgicas, en gris oscuro las neuronas GABAérgicas, y en gris claro las neuronas dopaminérgicas. Cortex: corteza cerebral; Glu: ácido glutámico. (Imagen adaptada de Aquino-Miranda, 2012).

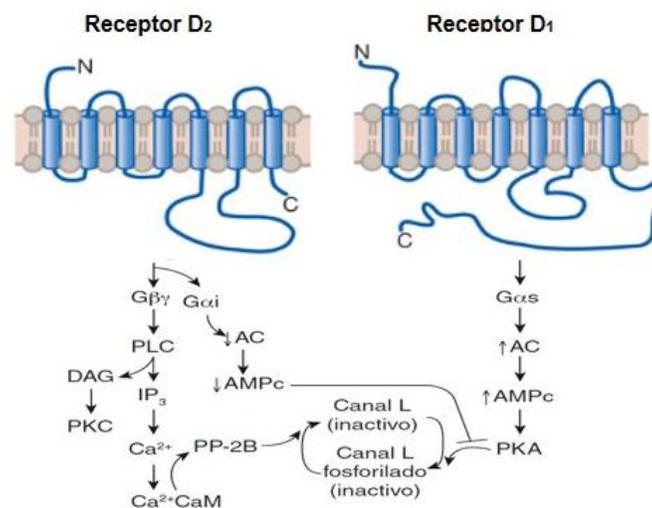
Cuando se activan las neuronas de la corteza motora (principalmente de la lámina V) se generan potenciales de acción que se propagan a lo largo de axones que terminan en las neuronas motoras de la médula espinal. Importantemente estos axones se ramifican y envían colaterales al neostriado, proveyendo a las neuronas GABAérgicas de proyección información motora cortical. El neostriado constituye así el núcleo de entrada de la

información sináptica a los GB. Por otra parte, la actividad intrínseca de las neuronas de la SNpr (el principal núcleo de salida de los GB) inhibe tónicamente a las neuronas talámicas mediante el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) liberado en sus conexiones sinápticas con las mismas. Esto último se traduce en una inhibición tónica del sistema de retroalimentación: corteza cerebral-GB-tálamo-corteza cerebral (Wichmann, 2011).

La activación de las neuronas estriadonigrales (vía directa) induce la liberación de GABA en la SNpr y disminuye, así, mediante la estimulación de receptores GABA<sub>A</sub>, la actividad de las neuronas nigrotalámicas, lo que desinhibe a las neuronas talámicas y favorece la retroalimentación glutamatérgica sobre la corteza motor, facilitando el movimiento. Por el contrario, la activación de las neuronas que proyectan del neostriado al globo pálido (GABAérgicas) induce inhibición de las neuronas palidales (también GABAérgicas) que por su actividad espontánea inhiben de manera tónica a las neuronas del núcleo subtalámico. La desinhibición de estas últimas origina una mayor liberación de glutamato en la SNpr excitando a las neuronas nigrotalámicas e induciendo, en consecuencia, una mayor inhibición de las neuronas talámicas y, por lo tanto, de las neuronas corticales, lo que se traduciría en inhibición del movimiento (**vía indirecta**). Puede advertirse, así, que las vías directa e indirecta tienen acciones opuestas sobre el circuito corteza cerebral-GB-tálamo-corteza cerebral, favoreciendo (vía directa) o inhibiendo (vía indirecta) la generación y el mantenimiento del movimiento (Wichmann, 2011).

Otro componente importante de este modelo lo conforman las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales. Los receptores a DA se clasifican en dos familias: D<sub>1</sub> (subtipos D<sub>1</sub> y D<sub>5</sub>, acoplados a proteínas G $\alpha_s$ ) y D<sub>2</sub> (subtipos D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> y D<sub>4</sub>, acoplados a proteínas G $\alpha_{i/o}$ ) (Alexander, 2011) (**Figura 4**). Aunque aún es motivo de controversia, existe evidencia de una localización preferencial de los receptores de la familia D<sub>1</sub> en las neuronas de la vía directa (estriadonigrales) y de los receptores de la familia D<sub>2</sub> en la vía indirecta (neuronas estriadopalidales) (Bertrán-González, 2010). La activación de los receptores de la familia D<sub>1</sub> resulta en la formación de 3'-5'-monofosfato cíclico de adenosina (AMPC), segundo mensajero que se une y activa a la cinasa A de proteínas (PKA), la que a su vez fosforila canales de calcio de tipo L, permitiendo una mayor entrada del catión (**Figura 4**). El sistema de señalización AMPC/PKA puede también aumentar las corrientes iónicas debidas a receptores de glutamato tipo N-metil-D-aspartato (NMDA). Además, la estimulación de los receptores D<sub>1</sub> inhibe la apertura de canales de calcio activados por voltaje N y Q que controlan la activación de canales de potasio dependientes de calcio (SK), que a su vez

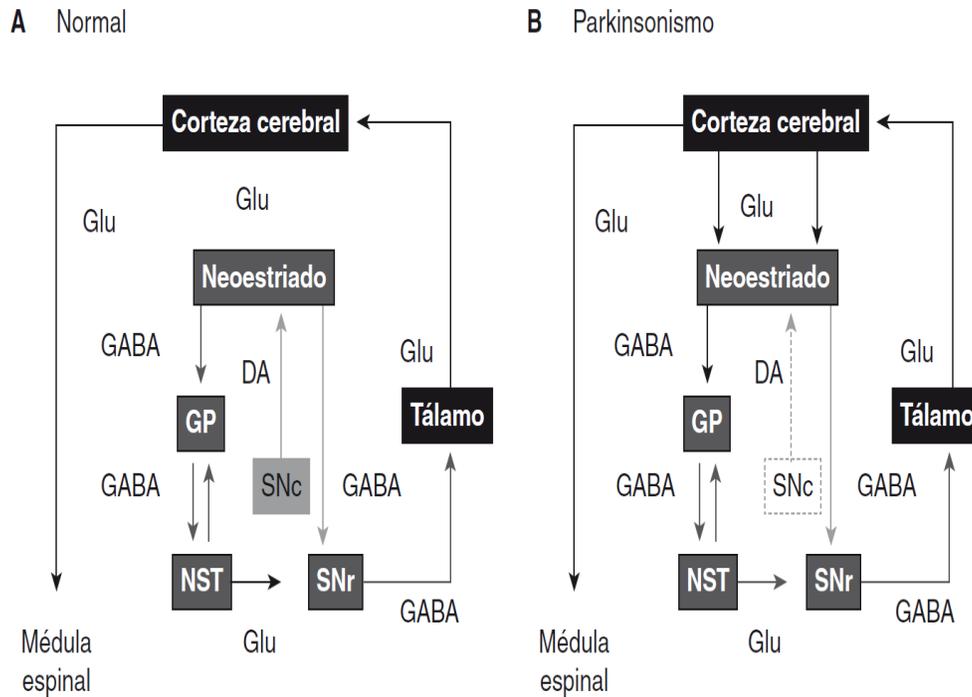
inhiben el disparo repetitivo de las neuronas estriatales de proyección. En conjunto estos efectos facilitan la generación de potenciales de acción en las neuronas estriadonigrales (Surmeier, 2011). De manera opuesta los receptores D<sub>2</sub> reducen la corriente de calcio debida a canales tipo L mediante un mecanismo dual: a) inhibición de la formación de AMPc, y b) activación de fosfatasas que desfosforilan a dichos canales, disminuyendo así la excitabilidad de las neuronas estriadopalidales (**Figura 4**) (Gerfen, 2011). Dado que las vías directa e indirecta facilitan e inhiben, respectivamente, el movimiento de acuerdo con el esquema presentado, el efecto global de la DA sería favorecer la iniciación y la continuidad de la conducta motora.



**Figura 4.** Señalización intracelular de los receptores a DA presentes en las neuronas estriatales de proyección. Se ilustran los eventos desencadenados por la activación de receptores a DA D<sub>1</sub> (RD<sub>1</sub>, neuronas estriadonigrales) y D<sub>2</sub> (RD<sub>2</sub>, neuronas estriadopalidales), y su efecto sobre el estado de fosforilación de los canales de Ca<sup>2+</sup> activados por voltaje tipo L (Cav1.3). Ca<sup>2+</sup>/CaM: complejo de Ca<sup>2+</sup> y calmodulina; DAG: diacilglicerol; G<sub>αi</sub>: subunidad α<sub>i</sub> de proteínas G; G<sub>αs</sub>: subunidad α<sub>s</sub> de proteínas G; G<sub>βγ</sub>: complejo βγ de proteínas G<sub>αi/o</sub>; IP<sub>3</sub>: 1,4,5-trifosfato de inositol; PKC: cinasa C de proteínas; PLC: fosfolipasa C; PP-2B: fosfatasa de proteínas tipo 2B (adaptado de Surmeier, 2007).

Para explicar la fisiopatología de los GB en la EP se ha desarrollado un circuito de un modelo de parkinsonismo (**Figura 5**), el modelo puede aplicarse a la situación prevalente en la EP, con una pérdida significativa de las neuronas dopaminérgicas de la SNc. En esta situación, la falta de DA en el neostriado se traduciría en la pérdida tanto de la facilitación de la vía directa como de la inhibición ejercida sobre la vía indirecta, es decir en la dificultad para iniciar y mantener el movimiento, características cardinales de la enfermedad. Dicho de otra manera, la pérdida de DA estriatal provoca una reducida actividad en la vía directa,

resultando en una desinhibición en el núcleo de salida de los GB. La pérdida de DA estriatal también provoca una mayor inhibición del GPe, y, por consiguiente, una desinhibición del STN y GPi. El efecto neto de estos cambios es un incremento en la salida de los GB al tronco cerebral y al tálamo, el cual se ha postulado a resultar en una mayor inhibición de las neuronas talamocorticales, y en reducir la capacidad de respuesta de los mecanismos corticales y del tronco cerebral involucrados en el control motor.

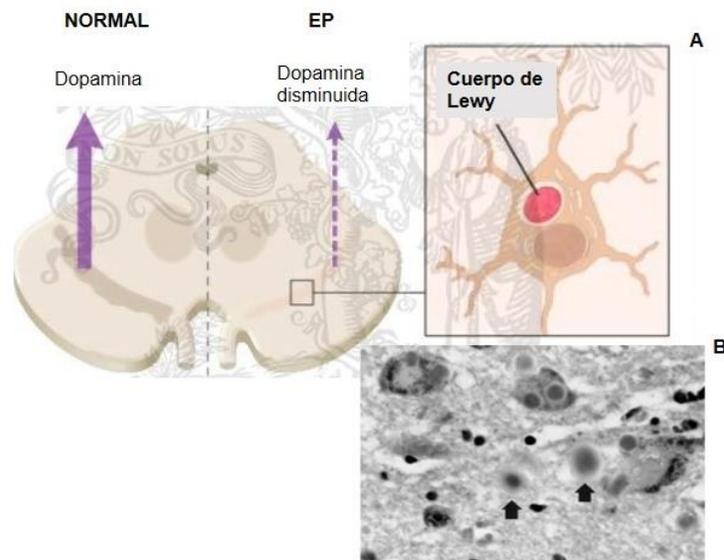


**Figura 5.** Comparación del flujo sináptico en los GB en condiciones normales (A) y en la EP (B). Se esquematizan los núcleos involucrados, sus principales conexiones sinápticas y los neurotransmisores correspondientes. El grosor de las flechas representa la magnitud de la información sináptica y los cambios en la misma. GP: globo pálido; NST: núcleo subtalámico. (Imagen tomada de Aquino-Miranda, 2012).

### 4.3 ANATOMÍA PATOLÓGICA DE LA EP.

Los primeros cambios degenerativos en la EP ocurren fuera de los GB (Braak, 2003), en el bulbo olfatorio, y estructuras del tronco cerebral, tales como el núcleo motor dorsal del vago, el locus coeruleus y el núcleo del rafe. La anatomía patológica de la EP consiste en la existencia de cambios degenerativos en las neuronas pars compacta de la SN, asociada a una gliosis reactiva moderada y una disminución de neuronas del locus coeruleus y del núcleo dorsal vago, con afectación variable del núcleo basal de Meynert y de otros núcleos subcorticales. Las destacadas anomalías motoras en la EP parecen surgir en gran

parte de la degeneración de neuronas en la SNC, con la subsecuente pérdida de DA en los ganglios basales. En esta enfermedad existe una selectividad lesional típica que la diferencia de otras entidades degenerativas, del envejecimiento y del efecto de los agentes tóxicos que, en general, lesionan más difusamente la SN (Lang, 1998). La degeneración de las células dopaminérgicas deja inclusiones intracitoplasmáticas neuronales en su paso, las llamadas neuritas de Lewy y cuerpos de Lewy (CL), considerados como marcador histopatológico característico de esta enfermedad (**Figura 6**), de causa desconocida y de vital importancia para poder diagnosticar este síndrome, aunque no son patognomónicas, ya que también aparecen en otras patologías como en la enfermedad de Alzheimer, necropsias de sujetos ancianos sanos, demencias por cuerpos de Lewy, entre otras.



**Figura 6.** Degeneración neuronal de las células dopaminérgicas en la SN. Degeneración neuronal dopaminérgica con la subsecuente disminución de DA estriatal dejando a su paso los cuerpos de Lewy (A). Los Cuerpos de Lewy dentro de las neuronas de la SN en la EP.

Estudios recientes también han demostrado que niveles bajos de respuesta inflamatoria podrían acompañar la pérdida de células dopaminérgicas, y podrían contribuir a la muerte celular. Estudios recientes de imágenes han sugerido que el abrupto declive en las concentraciones de DA estriatal, preceden el inicio de Parkinsonismo clínico, el cual normalmente sólo se ve cuando más del 70% de DA estriatal esta disminuida. En fases tempranas de la EP, la pérdida de DA afecta principalmente el putamen posterior (el área motor estriatal) pero después se extiende para involucrar otras regiones nigroestriatales.

En últimas etapas, la extensa pérdida de DA y la degeneración neuronal en sistemas no dopaminérgicos, tales como el locus coeruleus y el núcleo de rafe podrían explicar algunas de las características no motoras de la EP.

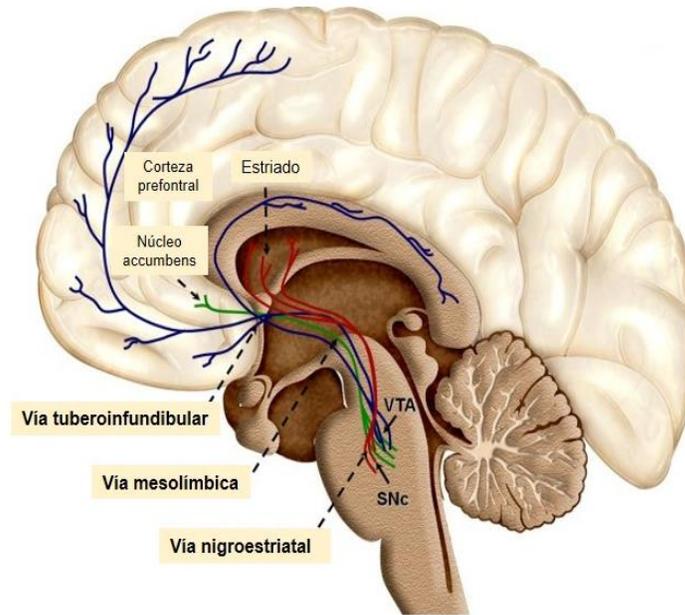
#### **4.4 DOPAMINA (DA).**

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 DA, adrenalina y noradrenalina son neurotransmisores y hormonas en la periferia y el en SNC. La DA, precursor de la norepinefrina, es el transmisor catecolaminérgico más importante del SNC, donde participa en una gran variedad de funciones, como la actividad locomotora, la afectividad, la regulación neuroendócrina y la ingestión de agua y alimentos (Bahena-Trujillo, 2000). En el Sistema Nervioso Periférico, la DA es un modulador de la función cardíaca y renal, del tono vascular y de la motilidad gastrointestinal.

La evolución de la investigación sobre la transmisión dopaminérgica puede remontarse a la década de los 50's, cuando la DA fue reconocida como un neurotransmisor, siendo detectada por primera vez en el SNC en 1958 (Robbins-Trevor, 1992). En la década de los 60's se generaron las primeras evidencias del vínculo existente entre alteraciones en la transmisión dopaminérgica y la EP.

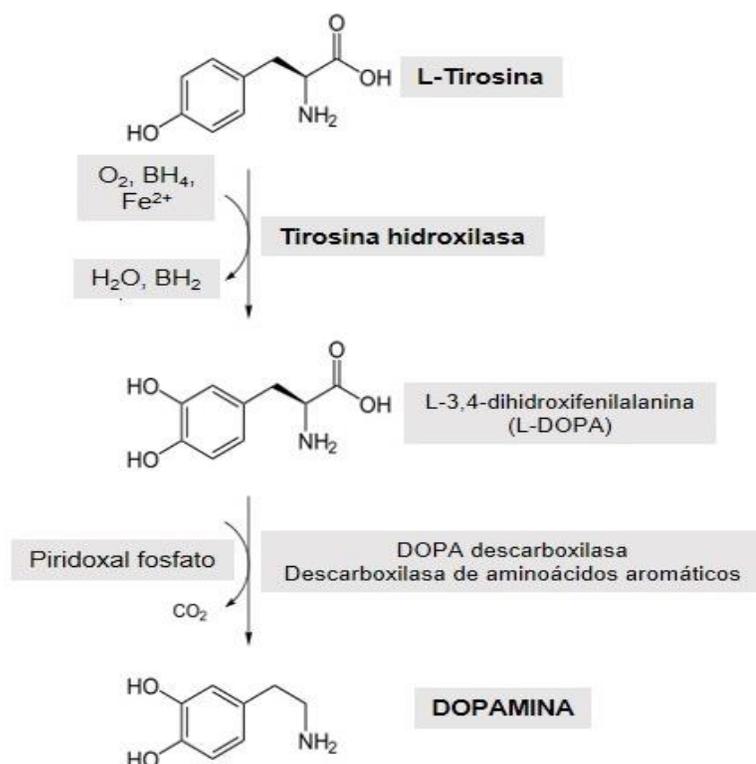
**4.4.1 Sistemas dopaminérgicos.** En el sistema nervioso central (SNC) de la rata existe un número importante de células dopaminérgicas, de 15 000 a 20 000 para cada una de las mitades del mesencéfalo (Cooper, 1996). Los sistemas dopaminérgicos han sido estudiados principalmente mediante técnicas de fluorescencia e inmunocitoquímica, y los grupos neuronales han sido denominados desde A8 hasta A17 de acuerdo a la clasificación de Fuxe elaborada en 1956 (Fuxe, 1965), basada en estudios de histofluorescencia.

El sistema dopaminérgico del mesencéfalo está organizado en tres sistemas de transmisión (Hung, 1998): (1) proyecciones neuronales originadas de la *SN* hacia el estriado, conocida como vía nigroestriatal, la cual está principalmente involucrada en el control del movimiento; (2) la vía mesolímbica inicia del área tegmental ventral (VTA) hacia el núcleo acumbens (NAc), principalmente regulando la conducta emocional; y (3) la vía tuberoinfundibular originada del núcleo arqueado a la glándula hipofisaria, con implicaciones neuroendocrinas (**Figura 7**).



**Figura 7.** Origen y proyecciones de los sistemas dopaminérgicos más importantes.

**4.4.2 Biosíntesis de DA.** La síntesis de la DA tiene lugar en las terminales nerviosas dopaminérgicas donde se encuentran en alta concentración las enzimas, tirosina hidroxilasa (TH) y descarboxilasa de aminoácidos aromáticos o L-DOPA descarboxilasa (Cooper, 1996). Los trabajos de Nagatsu y cols. (Nagatsu, 1964) y de Levitt y cols. (Levitt, 1965) demostraron que la hidroxilación del aminoácido L-tirosina es el punto de regulación de la síntesis de catecolaminas en el SNC y que en consecuencia la TH es la enzima limitante de la síntesis de DA, noradrenalina y adrenalina. La TH es un péptido de 498 aminoácidos (56 KDa) presente de manera predominante en la fracción citosólica de las terminales catecolaminérgicas (Weiner, 1989). La enzima es una oxidasa que utiliza L-tirosina y oxígeno molecular como sustratos y tetrahidrobiopterina ( $BH_4$ ) como cofactor para adicionar un grupo hidroxilo al aminoácido para formar L-DOPA (L-3,4-dihidroxifenilalanina) como se muestra en la **figura 8**. (Nagatsu, 1981). La función de la TH requiere la presencia de hierro. La constante de Michaelis Menten ( $K_m$ ) de la TH para la L-tirosina corresponde a 4-15  $\mu M$  (Kaufman, 1987) por lo que la enzima se encuentra normalmente saturada por la concentración del aminoácido (80  $\mu M$ ) que se alcanza en los tejidos cerebrales (Kaufman, 1974). En consecuencia, la disponibilidad del sustrato no es limitante en la síntesis del neurotransmisor.



**Figura 8.** Síntesis de la dopamina.

**4.4.3 Almacenamiento, liberación y recaptura de DA.** Una vez que sintetizada la DA en el citoplasma de las terminales dopaminérgicas, puede ser liberada directamente al espacio sináptico o bien ser transportada al interior de las vesículas sinápticas para ser liberada por exocitosis.

*Liberación por exocitosis.* La DA es incorporada a las vesículas sinápticas a través de la acción de los transportadores de monoaminas vesiculares de tipo 2 (VMAT2) (**figura 9**), los cuales concentran DA dentro de las vesículas a través de una bomba ATP-protón dependiente, que además de generar un gradiente ácido, produce la forma activa de DA ( $DA^+$ ). En dichas vesículas se alcanzan concentraciones de 500mM aproximadamente.

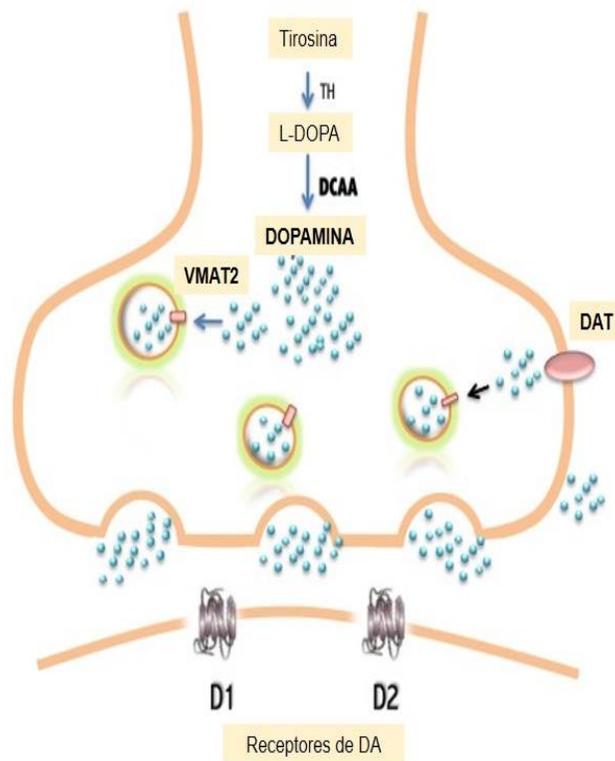
La DA contenida en las vesículas es liberada al exterior al fusionarse la membrana vesicular con la membrana de la terminal presináptica. Este mecanismo está constituido por varias etapas. Primero las vesículas transportan el neurotransmisor a su interior mediante una proteína transportadora con 12 dominios transmembranales que utiliza un gradiente electroquímico generado por una bomba (ATPasa) de protones ( $H^+$ ). La mayor parte de las vesículas sinápticas (~90%) que contienen al neurotransmisor no están libres en el

citoplasma, sino que se encuentran unidas al citoesqueleto de la terminal presináptica mediante la interacción de proteínas presentes en la membrana de la vesícula (sinapsinas I y II) con proteínas del citoesqueleto. Característicamente las sinapsinas son fosforiladas por diversas cinasas de proteína que incluyen a las cinasas I y II dependientes de iones de  $\text{Ca}^{2+}$  y de la proteína calmodulina (CaMK I y CaMK II) y por la cinasa dependiente de AMPc (PKA). Cuando un potencial de acción alcanza la terminal nerviosa, el cambio en el potencial de membrana activa a canales de  $\text{Ca}^{2+}$ . Debido al gradiente electroquímico se genera un influjo de iones  $\text{Ca}^{2+}$  los que en conjunto con la calmodulina activan a las cinasas CaMK I y CaMK II, las que fosforilan a la sinapsina I (CaMK I y CaMK II) y a la sinapsina II (CaMK II). La adición de un grupo fosfato a las sinapsinas debilita la unión de las vesículas sinápticas al citoesqueleto, facilitando así su transporte a la zona activa. Una vez transportadas a la zona activa las vesículas se fijan a la misma, donde experimentan un proceso que las hace competentes para la exocitosis. Donde la llegada de un potencial de acción permite la apertura de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles a voltaje, y el aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  afecta a diversas proteínas, entre ellas aquéllas involucradas en la exocitosis, terminando de manera súbita el proceso de fusión de la vesícula (Bahena-Trujillo, 2000).

*Liberación independiente de  $\text{Ca}^{2+}$ .* Este segundo tipo de liberación de DA es característicamente inhibido por fármacos que el bloquean al transportador de DA presente en la membrana de la terminal sináptica y cuya función es terminar la acción del neurotransmisor, capturándolo hacia el interior de la terminal. Los transportadores constituyen el principal mecanismo para la terminación de la transmisión sináptica en el SNC (Feldman, 1997). Una vez liberada al espacio sináptico la DA se une a receptores pre y postsinápticos. Aunque existen enzimas extraneuronales que la catabolizan, la terminación del efecto del neurotransmisor se debe principalmente a la captura de este por las propias terminales nerviosas que la liberaron (Cooper, 1996).

El transportador para DA (**figura 9**) pertenece a la familia de proteínas transportadoras que dependen de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ , que tienen 12 dominios transmembranales y presentan varios sitios de fosforilación (Attwell, 1994). La DA es cotransportada al interior de la terminal con 2 iones de  $\text{Na}^+$  y un ion  $\text{Cl}^-$ . El transportador es sensible a inhibición por diferentes fármacos (GBR-12909, nomifensina, mazindol, cocaína y anfetamina) y su función puede ser modulada por segundos mensajeros como el diacilglicerol y el ácido araquidónico. De manera relevante,

el transportador es también responsable de la captura de las neurotoxinas 6-hidroxidopamina y 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) (Reith, 1997).



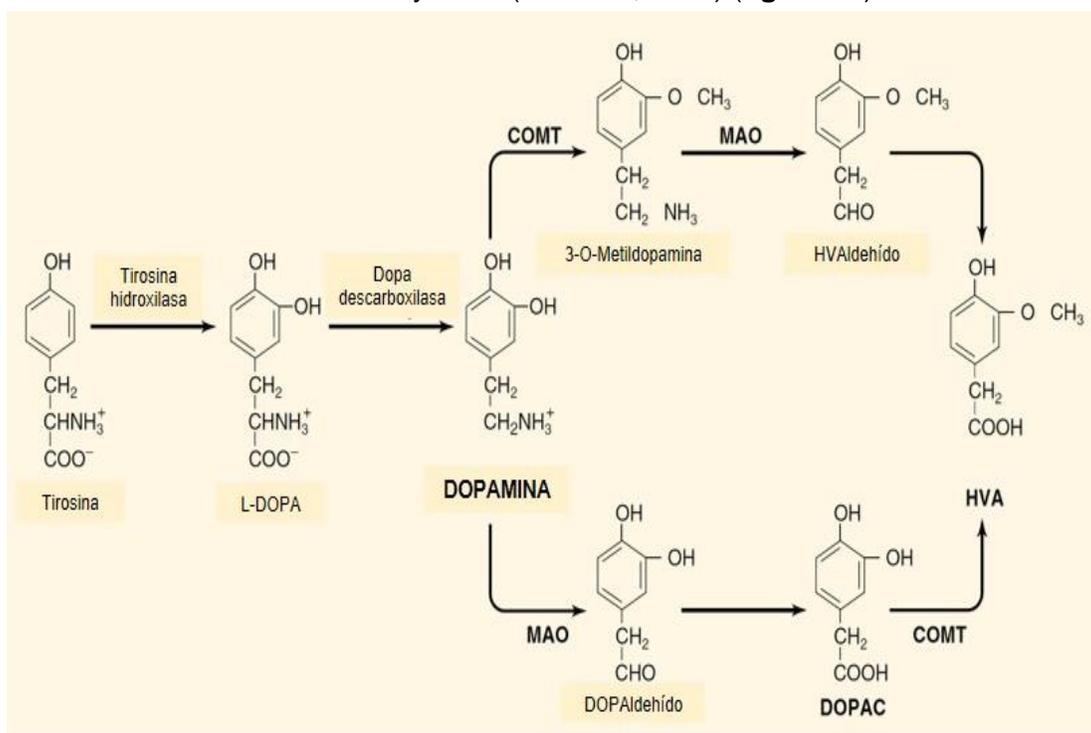
**Figura 9. Almacenamiento, liberación y recaptura de DA.** VMAT2: transportador de monoaminas vesicular tipo 2; DAT: transportador de DA.

Se ha observado que la DA que se libera de manera preferente en respuesta a estimulación sináptica es la recién sintetizada. El neurotransmisor parece así encontrarse en dos pozas metabólicas, ambas vesiculares; una que contiene la DA recién sintetizada y una segunda que correspondería a una poza que funciona como almacén. Es probable la existencia de una tercera poza metabólica abastecida por los transportadores y que sería la fuente de la liberación de DA por transporte reverso (Bahena-Trujillo, 2000).

**4.4.4 Receptores dopaminérgicos.** Las técnicas de clonación molecular han permitido la identificación de 5 tipos de receptores dopaminérgicos, todos ellos acoplados a proteínas G y divididos en dos familias farmacológicas denominadas D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>. Los receptores de la familia D<sub>1</sub> (subtipos D<sub>1</sub> y D<sub>5</sub>) están acoplados a proteínas G<sub>s</sub> y estimulan la formación de AMPc como principal mecanismo de transducción de señales. Los subtipos pertenecientes a la familia D<sub>2</sub> (D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> y D<sub>4</sub>) inhiben la formación de AMPc, activan canales de K<sup>+</sup> y reducen la entrada de iones de Ca<sup>2+</sup> a través de canales dependientes del voltaje, efectos mediados

también por proteínas G ( $G_{\alpha i}$  y  $G_{\alpha o}$ ) (**figura 9**). Los receptores dopaminérgicos se encuentran ampliamente distribuidos en diversas áreas del SNC (aunque de manera diferencial de acuerdo al subtipo. El subtipo  $D_1$  es el receptor dopaminérgico más abundante en el SNC (Jackson, 1994). Niveles altos del receptor se encuentran el túbulo olfatorio, el neostriado, el núcleo accumbens, las islas de Calleja, la amígdala, el núcleo subtalámico, la SNr y SNc y el cerebelo.

**4.4.5 Metabolismo de DA.** Las enzimas monoamina oxidasa (MAO) y catecol-O-metiltransferasa (COMT) son las principales responsables de la inactivación de las catecolaminas. La DA recapturada es convertida por la MAO, presente en el interior de la terminal nerviosa, en ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) el cual es liberado al exterior de la terminal para ser convertido en ácido homovanílico (HVA) por la enzima COMT. La DA no capturada por la terminal dopaminérgica es metabolizada en HVA por la acción secuencial de las enzimas COMT y MAO (Feldman, 1997) (**figura 10**).



**Figura 10.** Metabolismo de DA. Las dos rutas de degradación enzimática por acción de la enzima MAO y la enzima COMT.

Se distinguen dos isoenzimas de la MAO (MAO-A y MAO-B), las cuales fueron identificadas por Johnston en 1968. Estas se diferencian en base a la preferencia por el sustrato, especificidad por el inhibidor, distribución tisular y celular, propiedades inmunológicas y las

secuencias aminoacídica y nucleotídica (Westlund, 1985). La MAO es una flavoproteína integral de la membrana externa de la mitocondria de las neuronas y células gliales (Schnaitman, 1967) aunque también se ha detectado una cierta actividad de MAO en la fracción microsomal y citosólica (Copeland, 1983). La DA puede ser metabolizada por ambas isoformas de MAO.

En el cerebro humano, el 70% de la actividad de la MAO es del tipo B, mientras que en rata ésta sólo es de un 5% (Riederer, 1978; Oreland, 1983). La MAO-A está localizada intraneuronal y la MAO-B se encuentra mayoritariamente en la glia (Yu, 1986). Así, en el cuerpo estriado de humanos la desaminación oxidativa de la DA ocurre mayoritariamente a través de la isoforma B de forma extraneuronal (Glover, 1980), mientras que en la rata tiene lugar principalmente por la isoforma A de manera intraneuronal (Butcher, 1990).

El DHFA formado por acción de la MAO es muy inestable y es oxidado a ácido por la aldehído deshidrogenasa dando lugar a DOPAC, el cual a continuación sale de la neurona y es tomado por la glia actuando sobre él la COMT. Esta enzima cataliza la transferencia de grupos metilos a grupos catecoles a partir de S-adenosilmetionina, para lo que requiere cationes divalentes. Se han caracterizado dos formas distintas de la COMT: una soluble (S-COMT) y otra unida a membranas (MB-COMT). Se piensa que la S-COMT se localiza principalmente en células gliales. La acción de esta enzima sobre DOPAC genera HVA.

En el cerebro de rata el principal metabolito de la DA es el DOPAC, en tanto que en el cerebro de los primates el HVA es el metabolito principal. Así la formación de DOPAC puede utilizarse como indicador de la actividad dopaminérgica en la rata, mientras que la determinación de HVA en tejidos cerebrales y en líquido cefalorraquídeo se utiliza también como índice de la actividad de las neuronas dopaminérgicas (Cooper, 1996). Concentraciones de HVA se encuentran disminuidas en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con EP.

#### **4.5 ALTERACIONES BIOQUÍMICAS DE LA EP.**

La alteración más notable es la marcada depleción de DA en el neostriado (más de un 80% de su contenido normal) consecuencia directa de la degeneración y pérdida neuronal en la SN (más del 50%) momento en el cual el síndrome rigidoacínético se hace manifiesto. Otros sistemas neuronales no dopaminérgicos (noradrenérgico, colinérgico y serotoninérgico) están también afectados y, probablemente, sean responsables de los trastornos de la marcha, demencia y otros síntomas doparresistentes.

Durante el establecimiento de la EP la región cerebral más afectada es la SNc, presentando alteraciones bioquímicas como el cambio en la relación entre hierro(II)/hierro(III) en la SN de 2:1 en un cerebro normal a 1:2 en un cerebro parkinsoniano (Sofic, 1988); disminución en la actividad de sistemas antioxidantes como GPx y catalasa, así como una disminución en los niveles de glutatión reducido (GSH); y por otro lado, se presenta un incremento en la actividad enzimática de SOD (Fahn, 1992). La relación entre GSH/GSSG (glutatión oxidado) disminuye durante la degeneración neuronal, lo cual favorece la formación de radicales libres. Además existe una reducción en la actividad del Complejo I de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (CTEM), se reportó en tejido nervioso una disminución del 30-40% en la actividad del Complejo I en la SNpc (Schapira, 1990) y en la corteza frontal (Parker, 2008) de cerebros *post mortem*. Actualmente, el incremento en el contenido de Fe de la SNpc de pacientes con EP se ha convertido en un factor clínico de diagnóstico con una especificidad del 96% (Walter, 2003).

#### 4.6 ETIOLOGIA DE LA EP.

Aunque se sabe que la alteración patológica que subyace a la EP es la pérdida de las neuronas dopaminérgicas en el área ventral de la SNc, aún no se conoce la causa de esta enfermedad; en la mayoría de los casos se ha propuesto una combinación de múltiples factores que actúan a la vez, como el envejecimiento natural, la vulnerabilidad genética y las exposiciones ambientales.

*Papel del envejecimiento.* Anatomopatológicamente, el envejecimiento se asocia a una disminución de las neuronas pigmentadas de la SN, un aumento de la detección de CL (hasta en un 16% de las necropsias de ancianos sanos), una disminución de la captación de F-DOPA (F-fluoro-L-Dopa) evidenciada en algunos estudios de PET (tomografía con emisión de protones) y una reducción de los transportadores de DA del estriado objetivada en estudios con SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography). A pesar de lo anterior y aunque la incidencia de EP aumenta con la edad, se acepta que ésta no constituye simplemente una aceleración del envejecimiento (Lang, 1998b).

*Papel de la predisposición genética.* La mayoría de los pacientes con EP no tienen antecedentes familiares. Un 15% de los pacientes tienen un familiar de primer grado afectado. Se han identificado nueve loci genéticos asociados a un parkinsonismo autonómico dominante o recesivo. En ciertos casos familiares se han encontrado mutaciones en alguno de los genes que codifican la  $\alpha$ -sinucleína (principal componente de

los CL), la parkina o la ubiquitina terminal C hidrolasa terminal L1. Sin embargo, la vulnerabilidad genética desempeña un papel más importante en la enfermedad de inicio juvenil que en la de inicio tardío (Lang, 1998b).

*Papel de los factores ambientales.* Cabe destacar, principalmente, el contacto con pesticidas y herbicidas, el entorno rural, el consumo de agua de pozo y neurotoxinas como el 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) y su metabolito MPP<sup>+</sup> (1-metil-4-fenilpiridio), que producen patrones de daño cerebral y fenotipos de comportamiento muy similares a la EP (Beal, 1995). Existen evidencias científicas que demuestran que la exposición a estas neurotoxinas ambientales favorece el estrés oxidativo y pueden dañar específicamente a las neuronas dopaminérgicas de la SN (Przedborskin, 1998), esto es debido a que la sensibilidad de la vía nigroestriatal a estas toxinas demuestra su vulnerabilidad al ataque por radicales libres (Cohen, 1974).

#### **4.7 MECANISMOS DE NEURODEGENERACIÓN EN LA EP.**

Algunos estudios sugieren como agentes causantes de la degeneración neuronal en la EP, la participación del estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial, excitotoxicidad y los efectos tóxicos del óxido nítrico. Además, se ha demostrado que la DA y sus metabolitos oxidados están involucrados en el daño a neuronas dopaminérgicas (Santiago, 2008). También existen evidencias en estudios *post mortem* y experimentales, que demuestran que la presencia de un estado de estrés oxidativo está involucrada en la neurodegeneración progresiva de la SN (Jenner, 2003), que se presenta en la EP. Esta evidencia apoya la idea de que hay altos niveles de especies reactivas en la SNc en condiciones homeostáticas y que éstas se incrementan notablemente en la EP (Schapira, 1990).

**4.7.1 Estrés Oxidativo.** El estrés oxidativo (EO) es una condición dañina para las neuronas dopaminérgicas, que se presenta cuando se incrementa excesivamente la producción de radicales o especies reactivas y disminuyen los sistemas antioxidantes endógenos. Normalmente las especies reactivas son eliminadas por sistemas antioxidantes intracelulares, sin embargo, como resultado del proceso normal de envejecimiento, o por alguna alteración patológica, estos mecanismos se encuentran dañados. Esta pérdida del balance óxido-reducción en el organismo produce daño celular severo que puede llevar a

la muerte celular. Este fenómeno contribuye a la cascada principal de cambios bioquímicos que conllevan a la degeneración de las células dopaminérgicas en la EP.

Los radicales libres son definidos como moléculas o fragmentos moleculares con uno o dos electrones desapareados. Un electrón desapareado incrementa la reactividad química de un átomo o molécula y busca complementar su último orbital; es por ello que los radicales libres tienen una vida media muy corta (millonésimas de segundos) y son altamente reactivos con otras moléculas (Castrejón, 2007). El EO se origina por un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y especies reactivas de nitrógeno (ERN) y la capacidad antioxidante de la célula. Las ERO incluyen, entre otras, el anión superóxido ( $O_2^-$ ), el radical hidroxilo ( $\bullet OH$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ); y las ERN incluyen el óxido nítrico ( $NO^\bullet$ ), dióxido de nitrógeno ( $NO_2^\bullet$ ) y el peroxinitrito ( $OONO^\bullet$ ), entre otras moléculas. Por otro lado, los antioxidantes son moléculas que cuando están presentes en concentraciones más bajas respecto a las de un sustrato oxidable, retrasan o inhiben la oxidación de este sustrato; entre ellos podemos mencionar los sistemas antioxidantes enzimáticos, que incluyen a la catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx) y los sistemas no enzimáticos como las vitaminas A, C y E, flavonoides, carotenoides y algunos metabolitos de bajo peso molecular como el glutatión en su forma reducida (GSH).

El cerebro tiene altas concentraciones de fosfolípidos y ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), los cuales son vulnerables al ataque por ERO. La cantidad de PUFAs dentro la SN es reducida en la EP, mientras que el malondialdehído, un indicador de la oxidación de lípidos, se encuentra incrementado (Zhou, 2008). El cerebro posee un elevado metabolismo oxidativo y un alto contenido de moléculas susceptibles de ser dañadas por especies reactivas, aunado a una baja capacidad antioxidante comparada con otros tejidos; por tanto, las ERO y ERN producidas en cantidades abundantes en el cerebro, lo hacen más susceptible al daño oxidativo. El EO ha mostrado ser uno de los factores que predisponen para la neurodegeneración (Halliwell, 2006). Este está íntimamente ligado a otros componentes de procesos degenerativos, como disfunción mitocondrial, excitotoxicidad, toxicidad del óxido nítrico e inflamación (Jenner, 2003).

El EO resulta en daño al ADN, colapso de proteínas, fallo enzimático y destrucción de lípidos (Zuo Li, 2013). El daño a los tejidos causado por EO se ha relacionado con diversos

fenómenos biológicos, incluyendo envejecimiento, y neurodegeneración (Halliwell, 2006). Estudios en cerebros *post mortem* de pacientes con la EP, revelaron un aumento en los niveles de la lipoperoxidación (Dexter, 1991); así como también se encontró en el líquido cefalorraquídeo una disminución en los sistemas de defensa antioxidante y bajo contenido de GSH (Boll, 2008). Es importante mencionar, que el tratamiento sintomático con L-Dopa (precursor de DA) contribuye a la carga oxidativa y participa en la progresión de la EP (Weiner,2000).

Por otro lado, la presencia de neuromelanina en células dopaminérgicas es importante en procesos como la autooxidación de DA, formación de semiquinona y polimerización, a través de los cuales se producen especies reactivas (Graham, 1978). Esto nos lleva a pensar, que el metabolismo de la DA puede ser responsable de los altos niveles de EO en la *SNpc*, ya que la degradación de la DA por la MAO-B produce  $H_2O_2$  promoviendo el EO (Adams, 1972). También se sabe que la oxidación enzimática de la DA a  $H_2O_2$  provoca un incremento de la formación de GSH, sugiriendo la existencia del EO y el deterioro del principal sistema antioxidante (Spina,1988). Es importante mencionar, que el  $H_2O_2$  genera radicales hidroxilo en presencia de metales que incluyen hierro (reacción de Fenton), que normalmente se encuentran en la *SNc* (Youdim, 1989), ya que estudios postmortem de tejidos tomados de los GB de pacientes con EP, los niveles de hierro son incrementados en la *SNc* (Hirsch, 1991). Mientras los niveles reducidos de GSH son disminuidos, induciendo un deterioro de la función del complejo I mitocondrial (Schapira, 1990; Youdim, 1989).

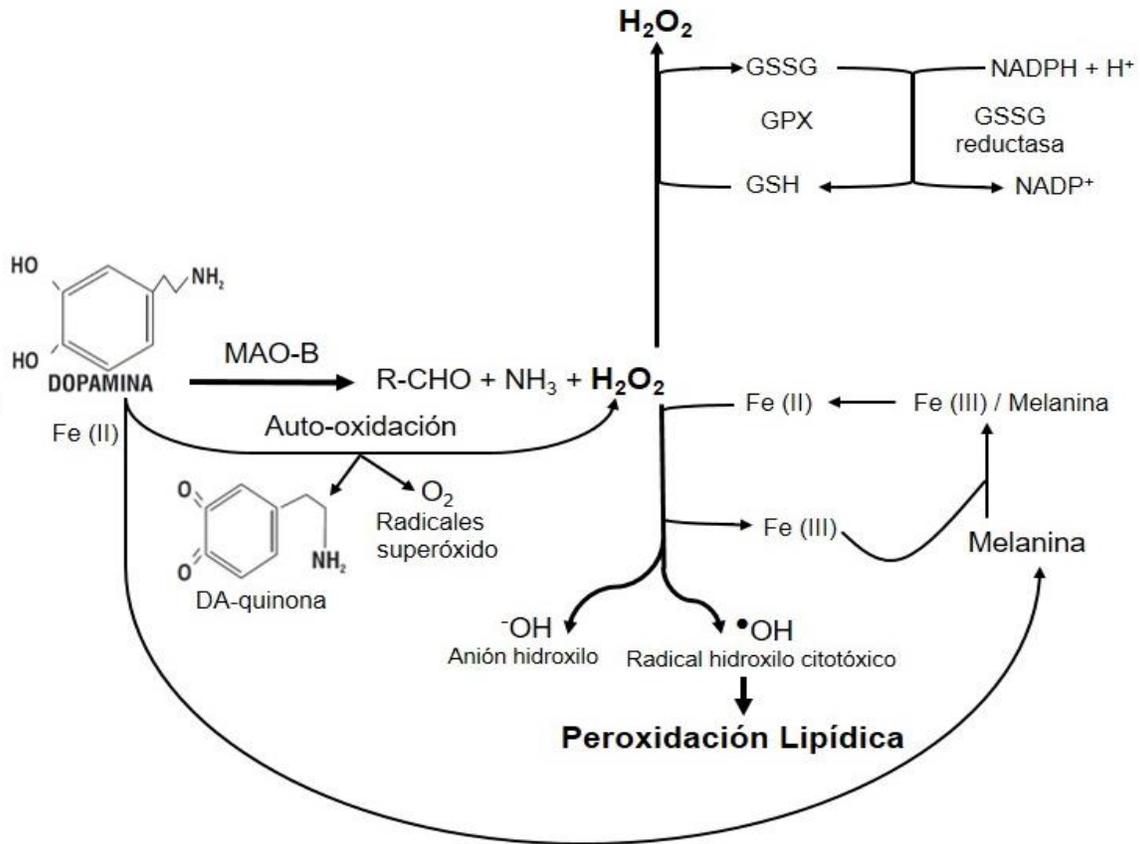
Durante el proceso de EO también existe una sobreproducción de  $^{\cdot}ON$  (Hunot, 1996) a causa de la sobre expresión de la isoforma inducible de la sintasa del óxido nítrico (SON); incremento en el contenido total de hierro ( $Fe^{2+}$ ) y zinc ( $Zn^{2+}$ ) y disminución en el contenido de ión cobre ( $Cu^{2+}$ ) y manganeso ( $Mn^{2+}$ ) (Dexter, 1991). Es importante mencionar, que la activación de las células gliales, especialmente la microglía, es un componente clave de la patología de la EP (McGeer, 1988); ya que, una vez activadas las células gliales, estas no liberan únicamente citocinas y glutamato, sino también ERO y ERN, que son tóxicas para las células dopaminérgicas (McNaught, 2000).

**4.7.2 Dopamina como fuente de EO.** En condiciones de pH normal, las neuronas dopaminérgicas se exponen a EO por el metabolismo propio de la DA, que produce varias

moléculas que actúan como neurotoxinas endógenas tales como: la DA-quinona, los radicales superóxido y el peróxido de hidrógeno (**figura 11**) (Gómez-Chavarín, 2012). Alternativamente, la fracción de DA sin almacenar puede sufrir degradación espontánea o degradación enzimática por acción de la enzima MAO-B produciendo sus principales metabolitos, DOPAC y HVA, así como  $H_2O_2$ ,  $O_2^-$ , y quinonas de DA como metabolitos menores (Kumar, 2012). El peróxido de hidrógeno es relativamente inocuo, pero cuando interacciona con metales en su forma reducida, hierro ( $Fe^{2+}$ ) y cobre ( $Cu^{1+}$ ) (reacción de Fenton) se producen radicales hidroxilo altamente citotóxicos, el hierro puede provenir de la neuromelanina o de la ferritina (**figura 11**). Cabe mencionar que en la SN la concentración de  $Fe^{2+}$  siempre es más alta que en otras regiones del cerebro, y se debe enfatizar que, en el curso de la EP, exactamente las neuronas dopaminérgicas que contienen neuromelanina son las que mueren (Ben-Shachar, 1991). El superóxido no es una molécula altamente reactiva, pero al convertirse en peróxido de hidrógeno por acción de la SOD, o en radicales peroxinitritos lábiles en presencia de óxido nítrico, se vuelve altamente reactivo. Se ha reportado que la actividad de la MAO-B incrementa con la edad (Mann, 1984), lo que resulta en una disminución en la biodisponibilidad de catecolaminas en la hendidura sináptica (Jossan, 1991). Además, se ha demostrado que pacientes con la EP presentan una elevada actividad de la MAO-B en la SN (Riederer, 1983). También se sabe que la oxidación enzimática de la DA a  $H_2O_2$  provoca un incremento de la formación de glutatión oxidado (GSH), sugiriendo la existencia del EO y el deterioro del principal sistema antioxidante (Spina, 1988).

Por otro lado, se ha reportado que la DA puede formar metabolitos reactivos a través de una vía secundaria de reacción, cuyos compuestos también son tóxicos directamente sobre la célula. Debido a la naturaleza inestable del anillo fenólico de la DA, puede ser oxidada a moléculas reactivas, quinonas de DA (DAQ's), que una vez formadas pueden reaccionar con la cisteína y producir residuos de cisteinil, estas estructuras son capaces de inhibir la función de muchas proteínas, y producir disminución de ATP por bloqueo de la cadena respiratoria (Olanow, 1993). Sin embargo, parte de las especies reactivas que se generan son neutralizadas principalmente por la neuromelanina, la cual es un polímero de color negro que le da la característica a la SN, con fierro como centro quelante (Ramsden, 2001). Paradójicamente la neuromelanina se forma a partir de DAQ's (la DA-p-quinona imina). Durante esta reacción se genera radical superóxido. En condiciones de homeostasis redox todos estos compuestos reactivos se están generando constantemente. Por lo tanto, las

DAQ's son especies inestables que se forman de manera natural e inevitable en el tejido nervioso. Sin embargo, durante el estado de estrés oxidativo aumenta la generación de estos compuestos, los cuales no pueden ser reducidos por las defensas antioxidantes para mantener el equilibrio de óxido-reducción en la SN. Adicionalmente a ello, el metabolismo de DA tiende a formar colateralmente otras especies tóxicas que pueden dañar neuronas dopaminérgicas de modo no específico (Enochs, 1994; Zecca, 2006).



**Figura 11.** Metabolismo de la DA por acción de la enzima MAO-B, así como la auto-oxidación de la DA. Se esquematiza la capacidad del peróxido de hidrógeno y la melanina de alterar el estado redox del hierro entre sus dos valencias con el resultado de la formación del radical hidroxilo citotóxico que induce a la Peroxidación lipídica (Modificada a partir de Gerlach, 1994).

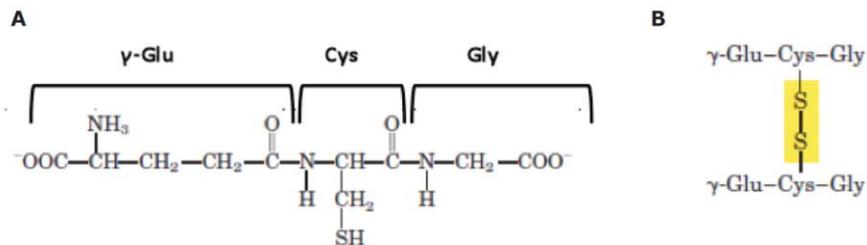
Por todo lo anteriormente expuesto es imperativo que la DA sea inocua para la neurona, y esto se logra almacenándola rápidamente dentro de las vesículas sinápticas, donde gracias al pH bajo y ausencia de la MAO, se tienen las condiciones adecuadas para mantener estable a la DA. El principal mecanismo por el cual las neuronas de la SN se protegen de los efectos dañinos de la oxidación de la DA no almacenada, es la recaptura de la DA

liberada dentro de la sinapsis por el transportador de DA (DAT), seguido del secuestro de DA por las vesículas sinápticas (VMAT2) (Gómez-Chavarín, 2012). Sin embargo, se ha reportado que se presenta una disminución significativa en DAT en personas con edad avanzada en comparación con voluntarios jóvenes sanos (Volkow, 1996), y la DA citosólica produce  $H_2O_2$  y  $\bullet OH$  que causan muerte neuronal (Caudle, 2007). Por lo tanto, es importante considerar que el metabolismo de la DA en presencia de un estado crónico de EO es una notable fuente de compuestos oxidados, los cuales favorecen y mantienen el estado de EO que induce un proceso neurodegenerativo crónico, como el que se presenta en la EP.

**4.7.3 Disfunción mitocondrial en la patogénesis de la EP.** La teoría de “los radicales libres mitocondrial en el envejecimiento” de Harmon, sugiere que la mitocondria es la principal fuente de producción de ERO (Harman, 1972), ya que radicales libres, como el superóxido (se produce de 2-3 nanomoles de  $\bullet O_2^-$ /min/mg de proteína) (Beal, 2000), son producidos por la vía de fosforilación oxidativa dentro de la cadena respiratoria mitocondrial. Se ha relacionado estrechamente la disfunción mitocondrial con el incremento en la formación de ERO en la EP (Yan, 2012), además de que existen evidencias de que el deterioro de las neuronas dopaminérgicas es provocado por este mecanismo mitocondrial patógeno que permite la producción de EO. Investigaciones actuales demuestran que el 25-30% de los pacientes con EP tienen deficiencias significativas (30-40%) en la actividad del complejo I (NADH Ubiquinona oxido-reductasa) de la CTEM dentro de la SNpc (Heo, 2012). Esta alteración mitocondrial, da lugar a un desacople en la CTEM provocando una excesiva producción de ERO (Adam-Vizi, 2005), como el radical superóxido y el  $H_2O_2$ . Durante el proceso de fosforilación oxidativa dentro de la mitocondria, el oxígeno ( $O_2$ ) sufre una reducción tetravalente a agua, además de la producción de ATP, pero del 1-5% del oxígeno se fuga a lo largo de la CTEM provocando la formación de ERO, las cuales pueden dañar a proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos (Beal, 1995). Se ha reportado que, en la EP, la disfunción mitocondrial produce aproximadamente siete veces más radicales libres que en condiciones fisiológicas normales, superando la respuesta de sistemas antioxidantes (Calabrese *et al.*, 2001).

La combinación de la disfunción mitocondrial y el EO, además de la contribución de la DA y los productos de su oxidación, desempeñan un papel importante en la patogénesis de la EP (Belluzzi, 2012).

**4.7.4 Deficiencia de glutatión.** El balance entre la producción de ERO y los mecanismos antioxidantes se encuentran alterados en el envejecimiento y en diversas enfermedades neurodegenerativas (Farooqui, 2011), hay bastantes evidencias científicas que reportan el decremento de los niveles de glutatión (GSH) como una de las alteraciones bioquímicas tempranas más importantes que se presentan en la EP (Martínez-Sámamo, 2011). El GSH es un tripéptido constituido por glutamato, cisteína y glicina ( $\gamma$ -L-glu-L-cis-gli), es el compuesto tiol intracelular no proteico más abundante, también se puede encontrar como glutatión disulfuro u oxidado (GSSG) (**figura 12**) (Martínez-Sámamo, 2011). Durante la detoxificación de las ERO, el GSH está involucrado en dos tipos de reacciones, la interacción no enzimática con radicales como el anión superóxido, óxido nítrico y radical hidroxilo; y otra forma es proporcionando un electrón para la reducción de  $H_2O_2$  en la reacción catalizada por la enzima GPx (Martínez-Sámamo, 2011), esta función también la ejecuta la enzima catalasa, pero los niveles de esta proteína son extremadamente bajos en el cerebro, por lo que el GSH representa el mayor sistema de defensa antioxidante en el cerebro (Blum *et al.*, 2001).



**Figura 12.** Representación de: **A**, glutatión reducido (GSH) y **B**, glutatión oxidado (GSSG). El GSH está constituido por tres aminoácidos: glutamato, cisteína y glicina. En el caso del GSSG son dos moléculas unidas por un puente disulfuro formado por las cisteínas.

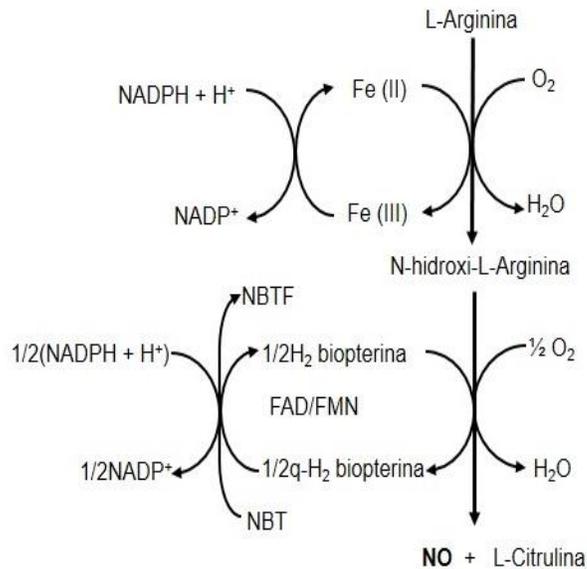
Análisis bioquímicos de cerebros postmortem de pacientes con EP han proporcionado evidencia de la generación de EO en la SN, además de que el contenido de glutatión total en esta región se encuentra disminuido en 40-50% (Martínez-Sámamo, 2011). El valor elevado de la relación GSSG/GSH (normalmente 1:10) es consistente con el concepto de EO como parte importante en la patogénesis de la EP. Por otro lado, las concentraciones bajas de GSH, parecen ser el primer indicador de EO durante la progresión de la EP. Además de los niveles bajos de este metabolito, se ha observado que la enzima  $\gamma$ -glutamyl transpeptidasa ( $\gamma$ -GT) (enzima unida a la membrana celular que inicia la degradación extracelular de GSH) está incrementada selectivamente en la SN, este incremento podría

reflejar el intento para conservar localmente la disponibilidad de los precursores del glutatión (cisteinilglicina) para prevenir una disminución en los niveles del glutatión de las neuronas dopaminérgicas (Martínez-Sámano, 2011).

Aunque la disminución de GSH por sí sola no es la responsable de la degeneración de las neuronas dopaminérgicas, la disminución de GSH podría volver a las neuronas susceptibles a otros estímulos estresantes y contribuir al daño neuronal. Se ha descrito que el GSH protege del estrés nitrosativo al complejo I de la CTEM, ya que se forma el S-nitrosoglutatión. Cuando este complejo incrementa su contenido de grupos nitrotirosina y nitrosotiol, en respuesta al estrés nitrosativo, se inhibe su actividad y, en consecuencia la formación de ATP, lo que conduce a degeneración neuronal y la muerte de las neuronas dopaminérgicas (Dringen, 2000; Martin, 2009).

También las células gliales contribuyen a la generación de ERO en la EP, la vulnerabilidad selectiva de las neuronas dopaminérgicas podría ser en parte debido a la actividad de las células gliales que rodean a estas neuronas, ya que estas células gliales también están implicadas directamente en los niveles de GSH. El compromiso del sistema del glutatión en células astrogliales podría contribuir a la disminución de defensas antioxidantes y por lo tanto incrementar la susceptibilidad de estas células y en consecuencia, una deficiente defensa glial podría contribuir al daño neuronal existente (Heales, 2004).

**4.7.5 Sobreproducción de Óxido Nítrico en la EP.** Existen evidencias que sugieren que la generación de ON a partir de L-arginina también podría contribuir e incluso iniciar los efectos citotóxicos y la muerte neuronal (Gerlach, 1994). La biosíntesis del ON involucra una oxidación de L-arginina por NADPH y oxígeno molecular catalizada por una monooxigenasa llamada sintasa de ON (**figura 13**) El NO es una molécula pequeña no polar que difunde fácilmente a las membranas neuronales y a las neuronas adyacentes (Garthwaite, 1995). Debido a que el hierro (no-hem) puede estar involucrado en la transferencia de electrones al oxígeno (**figura 13**), el cambio en la relación de hierro(II)/hierro(III) en la SN de ~2:1 en el cerebro normal a 1:2 en el cerebro parkinsoniano (Sofic, 1988) puede reflejar una mayor síntesis de ON, posiblemente por la microglia reactiva.

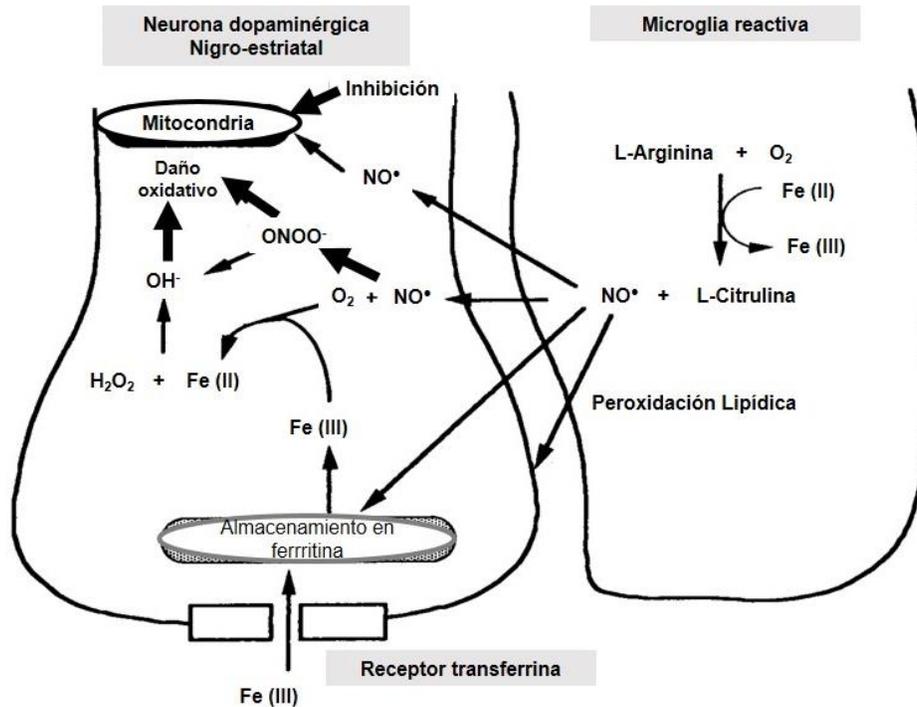


**Figura 13.** Mecanismo propuesto para la actividad de la sintasa de ON (Gerlach, 1994). En esta reacción se produce ON y L-Citrulina a partir del aminoácido L-Arginina.

Es bien sabido que el ON inhibe algunas enzimas, al complejo I y complejo de II de la CTEM (Granger, 1982), interactuando directamente con el hierro en su sitio activo catalítico de hierro-azufre. Por otro lado, el ON es un radical libre que *per se* es una molécula altamente reactiva que puede reaccionar con oxígeno molecular y anión superóxido (**figura 14**). La última reacción da lugar a la formación del anión  $\bullet\text{ONOO}^-$ , el cual es una molécula extremadamente reactiva con potentes propiedades antioxidantes (Beckman, 1990). El anión  $\bullet\text{ONOO}^-$  se descompone en el radical hidroxilo y en dióxido de nitrógeno (**figura 14**), los cuales son potentes activadores de la peroxidación lipídica (Beckman, 1990).

Existen numerosas evidencias clínicas y experimentales que han demostrado la participación del NO en la degeneración selectiva de las neuronas dopaminérgicas en EP (Kavya *et al.*, 2006), además se han observado altos niveles de expresión de las diferentes isoformas de la SON en la región nigroestriatal y en los GB de cerebros *postmortem* con EP (Hunot *et al.*, 1996). Por otro lado, se ha evidenciado que algunos pacientes presentan una sobreproducción de  $\text{ON}^-$  cerebral mediada por un incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  que activa al receptor de tipo N-metil-D-aspartato (NMDA). El  $\text{ON}^-$  participa en la citotoxicidad mediada por macrófagos y neutrófilos en la SNpc (Hunot, 1996). El  $\text{ONOO}^-$  es considerado un factor causante del daño neuronal dopaminérgico en la EP, además de que es capaz de reaccionar con los metales de transición de las metaloproteínas en los centros de Fe-azufre de un considerable número de enzimas. La estabilidad inusual del  $\text{ONOO}^-$  contribuye a su toxicidad, ya que le permite difundir lejos de su sitio de formación y producir también la oxidación de macromoléculas celulares. Un índice de formación de  $\text{ONOO}^-$  son los residuos

de tirosina libre y proteínas que el agente es capaz de nitrar (Rubio-Osornio, 2009). Por todo lo anterior, alteraciones en el estado del  $\bullet\text{ON}$  se relacionan con la EP y constituyen un indicador importante de daño oxidante y nitrérgico en pacientes que cursan con este síndrome.



**Figura 14.** Diagrama de la interacción de eventos bioquímicos del ON y el hierro en la expresión de la neurotoxicidad en la EP (modificada a partir de *Gerlach, 1994*).

#### 4.8 MODELO EXPERIMENTAL DE LA EP.

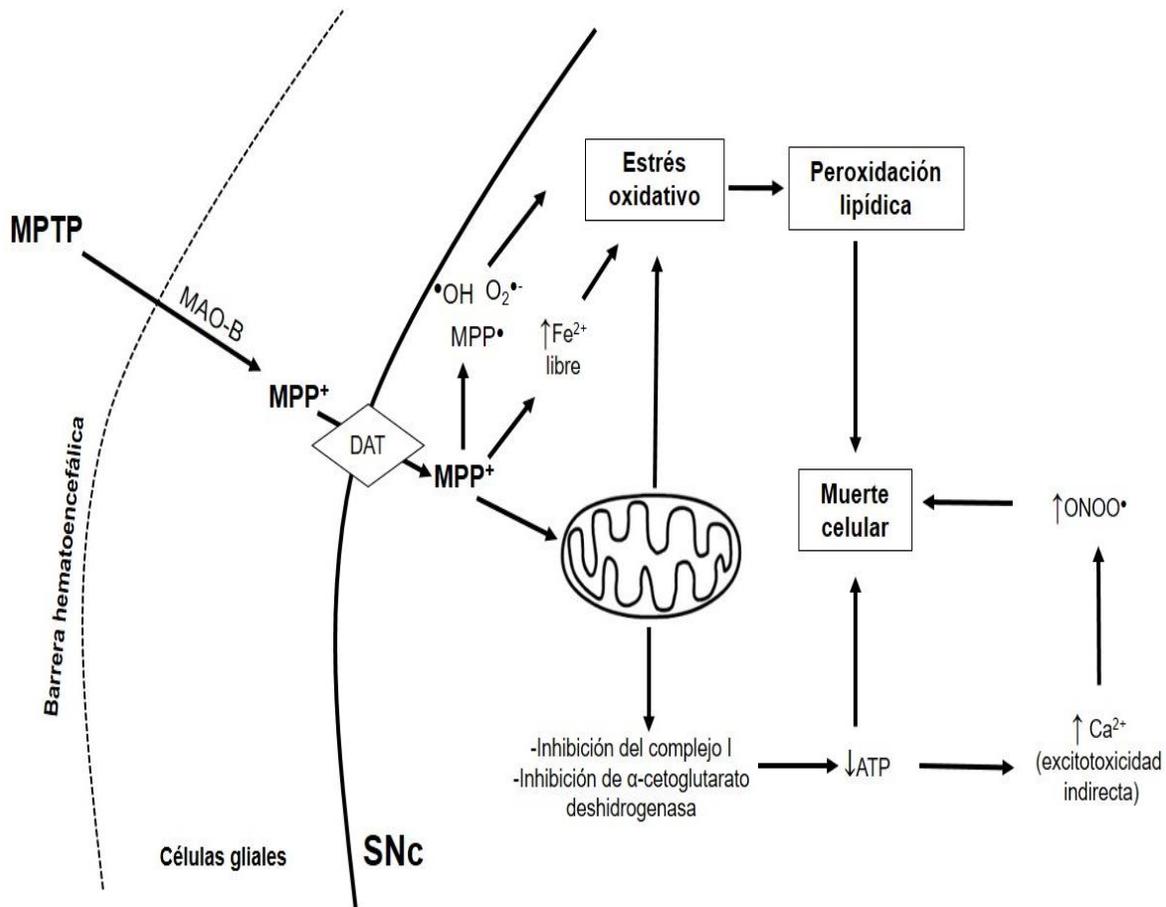
Como ya se menciona, los síntomas motores de la EP son atribuidos principalmente, a una profunda reducción de DA en el estriado debido a la drástica pérdida de neuronas dopaminérgicas en la SNc (Fahn y Przedborski, 2000). Hasta el momento, tanto la causa como los mecanismos de degeneración neuronal que subyacen la EP siguen siendo desconocidos. Sin embargo, la contribución más valiosa a la clarificación de los mecanismos celulares y moleculares en la SNc ocurridos en la EP ha sido proporcionada por modelos experimentales en animales, particularmente los aplicados a roedores y primates no humanos, a base de diferentes compuestos neurotóxicos que imitan la degeneración neuronal característica de la EP, tales como, reserpina, metafetaminas, 6-hidroxdopamina (6-OHDA), 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) y su metabolito MPP<sup>+</sup> (1-metil-4-fenilpiridina). Con este fin, el MPTP, así como su metabolito MPP<sup>+</sup>, ha surgido sin duda como una herramienta útil para inducir un modelo de la EP en una variedad

de especies animales, como monos, roedores, gatos y cerdos (Kopin y Markey, 1988). La sensibilidad a el MPTP y por consiguiente su capacidad para inducir parkinsonismo sigue de cerca el árbol filogenético donde las especies más estrechamente relacionadas a los humanos son las más vulnerables a esta neurotoxina.

**4.8.1 Modelo experimental por MPTP/MPP<sup>+</sup>.** El estudio de los cambios en la actividad del circuito motor en la EP ha sido ampliamente facilitado por la disponibilidad del modelo de la enfermedad por MPTP en primates (DeLong, 2007). La molécula MPTP es un subproducto de la síntesis química de un análogo de la meperidina. El reconocimiento del MPTP como neurotoxina sucedió en e1979, cuando una población de jóvenes californianos adictos a un nuevo derivado sintético de fentanilo desarrolló un parkinsonismo irreversible sensible a L-dopa (Davis, 1979). El análisis de esta droga sintética mostro que contenía alrededor de 3% de MPTP (Langston, 1983). Adicionalmente, investigaciones post-mortem confirmaron que causaba daño de la SN (Davis, 1979). Posteriormente se comprobó que la administración de esta neurotoxina a animales de laboratorio como ratas, ratones, perros, gatos, monos y primates no humano causa daño en la vía dopaminérgica nigroestriatal (Agid, 1987). Además, de que en humanos y primates no humanos, el MPTP es capaz de producir un síndrome parkinsoniano severo e irreversible que replica las características conductuales, cognitivas, bioquímicas e histológicas de la EP (Tetrud, 1986). Algunos estudios en roedores han demostrado que los ratones, especialmente los de la cepa C57/Black son los más susceptibles al efecto neurotóxico del MPTP y en los que mejor se reproducen las principales características bioquímicas de la EP (Heikkila, 1984).

Cuando el MPTP es administrado en animales, atraviesa rápidamente la barrera hematoencefálica, en el cerebro es metabolizado a 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridina (MPDP<sup>+</sup>) por acción de la enzima MAO-B de las células gliales (**figura 15**), y posteriormente es oxidado al metabolito activo MPP<sup>+</sup> (Chiba, 1984). El MPP<sup>+</sup> es acumulado dentro de las células dopaminérgicas después de ser recapturado por los sitios de recaptura de DA dependientes de energía (Chiba, 1985). Además de esta recaptura, la acumulación intracitoplasmática del MPP<sup>+</sup> también depende de dos sistemas de captura intracelular: 1) la neuromelina forma un complejo con el MPP<sup>+</sup> y retrasa su liberación citoplasmática (D'Amato, 1986) y 2) los transportadores de monoaminas vesicular (VMAT) confina la neurotoxina en vesícula sinápticas (Takahashi, 1997). El MPP<sup>+</sup> citosolico libre, finalmente entra a la mitocondria por un mecanismo dependiente de energía (Ramsay y Singer, 1986)

inhibiendo la actividad de este organelo y llevando a una caída en los niveles de ATP celular con la subsecuente muerte celular.



**Figura 15. Mecanismo hipotético de la toxicidad del MPTP/MPP<sup>+</sup>.** El MPTP atraviesa fácilmente la BHE debido a su fuerte naturaleza hidrofóbica. Una vez dentro del cerebro, el MPTP es oxidado a su metabolito activo MPP<sup>+</sup>, por acción de la enzima MAO-B en las células gliales. El MPP<sup>+</sup> entra a la neurona dopaminérgica por recaptura selectiva del DAT y es acumulado dentro de la mitocondria. A nivel mitocondrial, el MPP<sup>+</sup> bloquea la respiración mitocondrial por inhibición del complejo I (NADH: ubiquinona oxidoreductasa) de la CTEM. La inhibición mitocondrial provoca una disminución de ATP responsable de una excitotoxicidad secundaria que induce un fuerte aumento en los niveles de calcio citoplasmático. El estrés oxidativo generado directamente por el MPP<sup>+</sup> y por la subsecuente inhibición mitocondrial conlleva a la peroxidación lipídica y muerte celular.

**4.8.2 Defectos mitocondriales y estrés oxidativo por MPP<sup>+</sup>.** El efecto neurotóxico del MPP<sup>+</sup> es su capacidad de inhibición del complejo I, acompañado no únicamente con la posterior inhibición de oxidación de sustratos ligados a NAD<sup>+</sup>, sino también de la inhibición de la α-cetoglutarato deshidrogenasa (Nicklas, 1985). La inhibición mitocondrial conlleva a una disminución en los niveles de ATP celular (Di Monte, 1986), pérdida del potencial de membrana mitocondrial, alteraciones en la homeostasis del calcio y formación de radicales libres. De acuerdo con esta generación de radicales libres, se demostró que el MPP<sup>+</sup> induce

una disminución en el contenido de GSH y metalotioneína (Desole, 1993), además de un incremento en la formación de 3-nitrotirosina (producto de la nitración de tirosina) (Pennathur, 1999). Por el contrario, la toxicidad del MPP<sup>+</sup> fue potenciada por la disminución del contenido de GSH (Wüllner, 1996) y atenuada por antioxidantes que contenían SH (Oishi, 1993).

Varios factores contribuyen a la generación de ERO inducida por MPP<sup>+</sup>. Se sugiere que el hierro puede ser de gran importancia en la toxicidad por MPP<sup>+</sup> y provocar una reacción de Fenton en las células dopaminérgicas. Ya que se ha demostrado que el MPP<sup>+</sup> incrementa los niveles de hierro libre en la SNc (Mochizuki, 1994b). Además, el MPP<sup>+</sup>, el cual es un sustrato para xantina oxidasa, puede conducir a la formación del radical MPP<sup>•</sup> (Adams, 1993). La formación de ERO también puede depender de la excitotoxicidad indirecta resultante del deterioro neuronal del metabolismo energético y el subsecuente aumento del calcio citoplasmático (Storey, 1992). Ya que antagonistas del receptor de tipo NMDA (Turski, 1991) y bloqueadores de canales de calcio (Kupsch, 1995) mostraron gran protección en la SNc contra el daño inducido por MPP<sup>+</sup>. Además, ha sido sugerida por varios estudios la participación de la activación de la SON dependiente de calcio que lleva a la formación de una especie altamente reactiva, el peroxinitrito ONOO<sup>-</sup> (Schulz, 1995). Los procesos inflamatorios también pueden contribuir a las ERO generadas por MPP<sup>+</sup> por la microglia reactiva (Kurkowska-Jastrzebska, 1999). En conjunto, todos estos datos explican el incremento en los niveles de malondialdehído y de la Peroxidación lipídica inducida por MPP<sup>+</sup> (Rios y Tapia, 1987).

En este apartado se presentaron algunas evidencias del modelo experimental por MPP<sup>+</sup> que reproduce las principales modificaciones que ocurren en la EP. El MPP<sup>+</sup> es capaz de inducir dos de los principales defectos bioquímicos de la EP, el estrés oxidativo y la inhibición mitocondrial, así como algunas lesiones histológicas. Aunque otros aspectos de la EP en humanos no pueden ser reproducidos (Hantraye, 1998), como la lesión anatómica precisa, el transcurso del tiempo de la enfermedad, la existencia de los mecanismos de compensación de largo período (los cuales podrían influir en la velocidad de la degeneración y en los mecanismos moleculares asociados), entre otros. Sin embargo, estos modelos ayudan a aportar nuevas ideas e hipótesis para los eventos moleculares que ocurren en la EP. Aunque no está muy claro, existen datos convincentes entre los resultados obtenidos de pacientes con EP y los modelos experimentales en animales. Por lo

tanto, las interacciones continuas entre los modelos experimentales y la neuropatología humana, podrían indudablemente ayudar a determinar precisamente los factores cruciales de la muerte celular nigral y crear nuevas estrategias neuroprotectoras específicas.

#### 4.9 TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO DE LA EP.

El principal tratamiento farmacológico de la EP se ha centrado en recuperar los niveles de DA a nivel cerebral y se basa en el uso del precursor de la DA, L-DOPA ó bien agonistas dopaminérgicos. La L-DOPA es el fármaco de elección en cuanto a la sintomatología y reduce en más del 50% los síntomas al principio de la enfermedad. Desde 1961 hasta la actualidad, el fármaco L-Dihidroxifenilalanina (L-Dopa) se ha utilizado en la terapia de la EP reemplazando la depleción de DA, así como L-Dopa, el precursor de DA, se utilizan fármacos que aumentan la actividad de este neurotransmisor al estimular a los receptores dopaminérgicos (ropinirol, pramipexol, bromocriptina) siendo altamente eficaces en reducir los síntomas motores de la enfermedad (**figura 16**) (Oertel, 2017). Otros medicamentos actúan inhibiendo las enzimas que metabolizan la DA como la catecol-O-metiltransferasa (COMT) (entacapona) y la monoamina oxidasa tipo B (MAO-B) (selegilina y rasagilina) (**figura 16**). Otro grupo importante de fármacos que se utilizan como tratamiento de inicio en la EP son los anticolinérgicos, los cuales promueven incremento en el nivel de DA por medio de la activación de receptores muscarínicos en el cerebro (Toulouse y Sullivan, 2008).

**4.9.1 Levodopa (L-Dopa).** La L-DOPA se descarboxila por acción de la enzima L-aminoácido aromático descarboxilasa (AAD) a nivel cerebral produciendo DA. El uso de la combinación de carbidopa/levodopa desde hace ya 40 años aumentó significativamente la supervivencia de los pacientes con EP. La carbidopa/levodopa es benéfica durante las primeras etapas del padecimiento y con efecto persistente a largo plazo. La recuperación en la movilidad y la actividad física constante tienen una influencia positiva en la integridad del Sistema Nervioso Central y la neuroplasticidad (Ahlskog,2001). Sin embargo, el 50% de los pacientes que se les administra L-Dopa desarrollan complicaciones dentro de los primeros 5 años del tratamiento (Ahlskog, 2001), ya que inicialmente se describieron efectos antiparkinsonianos destacables con su administración prolongada. Después de este tiempo se presenta una pérdida progresiva en la eficacia del fármaco (“wearinf-off”) seguido de una fase en la se observan períodos alternantes de respuesta adecuada y de falta de la

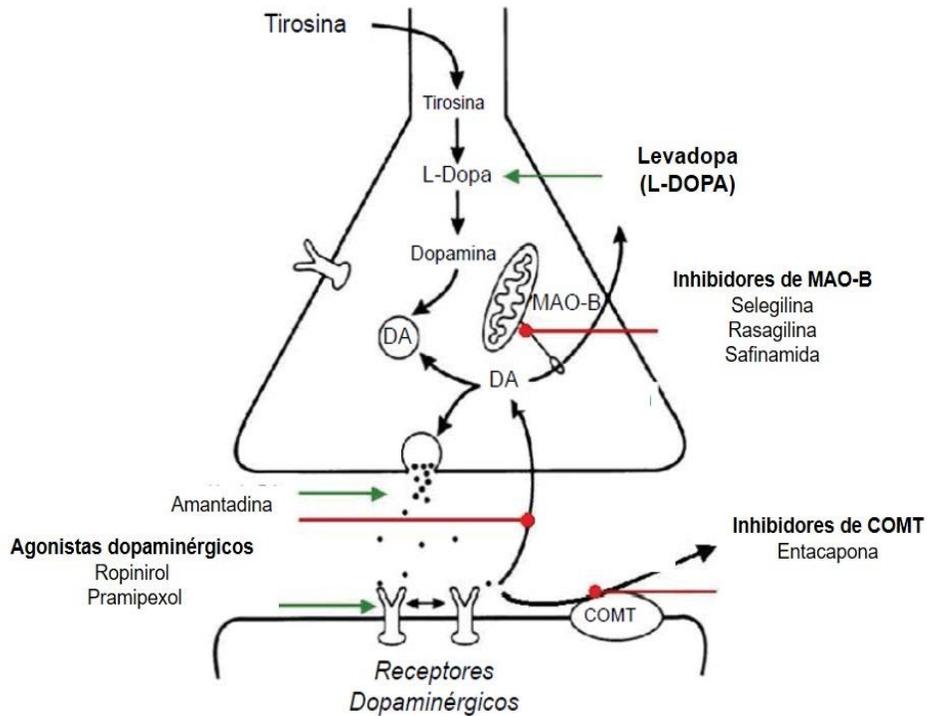
respuesta a L-Dopa (períodos “on-off”); también tras el tratamiento crónico de este fármaco se presenta discinesia tardía en un 60% de los pacientes (Ahlskog, 2001).

**4.9.2 Agonistas dopaminérgicos.** La Academia Americana de Neurología estableció que los agonistas dopaminérgicos (ropinirol y pramipexol) pueden utilizarse como alternativa en el tratamiento inicial o como tratamiento adicional a la L-Dopa para disminuir las complicaciones motoras a largo plazo (Miyasaki, 2002). Todos los agonistas dopaminérgicos utilizados para el control de la sintomatología motora del paciente con EP actúan sobre los receptores dopaminérgicos tipo 2 ( $D_2$ ), cuya concentración es alta en el cuerpo estriado, aunque varía su afinidad. Los agonistas dopaminérgicos pueden ser productos derivados o no del cornezuelo de centeno (ergot). Los derivados son: pergolida, apomorfina y bromocriptina, y los no derivados (no ergolinas) más utilizados en la actualidad son: ropinirol y pramipexol (Leentjens, 2011). Aunque el control de los síntomas es mejor con L-Dopa, los agonistas dopaminérgicos disminuyen el riesgo de desarrollar discinesia, distonía y fluctuaciones en la actividad motora. Sin embargo, se asocian a una serie de efectos secundarios como edema, somnolencia, estreñimiento, mareo, alucinaciones y náusea, que ocasionan el abandono del tratamiento con mayor frecuencia (Hitzema, 2009).

**4.9.3 Inhibidores de la MAO.** Los inhibidores de la MAO-B, como la selegilina, la rasagilina y la safinamida, se utilizan para aumentar la concentración de DA en la sinapsis al impedir la acción de la enzima MAO. La selegilina y la rasagilina pueden utilizarse desde el inicio del tratamiento, aunque se recomiendan para etapas más avanzadas y en los casos en que el tratamiento con L-Dopa dé lugar a fluctuaciones importantes. Cuando se ha utilizado la selegilina como tratamiento inicial de los pacientes con la EP, ha tenido que adicionarse L-Dopa después de tres o cuatro años (Jain, 2012).

**4.9.4 Inhibidores de la COMT.** La combinación de carbidopa/levodopa con la entacapona, inhibidor de la enzima catecol-O-metiltransferasa (COMT) encargada del metabolismo de las catecolaminas en la hendidura sináptica, se ha utilizado como tratamiento de inicio; sin embargo, su efecto puede no ser mayor que el de la carbidopa/levodopa sola (Stocchi, 2010). Esta combinación está indicada cuando existen fluctuaciones motoras debido al efecto on/off de la L-Dopa. Sin embargo, el beneficio sobre ellas y sobre la discinesia puede no ser suficiente, y en cambio pueden presentarse mayores efectos secundarios, incluidas náuseas y diarrea (Jain, 2012). Existe alguna evidencia de que el uso de este inhibidor de

la COMT puede aumentar el riesgo de problemas cardiovasculares y cáncer de próstata (Jain, 2012).

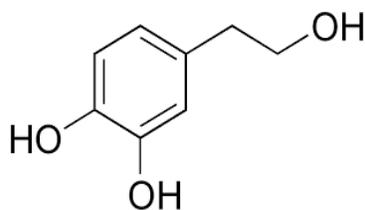


**Figura 16.** Mecanismo de acción de los fármacos utilizados en la clínica de la EP.

Hasta este momento no existe algún tratamiento farmacológico que sea capaz de revertir o detener el progreso de la enfermedad, ya que la mayoría de los fármacos utilizados en la terapia de la EP son eficaces en aliviar los síntomas motores de este síndrome, sugiriéndonos claramente la necesidad de nuevas terapias en el tratamiento farmacológico de la EP incluyendo los fitomedicamentos.

#### 4.10 HIDROXITIRO SOL (HT).

El hidroxitirosol (2-(3,4-dihidroxifenil)etanol) (**figura 17**) es un compuesto natural fenólico que presenta una elevada actividad antioxidante, y existen diversas evidencias científicas que han demostrado que posee propiedades biológicas que sugieren que podría tener efectos beneficiosos en enfermedades neurodegenerativas.



**Figura 17.** Estructura química del hidroxitirosol.

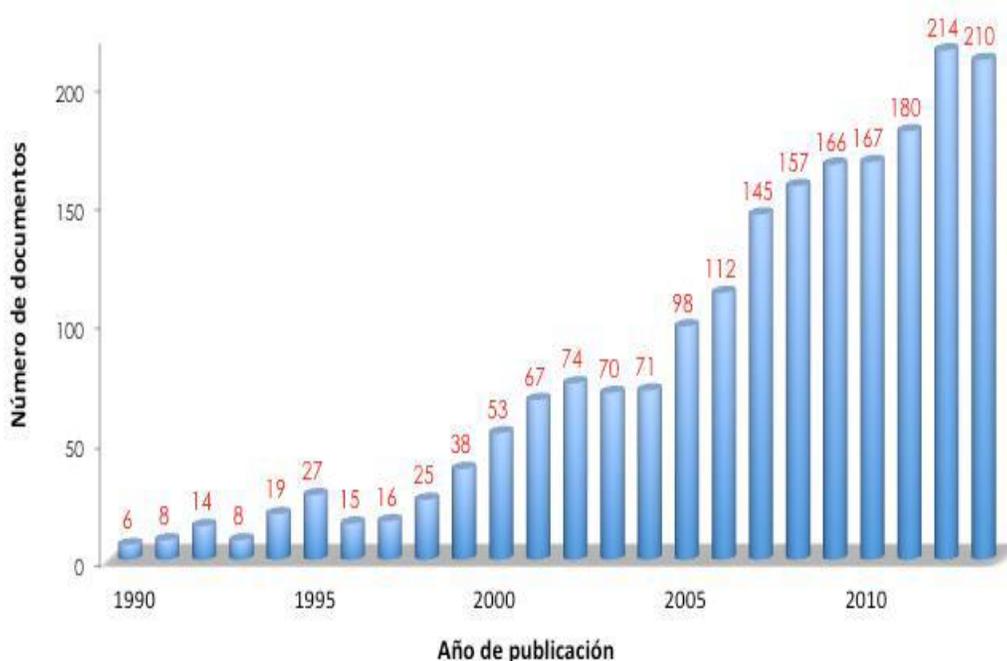
Un compuesto fenólico o polifenol es una sustancia que posee un anillo de benceno con uno o más grupos hidroxilo y que puede presentar otros grupos funcionales (Harbone, 1989). Estos compuestos están universalmente presentes en los sistemas biológicos, principalmente en el reino vegetal, como en los frutos, hojas, flores y otros órganos vegetales. En la fig. 18 se muestra una clasificación de los distintos tipos de polifenoles.

Tipo	Subtipo	Ejemplos	
Flavonoides	Antocianinas	Cianidina, luteolinidina	
	Flavonoles	Kaempferol, quercetina	
	Flavonas	Apigenina, luteolina	
	Flavanonas	Naringenina	
	Isoflavonoides	Isoflavonas	
		Isoflavanos	
	Flavanoles	Monómeros	Catequina, epicatequina, epigallocatequina
Oligómeros y polímeros		Taninos	
No flavonoides	Ácidos fenólicos	Derivados ác. cinámico	Ác. <i>p</i> -cumárico, ác. cafeico, ác. ferúlico
		Derivados ác. benzoico	Ác. gálico, ác. protocatecuico, ác. vanílico, DOPAC
	Alcoholes fenólicos	Hidroxitirosol	
	Lignanós	Pinorresinol, 1-acetoxipinorresinol	
	Estilbenos	Resveratrol	

**Figura 18.** Clasificación simplificada de los distintos tipos de polifenoles (Ebrahimi, 2012; Haminiuk, 2012)

El HT se encuentra principalmente en el fruto del olivo (Ryan y Robards, 1989), se obtiene en el transcurso de la maduración del fruto y durante el proceso de elaboración de las aceitunas de mesa, por la hidrólisis de la oleuropeina. Además de esta fuente de HT, cabe destacar, que este compuesto fenólico, también es un metabolito que es producto de la hidrólisis del verbascósido, un fenilpropanoide, que es el principal componente del extracto metanólico (23%) de la planta *Buddleja cordata* (Pérez-Barrón, 2015).

El HT es una molécula hidrosoluble ( $\log P = 0.09$ ) y el gran interés por el HT es debido a su amplio espectro de actividades biológicas, pero la actividad que centro toda la atención es su capacidad antioxidante, existiendo ya en la actualidad más de dos mil publicaciones (artículos científicos y patentes) relacionadas con el HT a lo largo de los últimos 25 años (figura 19).



**Figura 19.** Evolución de los documentos relacionados con HT publicados a lo largo de los últimos años (Fuente: *Scifinder*, fecha de acceso: 16/06/2014).

Además de la potente actividad antioxidante del HT, también se le han atribuido múltiples actividades biológicas, tales como, antiinflamatorio (Richard, 2011), anticancerígeno (Luo, 2013), antidiabético (Cao, 2014) y actividades cardioprotectoras (Granados-Principal, 2014).

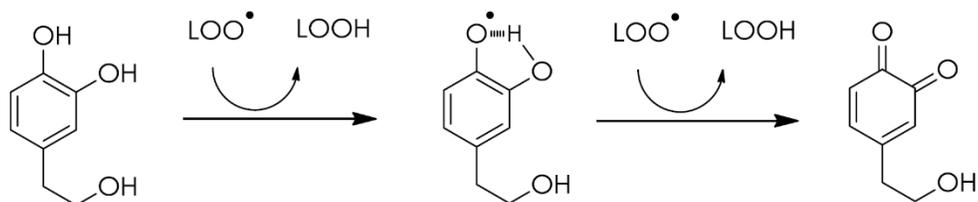
**4.10.1 Actividad Antioxidante del HT.** Una de las propiedades más descritas para el HT es su elevada actividad antioxidante demostrada en diversos estudios. El HT muestra muchas características antioxidantes, tales como, un potente atrapador de radicales libres, como, el radical  $O_2^-$  (Dela Puerta, 1999), el radical  $OH^\bullet$  (Owen, 2000) y  $ONOO^-$  (Deiana, 1999; De la Puerta, 2001), rompe reacciones en cadena peroxidativas, previene la peroxidación lípida (Visioli, 1995), e inhibe los radicales derivados del ácido hipocloroso

(Bernini, 2012). Al parecer, la estructura orto-difenólica del HT es fundamental para que pueda ejercer su actividad antioxidante (De la Cruz, 2015; Rodríguez-Gutiérrez, 2012; Visioli, 1998). Además, se ha descrito que debido a la estructura del anillo catecol, el HT también puede actuar como quelante de metales (Ryan y Robards, 1998; Aeschbach, 1994).

Los efectos beneficiosos atribuibles a los polifenoles se deben, entre otras cosas, a su efecto antioxidante, al neutralizar las especies reactivas de oxígeno protegiendo al organismo del daño oxidativo (Hollman, 2011). La capacidad antioxidante es una de las propiedades más destacables del HT y se relaciona directamente con la presencia de los grupos hidroxilos fenólicos (Rice-Evans, 1996; Cao, 1997, Bernini, 2012). Así, la estructura ortodifenólica o catecólica del HT caracteriza su potencial antioxidante.

En ese sentido, la unidad *orto*-catecólica (1,2-bencenodiol u *ortodihidroxifenol*) ha sido objeto de numerosas investigaciones que tratan de relacionar la actividad antioxidante y su estructura química, a fin de dilucidar el posible mecanismo de acción antioxidante (Povie, 2010). Esta actividad antioxidante se debe a la presencia del grupo *o*-dihidroxifenilo, que actúa interrumpiendo la etapa de propagación de los radicales alquilperoxilo formados durante la oxidación lípidica, mediante la donación de dos radicales hidrógeno para dar lugar a un derivado quinonoide.

En la **figura 20** se representa el mecanismo para el HT, donde se produce la formación de un radical muy estable por la presencia de un enlace de hidrógeno intramolecular entre el hidrógeno libre del grupo hidroxilo y el radical fenoxilo (Visioli y Galli, 1998). La estabilización del radical intermedio sobre el HT debido a la presencia de un grupo hidroxilo fenólico, evita que este radical inicie o propague la reacción radicalaria. Así, se demuestra que la presencia del grupo catecol es crucial en la reactividad fenólica al actuar como donador de átomos de hidrógeno en los procesos de formación de radicales en cadena (Bernini, 2012).



**Figura 20.** Mecanismo antioxidante del HTy por donación de hidrógeno

Esta actividad captadora de radicales libres y protección frente a la oxidación, también se ha demostrado para macromoléculas como el ADN (Deiana, 1999). Incluso a concentraciones que pueden considerarse fisiológicas (10  $\mu\text{M}$ ) el HT fue capaz de inhibir en un 23% los daños ocasionados por el radical  $\text{H}_2\text{O}_2$  en el ADN de células prostáticas (Quiles, 2002).

Por otro lado, existe evidencias de que el HT ejerce una protección indirecta en el organismo a través del incremento de sistemas antioxidantes endógenos, como las enzimas GPx, GR, GST, SOD y catalasa (Jemai, 2008; Martín, 2009), además de que se demostró que el HT modula importantes proteínas de señalización (Nrf2) involucradas en la inducción de estas enzimas citoprotectoras (Martín, 2009).

**4.10.2 Actividad neuroprotectora del HT.** Actualmente han proliferado hallazgos sobre los beneficios del HT para prevenir las enfermedades neurodegenerativas. Existen estudios realizados con ratas, donde se ha demostrado que el HT es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE), evaluado en muestras de dializado mediante cromatografía líquida con detector de fluorescencia (Wu, 2009) y con detector electroquímico (Gallardo, 2014) en ratas anestesiadas. Debido a su capacidad de penetrar en el cerebro se ha demostrado el efecto neuroprotector del HT en sistema nervioso central y periférico (Gonzalez-Correa, 2008; Ristagno, 2012). Por ejemplo, estudios en animales han mostrado la eficacia de un extracto rico en HT para reducir la citotoxicidad inducida por el óxido nítrico (NO) en las células de cerebro de ratón (Schaffer, 2007). También, resultados *in vitro* e *in vivo* han identificado que las mitocondrias se encuentran entre las dianas de prevención del HT en el cerebro (Hu y cols., 2014). Adicionalmente, se mostró el efecto citoprotector del HT en células dopaminérgicas PC12 contra el daño celular causado por  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Hashimoto, 2004) y contra la citotoxicidad inducida con  $\text{Fe}^{2+}$  y nitroprusiato de sodio (donador de ON) (Schaffer, 2007; Schaffer, 2010). También, se ha mostrado el posible efecto neuroprotector del HT y de su derivado acetato de HT, en un modelo de hipoxia-reoxigenación en cerebro

de rata, tanto *in vitro* como *in vivo*. Los resultados indicaron la capacidad de estos compuestos para inhibir de manera dosis dependiente el flujo de lactato deshidrogenasa (un marcador de muerte celular, LDH), proporcionando una base inicial para el estudio del HT como un potencial compuesto neuroprotector (González-Correa, 2008a, Guerrero, 2012; Muñoz-Marín, 2012).

Por otro lado, es importante mencionar que Geelings *et al.* en 2003 señalaron en una patente que el HT es un potente inhibidor de la enzima MAO-B, ya que realizó un ensayo utilizando mitocondria purificada proveniente de tejido cerebral de rata, encontrando una IC50 de  $16.3 \pm 1.3 \mu\text{M}$ . Y como ya se había mencionado en este escrito existen reportes donde se demostró que la actividad de la enzima MAO-B se encuentra incrementada en personas de edad avanzada (Mann, 1984) y en pacientes con EP (Riederer, 1983); además, de que entre los fármacos que han recibido mayor atención en relación a su potente efecto neuroprotector en la EP, destacan los inhibidores de la MAO-B.

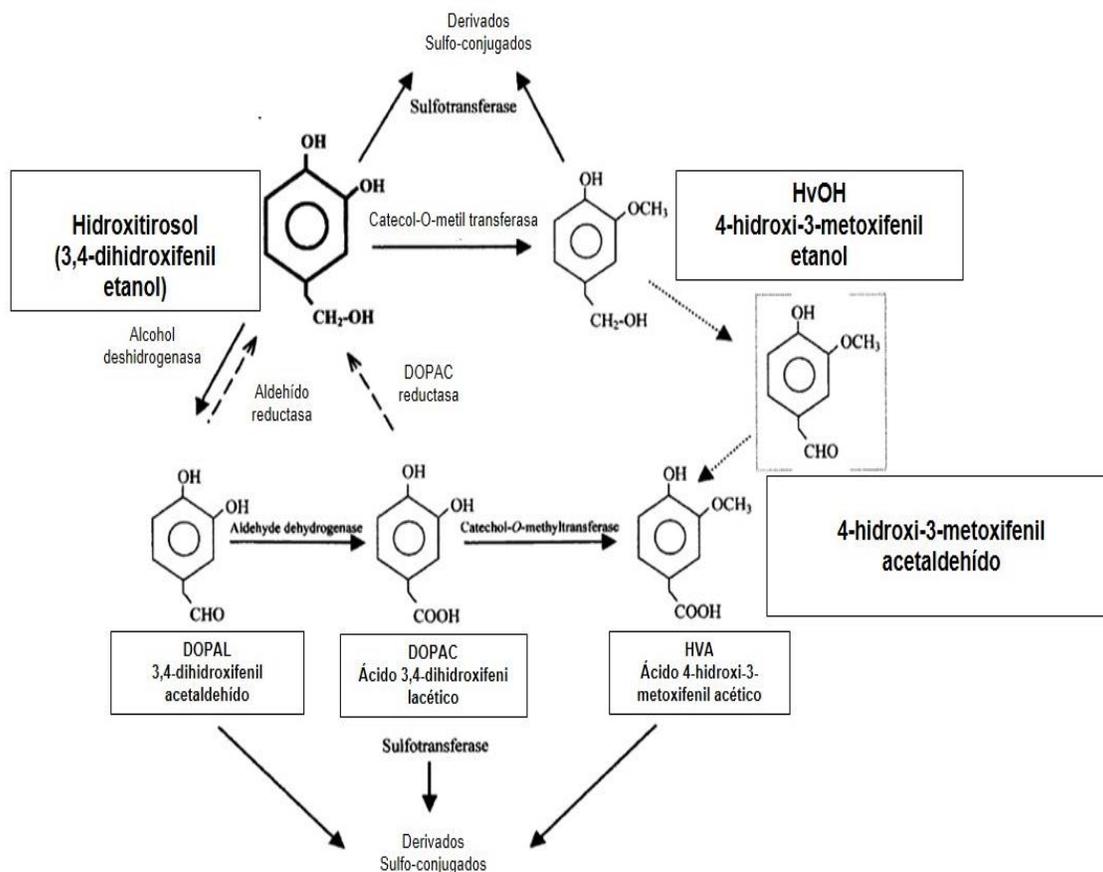
**4.10.3 Estudios de toxicidad de HT en animales.** El primer ensayo de toxicidad aguda con HT en animales de experimentación demostró que una única dosis de 2 g/Kg de peso corporal no produjo ningún efecto tóxico, adverso o alteración macroscópica de órganos internos (D'Angelo, 2001). Otro estudio de toxicidad más completo que se publicó en el 2004, para un producto de un hidrolizado del extracto acuoso de la pulpa de la aceituna (HIDROX®), que es comercializado por la empresa estadounidense Creagri, este producto contiene 24 mg/g de HT. Y tanto los ensayos de toxicidad aguda como los ensayos de toxicidad crónica a 90 días confirmaron la ausencia de efectos tóxicos a dosis de 2000 mg/Kg/día, así como la ausencia de efectos teratogénicos y mutagénicos (Christian, 2004). Por lo que este producto ha sido reconocido oficialmente por la FDA americana (Food and Drug Administration) como seguro para su uso alimentario en humanos, adquiriendo el estatus GRAS (generally regarded as safe).

**4.10.4 Estudios de absorción y metabolismo del HT.** En 1998, Chen Bai *et al.* estudió por primera vez la concentración plasmática de HT tras la ingesta oral de este compuesto en ratas. La máxima concentración plasmática se alcanzó en tan solo 5-10 minutos de la ingesta seguido de una rápida disminución de los niveles plasmáticos, de forma que a las tres horas de su administración apenas se detectó en plasma. En otro estudio, se calculó la biodisponibilidad oral en ratas a partir de la excreción urinaria de HT marcado con tritio,

donde se obtuvo una absorción del 75 y del 90% cuando se administró en solución acuosa y oleosa, respectivamente (Tuck, 2001). Los lugares de absorción descritos para el HT son el intestino delgado y el colon (Visser, 2002) y se ha sugerido que el transporte a través del epitelio intestinal puede tener lugar por difusión pasiva y de forma bidireccional (Manna, 2000).

D'Angelo et al, (2001) estudiaron la distribución tisular del HT marcado con  $^{14}\text{C}$  administrado por vía intravenosa en ratas. A los 5 minutos de la inyección, menos del 8% de la radiactividad estaba todavía presente en la sangre (6% en plasma y 1.9% en la fracción celular de la sangre) por lo que se estimó que el tiempo de vida media del HT en sangre es muy corto, de 1 o 2 minutos. Niveles de radiactividad similares procedentes del  $^{14}\text{C}$  fueron encontrados en el músculo esquelético, hígado, pulmones y corazón, mientras que el riñón acumuló 10 veces más radiactividad que los otros órganos. Es importante destacar, que también se detectó  $^{14}\text{C}$  en el cerebro lo que indicó que el HT fue capaz de atravesar la barrera hematoencefálica. Cinco horas después de la inyección intravenosa de HT, solo el 0.1% de la radiactividad administrada estaba presente en los animales. Los metabolitos del HT se detectaron en sangre 5 minutos después de su administración intravenosa, indicando que el HT se metaboliza rápidamente en los tejidos, especialmente en el hígado y el enterocito. Se han propuesto tres vías metabólicas para el HT (**figura 21**):

- 1) Oxidación: a través de las enzimas alcohol-deshidrogenasa y aldehído-deshidrogenasa dando lugar al ácido dihidroxi-fenilacético (DHPA).
- 2) Metilación: a través de la enzima COMT dando lugar a el alcohol homovanílico (HvOH).
- 3) Metilación + Oxidación: para formar el ácido homovanílico (HVAc).



**Figura 21.** Vías del metabolismo de la administración exógena del HT en ratas (Imagen adaptada de D'Angelo, 2001).

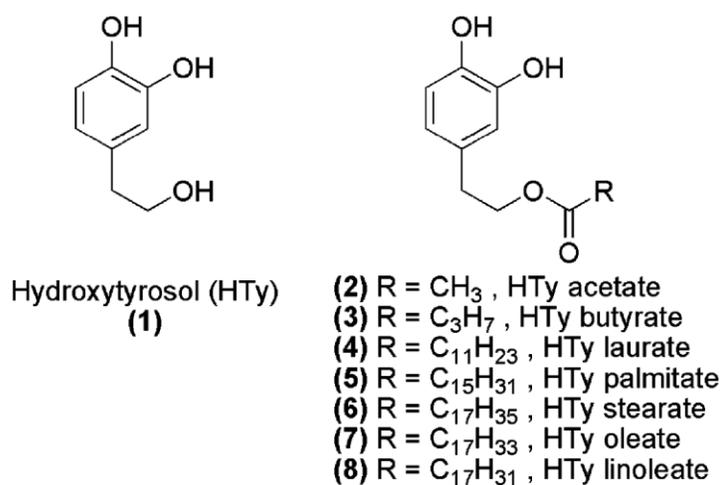
Tanto el HT como cualquiera de sus metabolitos, se conjugaron con sulfato (D'Angelo, 2001) o con ácido glucurónico (Tuck, 2002) originando un elevado número de metabolitos que pudieron detectarse en plasma o en orina. Respecto a la excreción se encontró que el 90% de la radiactividad fue detectada en orina 5 horas después de la inyección intravenosa de  $^{14}\text{C}$ -HT y una pequeña proporción se excretaba por heces (D'Angelo, 2001).

#### 4.11 DERIVADOS ÉSTERES DE HT.

Debido a la limitada solubilidad del HT en medios lipídicos, en los últimos años se ha investigado con intensidad el aislamiento y síntesis de compuestos que conserven la actividad antioxidante del HT pero que posean un mayor carácter lipófilo, de modo que puedan atravesar más fácilmente membranas lipídicas y puedan así aprovecharse a nivel clínico. Por esta razón, actualmente, se han sintetizado diferentes derivados de HT con el fin de modular su balance hidrófilo/lipófilo para así aumentar su biodisponibilidad en el

organismo. Entre estos derivados cabe destacar los derivados ésteres de HT (Geelings, 2003; Alcudia, 2004; Torres, 2005; Trujillo, 2006; Grasso, 2007). La introducción en la cadena lateral de un acilo de diferente longitud genera moléculas más lipófilas sin que por ello se altere la actividad antioxidante inherente al fragmento de catecol. Estos derivados han mostrado actividades similares o incluso mejoradas (Trujillo, 2006; Lorenz, 2006; Pereira-Caro, 2009) respecto al propio HT libre, siendo, en la mayoría de los casos, más liposolubles.

El HT y sus derivados secoiridoides (**Figura 22**) han demostrado que retrasan la oxidación de las LDL (Visioli, 1998; Visioli, 2002). Otras propiedades biológicas de estos derivados incluyen, propiedades antimicrobianas (Bisignano, 1999; Furneri 2004), hipotensivas, hipoglucemiantes y antigregación plaquetaria (Vissoli, 1995) y actividades antiinflamatorias (Beauchamp, 2005), inhibición de algunas lipoxigenasas (Kohyama, 1997; De La Puerta, 1999) e inductores de apoptosis.



**Figura 22.** Estructura del HT y de sus derivados ésteres (Imagen tomada de Trujillo, 2006).

La actividad antioxidante del HT y sus derivados ésteres ya ha sido bien establecida (Baldioli, 1996; Gordon, 2001; Mateos, 2003). Las actividades antioxidantes del acetato, palmato, oleato y linolato de HT fueron comparadas con las del HT,  $\alpha$ -tocoferol y butilhidroxitolueno (BHT) en matrices glicerídicas y sistemas biológicos. Las relaciones entre las concentraciones antioxidantes presentadas por el HT y el acetato, palmitato, oleato y linolato de HT fueron similares (Trujillo, 2006). El HT y sus derivados ésteres mostraron mayor actividad antioxidante que  $\alpha$ -tocoferol y que BHT. También se demostró el efecto protector de los derivados ésteres contra la oxidación de lípidos y proteínas

causada por radicales peroxilos en homogenados cerebrales en un modelo ex vivo (Trujillo, 2006). La inclusión de una cadena lipofílica en la molécula de HT mejoró sus capacidades antioxidantes en estos sistemas biológicos (Trujillo, 2006).

Como ya se ha mencionado, el acetato de HT presenta una capacidad antioxidante similar a la del HT libre (Gordon, 2001; Mateos, 2003), y es más soluble en fases lipofílicas debido a la presencia del grupo ester. La síntesis del acetato de HT ya ha sido bien descrita (Gordon, 2001; Baraldi, 1983), pero los procedimientos son laboriosos y requieren especial manipulación en pasos esenciales de la reacción, y/o los rendimientos obtenidos son muy bajos. Por otro lado, se demostró el efecto neuroprotector del acetato de HT en un modelo de hipoxia-reoxigenación en células cerebrales de rata después de una administración oral (González-Correa, 2008).

Considerando que la esterificación de polifenoles incrementa su naturaleza hidrofóbica, es concebible que las cadenas alifáticas pueden ser usadas como una herramienta para alterar propiedades físicas, tales como la solubilidad, miscibilidad, y actividad de antioxidantes. En este sentido, los métodos de preparación de esteres de HT por reacción de HT con varios agentes acilantes han sido bien descritas. La esterificación con ácidos libres (Buisman, 1998) y transesterificación con esteres metil o etil (Alcudia, 2004) son reacciones quimioselectivas que obtienen los productos en buenos rendimientos.

Como se mencionó anteriormente, los esteres lipofílicos de HT muestran una alta capacidad de atrapador de radicales libres, previenen la oxidación de proteínas y la peroxidación lipídica en modelos celulares ex vivo (Trujillo, 2006). Estas propiedades los hacen potencialmente útiles en la formulación de medicamentos para proponer nuevas alternativas farmacológicas para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

#### **4.12 NITROHIDROXITIROSOLO (NO<sub>2</sub>HT).**

Diversas actividades biológicas se han descrito para el HT, tales como la capacidad de atrapar radicales libres (Goya, 2007), así como regular la actividad de enzimas antioxidantes (Martin, 2010). Estas propiedades lo hacen útil contra el estrés oxidativo, uno de los principales mecanismos de neurodegeneración que subyacen a la EP. Sin embargo, la elevada naturaleza polar del HT reduce su solubilidad en lípidos, por lo tanto, se ha

centrado el interés en la síntesis de derivados de HT con un mejor balance hidrofílico/lipofílico (Bernini, 2015). Dichos derivados esteres y éteres de HT han mostrado una mejor capacidad antioxidante en comparación con su precursor, el HT, sobre todo si las cadenas alifáticas son de 6-8 átomos de carbono (Madrona, 2009).

Actualmente existe gran interés en desarrollar nuevos fármacos con actividad protectora en el sistema nervioso central para el tratamiento de la EP. Durante años, en el tratamiento clínico de la EP, los nitrocatecoles han sido usados en combinación con levodopa (Gordin, 2004; Bonifacio, 2007), debido a que el anillo nitrocatecol parece desempeñar un papel importante en la inhibición de la enzima COMT. Además, se ha evidenciado que las especies reactivas de oxígeno están estrechamente relacionadas con el proceso de neurodegeneración, por lo tanto, si en adición, los nuevos compuestos presentan actividad antioxidante, su potencial terapéutico es mayor (Rodríguez-Morató, 2015).

Como ya se mencionó anteriormente, la COMT está implicada en el catabolismo de la propia DA, catalizando la transferencia de un grupo metilo desde su cofactor S-adenosil-L-metionina (SAM) a los sustratos que contienen la unidad catecol (Axelrod y cols, 1958). Por lo tanto, la inhibición de la actividad de la enzima COMT se ha convertido en un nuevo objetivo en el tratamiento de la EP, además de que existe un gran interés en el desarrollo de inhibidores de la COMT para su utilización en una terapia combinada junto a L-DOPA y un inhibidor de la AAD (Bonifacio, 2007).

Dos compañías farmacéuticas (Hoffman LaRoche y Orion Pharma) desarrollaron, registraron e introdujeron en el mercado dos inhibidores de la COMT para uso clínico: tolcapona (Hoffman LaRoche) y entacapona (Orion Pharma) (Gordin, 2004) (**Figura 23**). Ambos compuestos tienen un rasgo estructural común: presentan una unidad de nitrocatecol en su estructura, el cual, ha mostrado ser esencial para su actividad. Así, se ha demostrado que, mediante la utilización de un inhibidor de la COMT, se aumenta la biodisponibilidad de la L-DOPA hasta en un 60% (Sedek, 1997).



concuerta con la estabilización del radical fenoxi con los sustituyentes donadores de electrones en las posiciones orto descrita por Chimi (Chimi, 1991).

Estudios de relación estructura-actividad (SAR) han demostrado su influencia en la actividad de la enzima COMT, señalando que, aunque la estructura nitrocatecol es la principal responsable del anclaje al sitio activo de la enzima, las variaciones en los sustituyentes de la cadena lateral ejercen una profunda influencia tanto en la selectividad periférica, como en la duración de la actividad COMT (Bonifacio, 2007). En efecto, los nitroderivados éter de alquilo así como su análogo acetato de NO<sub>2</sub>HT han mostrado la capacidad de inhibir la actividad de la COMT en cerebro (Gallardo, 2014; 2015).

Además, todos los esfuerzos en el tratamiento de la EP se han dirigido hacia el desarrollo de compuestos nuevos que ofrezcan neuroprotección por diferentes blancos terapéuticos en el SNC (Youdim, 2005). Tomando en cuenta todo lo anterior, se puede deducir que los nitroderivados lipofílicos alquilo con cadenas más cortas, presentan algunas características interesantes, como atrapadores de radicales libres y inductores de sistemas antioxidantes, que los convierte en compuestos biológicos con un amplio potencial farmacológico.

## 5. JUSTIFICACIÓN

La enfermedad de Parkinson es el segundo síndrome neurológico más común, y en nuestro país, de acuerdo con la Secretaría de Salud, afecta a medio millón de mexicanos mayores de 60 años. A pesar de que la EP ha sido estudiada desde 1960, aún no existe un tratamiento capaz de revertir o detener el progreso de la enfermedad. El principal obstáculo en el desarrollo de un tratamiento neuroprotector para la EP es debido a que es un síndrome de etiología desconocida, aunque se han descrito diversos mecanismos que conllevan a la muerte neuronal.

Actualmente, el HT se ha convertido en objeto de numerosos estudios por parte de diferentes grupos de investigación de todo el mundo, debido a que, además de poseer propiedades antioxidantes, se ha demostrado que el HT penetra rápidamente en el cerebro y que inhibe la actividad de la enzima MAO-B *in vitro*. Por otra parte, en los últimos años, se han preparado varios tipos de derivados de HT con el fin de modular su balance hidrófilo/lipófilo para aumentar su biodisponibilidad en el organismo. Entre estos derivados cabe destacar los derivados ésteres, como el acetato de HT, el cual ha mostrado actividades similares o incluso mejoradas respecto al propio HT libre, siendo, en la mayoría de los casos, más liposoluble. También se ha propuesto el estudio de un nuevo antioxidante derivado del HT, en el que se introduce una modificación fundamental en el anillo fenólico, como es la incorporación de un grupo nitro, dando lugar al nitrohidroxitiroso. La introducción del grupo nitro le podría conferir la capacidad de inhibir la enzima COMT, enzima implicada en la degradación de la DA.

Con base a todo lo citado anteriormente, podemos decir que el HT y sus derivados; acetato de HT y NO<sub>2</sub>HT, son compuestos idóneos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, como la EP, ya que presentan una amplia gama de actividades biológicas que ofrecen neuroprotección por diversos blancos terapéuticos. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue caracterizar el efecto neuroprotector del HT, acetato de HT y nitrohidroxitiroso, en un modelo de estrés oxidativo inducido por MPP<sup>+</sup> de la enfermedad de Parkinson en rata.

## **6. HIPÓTESIS**

La administración del hidroxitirosol, acetato de hidroxitirosol y nitrohidroxitirosol disminuirán el daño oxidativo inducido por la neurotoxina MPP<sup>+</sup> en rata por inhibición de la enzima MAO-B, mejorando la función dopaminérgica y los niveles de dopamina estriatal, además de reducir los niveles de oxidación (productos lipídicos fluorescentes).

## **7. OBJETIVO GENERAL.**

Determinar el efecto protector del hidroxitirosol, acetato de hidroxitirosol y nitrohidroxitirosol, contra el daño oxidativo inducido por el metabolito MPP<sup>+</sup> en el cuerpo estriado de rata, así como los mecanismos neuroquímicos asociados.

### **7.1 Objetivos específicos.**

**7.1.1** Determinar el efecto del pretratamiento con HT, AceHT y NO<sub>2</sub>HT, sobre el daño inducido por el metabolito neurotóxico MPP<sup>+</sup> mediante la prueba conductual de giros en rata.

**7.1.2** Determinar el efecto de la administración del HT, AceHT y NO<sub>2</sub>HT sobre la disminución en el contenido de dopamina estriatal inducida por microinyección intracerebral de MPP<sup>+</sup> en rata.

**7.1.3** Evaluar el efecto de la administración de HT sobre la actividad de la enzima total MAO (y sus isoformas MAO-B y MAOA) en el cuerpo estriado de rata en el modelo de MPP<sup>+</sup>.

**7.1.4** Calcular la concentración inhibitoria 50 (CI<sub>50</sub>) del HT sobre la actividad de la enzima total MAO, así como de sus isoformas (MAO-A y MAO-B) en homogenados de cuerpo estriado de rata.

**7.1.5** Cuantificación de la liberación de dopamina extracelular por efecto de la perfusión intraestriatal de HT y MPP<sup>+</sup> empleando la técnica de microdiálisis cerebral.

**7.1.6** Detección del HT y sus metabolitos en el cuerpo estriado de ratas después de una administración sistémica de HT utilizando el sistema de microdiálisis cerebral.

**7.1.7** Cuantificar los niveles de peróxidos lipídicos fluorescentes en el cuerpo estriado de ratas administradas con MPP<sup>+</sup> y pretratadas con HT, Ace-HT y NO-HT.

**7.1.8** Evaluar los sistemas antioxidantes endógenos de glutatión peroxidasa (GPx), así como el contenido de GSH y GSSG por efecto de la administración del HT, Ace-HT y NO-HT en el modelo de MPP<sup>+</sup> en rata.

## 8. MÉTODO.

**8.1 Animales y pretratamiento de HT ó sus derivados (Ace-HT, NO<sub>2</sub>-HT).** Para los experimentos se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 220-250 g de peso. Los animales se mantuvieron en cajas de acrílico cerradas y se mantuvieron en un cuarto bajo condiciones constantes de temperatura, humedad y luz (ciclos de luz/obscuridad c/12 hrs) con alimento y agua. Todos los animales fueron tratados humana y cuidadosamente de acuerdo con los principios éticos y a los reglamentos especificados por el Comité de Uso y Cuidado de Animales del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. El compuesto HT utilizado en los primeros experimentos de este proyecto fue adquirido en Sigma-Aldrich. En la segunda parte de experimentos de este proyecto, se utilizaron los compuestos fenólicos (HT, Ace-HT y NO<sub>2</sub>-HT) proporcionados por el Dr. José Luis Espartro del Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla (España). El HT y sus derivados se disolvieron en solución salina esteril, y se administraron por vía intravenosa (i.v.) en una dosis de 1.5 mg/Kg (D' Angelo, 2001) cinco minutos antes de la administración de MPP<sup>+</sup> estriatal.

**8.2 Inyección intraestriatal de MPP<sup>+</sup>.** Cinco minutos después, los animales se sometieron a una microinyección *intra estriatal* (i.e.) estereotóxica de 10 µg de MPP<sup>+</sup> (Sigma-Aldrich) disueltos en 8 µL de solución salina, con coordenadas estereotóxicas en relación a Bregma de: 0.5 mm anterior, -3.0 mm lateral y -4.5 mm ventral a la dura (de acuerdo al atlas estereotóxico de Paxinos y Watson, 1998). Para realizar la microinyección intraestriatal se utilizó un estereotóxico Steoling y un inyector estereotóxico QSI de la marca Steoling, dicho equipo se empleo a un flujo de inyección de 1.600 µl/min. Posteriormente los animales fueron sacrificados por decapitación 2 horas, 6 días y 7 días después de la lesión estereotóxica, respectivamente, se removió el cerebro y se disecó el estriado sobre hielo (Glowinski e Iversen, 1966), conservándose en congelación a -70° C hasta sus correspondientes análisis.

**8.3 Evaluación conductual.** Seis días después de la inyección intraestriatal de MPP<sup>+</sup>, los animales de cada grupo fueron administrados con apomorfina (Sigma-Aldrich) (1 mg/Kg) por vía subcutánea. Se colocaron individualmente en cajas de acrílico rectangulares, después se contaron durante 1 hora las rotaciones ipsilaterales hacia el lado lesionado. Los resultados fueron expresados como el número total de giros ipsilaterales en un período de una hora (giros/h) (Schwarcz, 1979).

**8.4 Determinación de los niveles de catecolaminas estriatal por HPLC.** La medición del contenido de catecolaminas estriatal se hizo por medio de Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a detección electroquímica (Rubio-Osornio, 2009). Siete días después de la lesión con MPP<sup>+</sup> el cuerpo estriado fue disecado, y posteriormente, sonificado en una solución (1:10 p/v) de metabisulfito de sodio 1 M. El homogenizado se centrifugó a 14, 000 rpm durante 10 minutos a 4° C y el sobrenadante fue analizado por un cromatógrafo de líquidos de alta resolución Perkin-Elmer, con una columna Alltech 100 x 4.6 mm, y bomba Perkin-Elmer LC-250, acoplado a un detector electroquímico Metrohm (mod. 641-VA) y un integrador Hewlett-Packard 3396-II. Los valores de área fueron procesados por interpolación en la curva estándar construida previamente para cada una de las catecolaminas. Los resultados son expresados como µg de catecolamina por gramo de tejido húmedo.

**8.5 Medición de la actividad de MAO *in vivo*.** La actividad de MAO estriatal fue medida usando el método descrito por Morinan y Garrat (Morinan, 1985). Dos horas después del pretratamiento con HT y de la microinyección estriatal con MPP<sup>+</sup> el cuerpo estriado fue disecado y posteriormente homogenizado en 2.5 mL de buffer de fosfatos. Se tomaron tres alícuotas de 250 µL del homogenado. A dos alícuotas se les añadió 250 µL de buffer de fosfatos (50 mM, pH 7.4) y a la tercera alícuota se le agregó 250 µL de deprenil (Sigma-Aldrich). Las muestras fueron incubadas a 37° C durante 10 minutos, después se les añadió 500 µL de kinuramina (50 µM) (Sigma-Alrich) y la reacción fue detenida por adición de 1 mL de ácido tricloroacético (10% w/v) únicamente al tubo uno. Las muestras fueron incubadas a 37° C durante 30 minutos y la reacción se detuvo por adicción de 1 mL de ácido tricloroacético al tubo 2 y 3. Después las muestras fueron centrifugadas a 4° C (12 000 rpm, 10 min), una alícuota de 1 mL del sobrenadante fue agregada a 1 mL de NaOH acuoso (1 N). La fluorescencia fue medida a 315 nm de excitación y 380 nm de emisión utilizando un espectrofotómetro de luminiscencia Perkin-Elmer LS50B. En cada experimento, se realizaron previamente curvas de calibración por medición de la intensidad de fluorescencia de un estándar de 4-hidroxiquinolina (4-HOQ) (Sigma-Aldrich). La 4-HOQ es el producto de la actividad de MAO en la kinuramina. La actividad de MAO fue expresada como µmoles de 4-HOQ formada/1 h de incubación por gramo de tejido húmedo. Se utilizaron inhibidores de MAO específicos, deprenil (Sigma-Aldrich) para MAO-B y clorgilina (Sigma-Aldrich) para MAO-A (4 µM). A un grupo de animales se les administro L-deprenil (Do= 1.5 mg/Kg i.v.) (Sigma-Aldrich), fármaco inhibidor de la enzima MAO-B utilizado en la

terapia de pacientes con la Enfermedad de Parkinson (Boll, 2011), y se lesionaron con microinyección estriatal de MPP<sup>+</sup>, después se realizó el procedimiento descrito anteriormente.

**8.6 Determinación de la  $CI_{50}$  de HT sobre la actividad de MAO.** Se utilizaron homogenados de tejido estriatal de ratas Wistar macho sin ningún tratamiento previo. Se tomaron alícuotas de 125  $\mu$ L del homogenado y se preincubaron con 125  $\mu$ L de HT en concentraciones de 1, 5, 10, 50, 100, 500 y 1000  $\mu$ M durante 10 minutos a 37° C. Después se les añadió 125  $\mu$ L de kinuramina (Sigma-Aldrich) y se incubaron durante 30 minutos a 37° C. Se detuvo la reacción por adición de 500  $\mu$ L de ácido tricloroacético y se centrifugaron a 12000 rpm durante 15 minutos. Se tomó una alícuota de 500  $\mu$ L del sobrenadante y 500  $\mu$ L de NaOH (1 N). La fluorescencia fue medida a 315 nm de excitación y 380 nm de emisión utilizando un espectrofotómetro de luminiscencia Perkin-Elmer LS50B. En cada experimento, se realizaron previamente curvas de calibración por medición de la intensidad de fluorescencia de un estándar 4-HOQ (Sigma-Aldrich). La 4-HOQ es el producto de la actividad de MAO en la kinuramina. La actividad de MAO fue expresada como  $\mu$ mol de 4-HOQ formada/1 h de incubación por gramo de tejido húmedo. Se utilizó el inhibidor de MAO-B específico, deprenil (4  $\mu$ M) (Sigma-Aldrich).

**8.7 Peroxidación de Lípidos.** El ensayo de productos fluorescentes fue cuantificado usando la técnica descrita por Triggs & Willmore (Triggs, 1984). Dos horas después del pretratamiento con HT ó sus derivados y de la administración intraestriatal de MPP<sup>+</sup> (10  $\mu$ g/8  $\mu$ L), el animal se sacrificó por decapitación y se disecó el cuerpo estriado, se pesó y se homogenizó en 3 mL de solución salina. Alícuotas de 1 mL por duplicado del homogenizado fueron adicionadas con 4 mL de una mezcla de cloroformo-metanol (2:1 v/v), enseguida, en tubos protegidos de la luz, la mezcla fue agitada vigorosamente durante 10 segundos y conservada en hielo durante 30 min para permitir la separación de las fases. La fase acuosa (sobrenadante) fue desechada y 2 mL de la fase clorofórmica fue transferida a una celda de cuarzo y adicionada con 200  $\mu$ L de metanol. La fluorescencia fue medida en un espectrofotómetro de luminiscencia LS-50B Perkin-Elmer a 370 nm de excitación y 430 nm de emisión. La sensibilidad del espectrofotómetro fue ajustada a 140 unidades de fluorescencia con un estándar de quinina (Sigma-Aldrich) (100  $\mu$ g/1 mL) preparado en una solución de ácido sulfúrico 0.05 M (Sigma-Aldrich) previo a la medición de las muestras. Los resultados son expresados como unidades de fluorescencia por  $\mu$ g de proteína.

### **8.8 Determinación de Glutati3n reducido (GSH) y Glutati3n oxidado (GSSG).**

Para la medici3n del contenido de GSH y GSSG, dos horas despu3s del pretratamiento con HT, Ace-HT y NO<sub>2</sub>-HT m3s la administraci3n estriatal de MPP<sup>+</sup>, los animales fueron sacrificados y se disecciona el cuerpo estriado. El tejido estriatal fue homogenizado con 1.2 ml de PB-EDTA (fosfato de sodio monob3sico 0.1 M y EDTA 0.005 M) y 320  $\mu$ L de 3cido ortofosf3rico (Sigma-Aldrich) al 25%. Despu3s se tom3 una al3cuota de 1 mL del homogenado y se centrifuga a 12 000 rpm durante 30 minutos a 4<sup>o</sup> C. Se tomaron 100  $\mu$ L del homogenado y se mezclaron con 1900  $\mu$ L de PB-EDTA. Por duplicado se tomaron 600  $\mu$ L de la mezcla y se a3adieron 1300  $\mu$ L de PB-EDTA m3s 100  $\mu$ L orto-ftaldeh3do (OPA) (Sigma-Aldrich), se mezcl3 y se dej3 reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente. La fluorescencia fue medida en un espectrof3tmetro de luminiscencia LS-50B Perkin-Elmer a 350 nm de excitaci3n y 420 nm de emisi3n. La concentraci3n de GSH en las muestras fue determinada por interpolaci3n en la curva est3ndar y expresada como mmol de GSH por gramo de tejido h3medo. Para la determinaci3n de GSSG se tomaron 250  $\mu$ L del sobrenadante y se mezcl3 con 100  $\mu$ L de N-etilmaleimida (NEM) (Sigma-Aldrich) (0.04 M) y se dej3 reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Despu3s se adicionaron 2150  $\mu$ L de NaOH 0.1 M y se mezclaron. Enseguida, por duplicado se tomaron 600  $\mu$ L de la mezcla anterior y se le adicionaron 1300  $\mu$ L de NaOH m3s 100  $\mu$ L de OPA, se agita vigorosamente y se dej3 reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente. La fluorescencia fue medida en un espectrof3tmetro de luminiscencia (LS50B Perkin-Elmer) a 350 nm de excitaci3n y 420 de emisi3n. La concentraci3n GSSG en las muestras fue determinada por interpolaci3n en la curva est3ndar y fue expresada como mmol de GSSG por gramo de tejido h3medo.

**8.9 Actividad Glutati3n Peroxidasa.** Dos horas despu3s del pretratamiento con HT 3 sus derivados (Ace-HT y NO<sub>2</sub>-HT) y de la administraci3n estriatal de MPP<sup>+</sup>, los animales fueron sacrificados y se disecciona el cuerpo estriado. El tejido estriatal fue homogenizado con 1.2 mL de PB-EDTA (fosfato de sodio monob3sico 0.1 M y EDTA 0.005 M (Sigma-Aldrich)) y 320  $\mu$ L de 3cido ortofosf3rico al 25%. Se tom3 una al3cuota de 200  $\mu$ L y se le agreg3 20  $\mu$ L de Trit3n X-100 (Sigma-Aldrich) al 10%. Se tomaron 30  $\mu$ L de esta mezcla y fueron adicionados con 1000  $\mu$ L de GSH 2mM (Sigma-Aldrich), 1000  $\mu$ L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + EDTA 0.4 M, 500  $\mu$ L de NaN<sub>3</sub> 0.01 M y 1200  $\mu$ L de agua desionizada. La mezcla de reacci3n se incub3 con agitaci3n durante 5 minutos a 37<sup>o</sup> C. Enseguida se adicion3 1000  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1.25 mM (preincubado a 37<sup>o</sup> C) y se incub3 a 37<sup>o</sup> C durante 5 minutos. A 1 mL de la mezcla de

reacción se le adicionaron 4 mL de una solución de ácido metafosfórico. Las muestras se centrifugaron a 1800 rpm durante 25 minutos a 4° C. El GSH fue determinado al mezclar 2 mL de sobrenadante con 2 ml de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 1 mL de DTNB (Sigma-Aldrich), se mezclaron bien y 2 minutos después se analizaron por espectrofotometría UV/Vis a 412 nm (espectrómetro Beckman DU-6). Los resultados de la actividad de GPx fueron expresados como μmoles GSH oxidado por gramo de tejido húmedo en un minuto (Hafeman *et al.*, 1974).

**8.10 Efecto del HT en la captura de [<sup>3</sup>H]-dopamina por sinaptosomas.** Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar (250-300 g; 2 ratas por experimento) las cuales fueron decapitadas para extraer rápidamente el encéfalo del cráneo, y obtener ambos neostriados. El tejido se homogenizó en una solución de sacarosa (0.32 M) amortiguada con Hepes (5 mM, pH 7.4 a 4°C), utilizando un homogenizador de vidrio (10 golpes, 400 rpm). El homogenado se centrifugó a 1,000xg por 10 min y el sobrenadante fue centrifugado a 20,000xg por 20 min. La pastilla se resuspendió en 8 ml de la solución de homogenización, los cuales se depositaron sobre 20 mL de una solución de sacarosa (0.8 M) y Hepes (5 mM; pH 7.4 a 4°C). Después de centrifugar a 20,000xg durante 20 min, la pastilla resultante (sinaptosomas) se re-suspendió en la solución de ensayo. Los sinaptosomas fueron resuspendidos en solución Krebs-Ringer-Hepes (KRH) y alícuotas de la suspensión (140 μL) se colocaron en tubos de plástico. El HT fue adicionados en un volumen de 10 μL. Después de incubar durante 15 min a 37°C se adicionaron 50 μL de la solución KRH conteniendo [<sup>3</sup>H]-dopamina para obtener una concentración final de 30 nM. La incubación se continuó por 15 min a 37°C y se terminó por filtración a través de filtros de fibra de vidrio Whatman GF/B remojados previamente en 0.3% de polietilenimina. Los filtros se lavaron 3 veces con 1 mL de la solución KRH fría antes de ser colocados en 3 mL de líquido de centelleo. La captura no específica fue determinada en muestras incubadas a 4°C o en presencia de GBR-12909 (1 μM). La composición de la solución KRH fue (mM): NaCl 113, NaHCO<sub>3</sub> 25, KCl 3, MgCl<sub>2</sub> 1, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1, CaCl<sub>2</sub> 1.8, D-glucosa 11, Hepes 20; pH 7.4 con NaOH (Arias-Montaña).

**8.11 Microdiálisis cerebral.** Los animales utilizados fueron ratas macho de la cepa Wistar, con un peso comprendido entre 270-320 g. Las ratas fueron mantenidas en condiciones de temperatura constante (22 ± 2°C), humedad relativa (60%), con ciclos alternos de luz y oscuridad de 12 horas y libre acceso de comida y agua. Las cánulas utilizadas en este estudio fueron en forma de 'I'-shaped (Santiago, 1990). Para la perfusión intracerebral se utilizaron

diferentes concentraciones de HT (0.02, 0.2 y 1 mM) y para la administración sistémica se usó una dosis de 40 mg/Kg por vía intraperitoneal y una dosis de 1.5 mg/Kg por vía intravenosa (D'Angelo, 2001).

**8.11.1 Construcción de cánula para microdiálisis.** Están constituidas por un tubo de polietileno PE20 (d.i., 0.38 mm; d.e., 1.09 mm) de 1.5 cm al cual se le practica una fisura por la que se introduce un tubo capilar de sílice de 2.5 cm. Este capilar se recubre por un extremo con un tubo metálico de 25 ga de 1 cm de longitud y, por el otro, con la membrana dialítica tubular semipermeable de éster de celulosa saponificado (diámetro de poro 10.000 dalton) de 6 mm, sellada en su extremo distal con cianocrilato. La unión de la membrana dialítica, por un lado, y del tubo metálico, por otro lado, al PE20 se realiza con epoxi afirmando esta última zona con cemento dental. La longitud de la membrana dialítica libre (4 mm para las cánulas implantadas en el cuerpo estriado) se determina obturando el resto de la membrana con silicona.

**8.11.2 Procedimiento quirúrgico para implantación de cánulas.** Los animales fueron pesados y anestesiados con hidrato de cloral (400 mg/kg) por vía intraperitoneal. También se les aplicó localmente lidocaína (10% p/v en agua). Se utilizó un aparato estereotáxico de David Kopf-6000 para roedores. Las coordenadas para la implantación estereotáxica de las cánulas, según el atlas de Paxinos y Watson, (1986) fueron: anterior +0.6 mm, lateral  $\pm$  2.7 mm, ventral 8.0 mm, desde el punto bregma y la duramadre, para ambos cuerpos estriados. Una vez abierta la piel con un bisturí, se procedió a la localización del punto bregma. La cánula, sostenida en un brazo del estereotáxico, se situó justo en el punto bregma, se tomaron las coordenadas citadas anteriormente y se señalaron sobre el cráneo los puntos donde fueron implantadas ambas cánulas. Con ayuda de una fresa de corona esférica, conectada a un motor portafresas, se abrieron dos orificios para la colocación de tornillos de fijación Micro-57. Asimismo, también se abrieron los orificios señalados para la implantación de las cánulas. A continuación, el extremo inferior de la cánula se situó sobre la duramadre que quedó expuesta tras realizar el orificio. A partir de este punto, se introdujo la cánula a la profundidad debida según su implantación en el cuerpo estriado. El implante se fijó con cemento dental, englobando a los tornillos de fijación. Una vez fraguada la pasta, se retiraron las pinzas hemostáticas y se procedió a la sutura de la piel. Después de la operación las ratas fueron alojadas en jaulas de plástico de dimensiones 35 x 35 x 40 cm (**figura 25**). Los experimentos se llevaron siempre a cabo 24-48 horas después de la

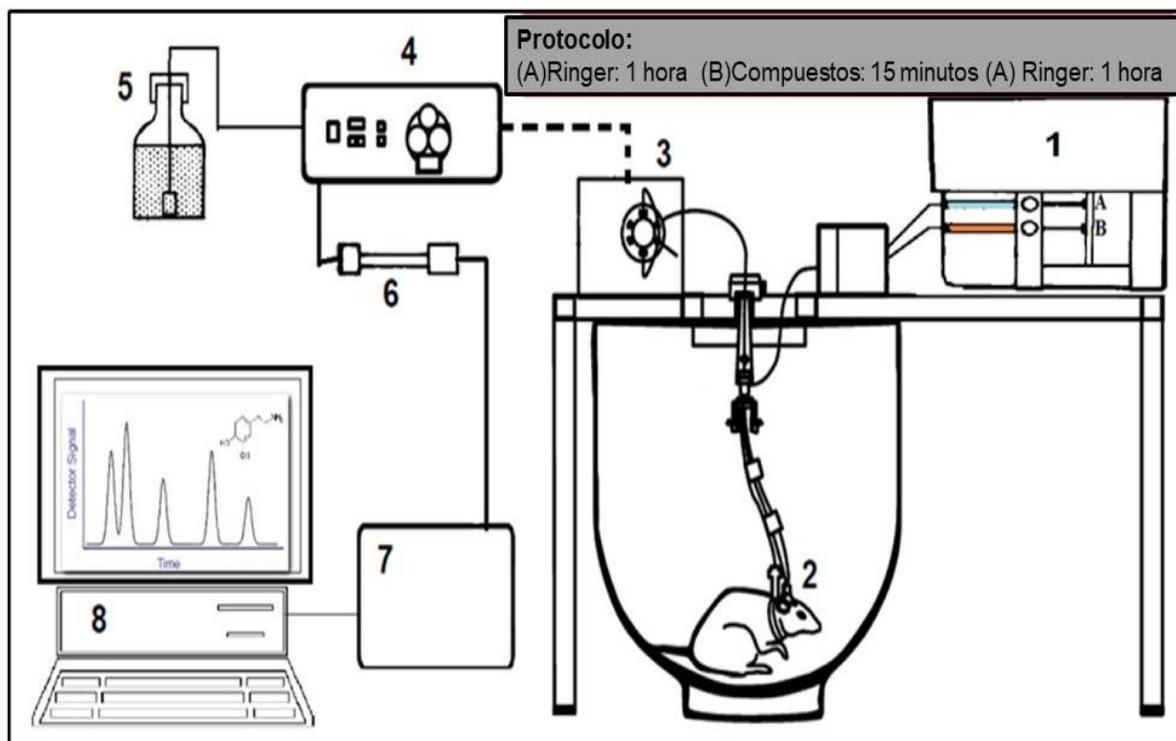
implantación de la cánula.



**Figura 25.** Microdiálisis cerebral. Procedimiento quirúrgico de implantación de la cánula de microdiálisis y mantenimiento del animal durante el protocolo experimental.

**8.11.3 Procedimiento de perfusión intracerebral.** La perfusión intracerebral se realizó en el animal despierto, con libertad de movimiento, mediante un sistema "on-line" totalmente automático como se muestra en la **fig. 26** (Westerink, 1987). La entrada de la cánula de diálisis se conectó a una bomba de perfusión (Harvard apparatus, mod. 22) y la salida a la válvula de inyección (Rheodyne 7000). Estas conexiones se hicieron con dos tubos de polietileno PE10 (d.i., 0.28 mm; d.e., 0.61 mm) de 40 cm de longitud. Las perfusiones se realizaron usando una solución Ringer a un flujo de 3  $\mu\text{L}/\text{min}$ . La composición de la solución Ringer fue: NaCl, 140 mM; KCl, 3.0 mM;  $\text{CaCl}_2$ , 1.2 mM; y  $\text{MgCl}_2$ , 1.0 mM. Desde que los compuestos en estudio (HT y  $\text{MPP}^+$ ) son incluidos en la solución Ringer son impulsados por la bomba de perfusión hasta que la primera muestra con compuesto es inyectado en la columna hay un tiempo de retraso de 30 minutos. Los datos presentados en este trabajo han sido corregidos teniendo en cuenta este tiempo de retraso. Mediante un temporizador electrónico, la válvula de inyección se mantiene en la posición de carga durante 15 minutos en lo que el 'loop' de 50  $\mu\text{L}$  se llena con el dializado. Entonces, la válvula cambia automáticamente a la posición de inyección durante 15 segundos. Este proceso se repite cada 15 minutos, que es el tiempo necesario para llevar a cabo un cromatograma completo. El protocolo experimental de perfusión consistió en la perfusión de los compuestos tras hacer circular durante 1 hora solución Ringer a través de la cánula

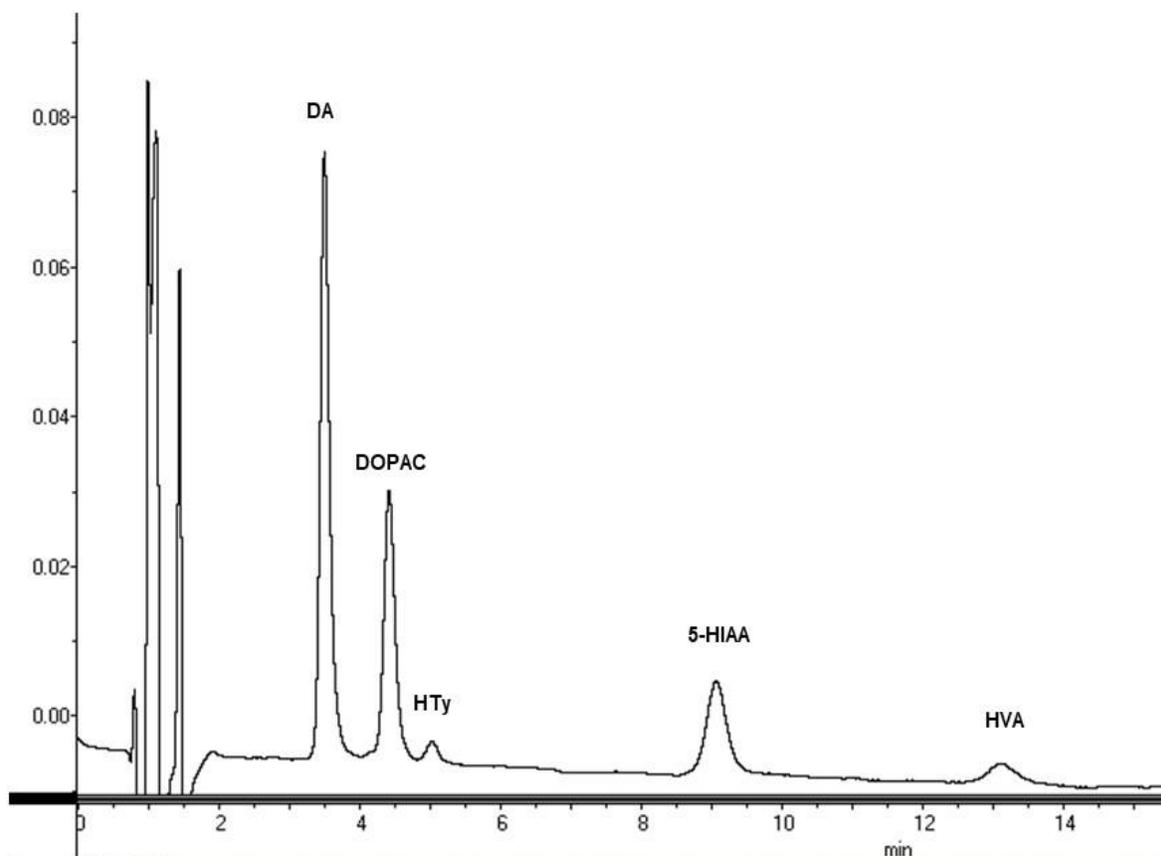
implantada. Después de la administración de los compuestos objeto de estudio, hidroxitirosol y MPP<sup>+</sup>, se siguieron recogiendo muestras durante 2 horas y media.



**Figura 26.** Protocolo experimental de perfusión intracerebral. 1. Bomba de perfusión con dos microjeringas para tratamiento: (A) Ringer, (B) MPP<sup>+</sup> + HT. 2. Sonda de microdiálisis ubicada sobre la cánula-guía. 3. Temporizador-Válvula de HPLC. 4. Bomba de HPLC. 5. Fase móvil. 6. Columna analítica. 7. Detector. 8. Sistema de registro-base de datos.

**8.11.4 Cuantificación de los niveles de DA y sus metabolitos (DOPAC, HVA) extracelulares por la técnica de microdiálisis en el estriado de ratas tratadas con HT y MPP<sup>+</sup>.** Los niveles de DA y sus metabolitos (DOPAC, HVA) fueron analizados por cromatografía líquida de alta resolución y detección electroquímica (HPLC-ED), usando un electrodo de carbón vítreo (DECADE II, ANTEC LEYDEN, The Netherlands) ajustado a 650 mV para la determinación en tejido en muestras de dializado. Se utilizó una bomba Merck L-6200. La columna analítica utilizada fue una Merck Lichrocart de fase reversa con relleno Lichrospher C18 de 5 µm de diámetro de poro y de dimensiones 125 x 4 mm. La composición de la fase móvil fue la siguiente: acetato sódico 0,05 M (Merck), ácido octanosulfónico 0,4 mM (Janssen Chimica), ácido etilendiaminotetracético (EDTA) 0,3 mM

(Merck) y 70 mL de metanol (Merck), en un volumen final de 2 L, ajustándose el pH a 4,1 con ácido acético glacial (Merck). El agua utilizada fue desionizada (Milli-Q Reference, Millipore). La fase móvil se filtró a través de filtros de 0,45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro mediante vacío y se desgasificó por ultrasonido para eliminar las pequeñas burbujas de aire que puedan interferir en el análisis. Los análisis se llevaron a cabo, isocráticamente, a temperatura ambiente y a un flujo de 1.2 mL/min. La concentración de DA, DOPAC, 5-HIAA y HVA se calculó mediante la inyección en el HPLC de un patrón puro (**figura 27**), el cual se preparó en una solución de ácido fórmico al 0,05% con EDTA y se conservó a 4°C hasta el momento de su utilización (máximo 1 semana). Los niveles extracelulares de DA, DOPAC, 5-HIAA y HVA se identificaron y cuantificaron comparando el tiempo de retención (TR) y área de sus picos con los de los patrones puros de concentración conocida (10 ng). Los niveles de DA y sus metabolitos fueron calculados con ayuda del software eDAQ PowerChrom 280.



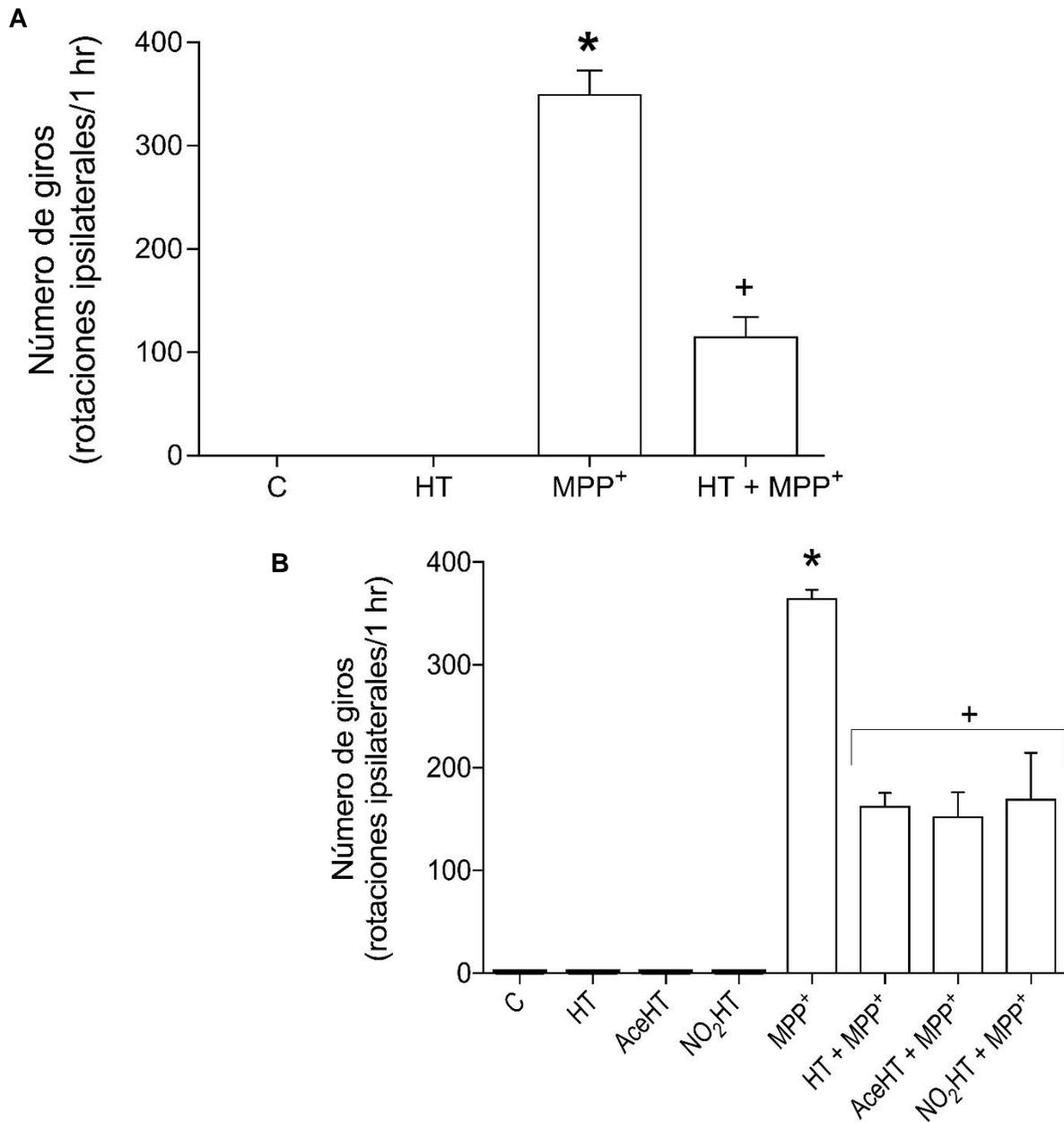
**Figura 27.** Cromatograma que muestra los estándares de DA, DOPAC, HT, 5-HIAA y HVA (10 ng).

**8.12 Análisis Estadístico.** Todos los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  SEM de 5-7 animales por grupo. Los análisis estadísticos se realizaron mediante el programa SPSS 12.0 y GraphPad 5.0. Todos los resultados obtenidos fueron analizados por medio de un análisis de varianza ANOVA de una vía seguida de una prueba de comparación múltiple de Tukey. En el caso de la estrategia experimental de evaluación conductual los resultados se sometieron a la prueba de Mann-Whitney seguida de Kruskal-Wallis y para el análisis experimental de recaptura del transportador de dopamina los resultados fueron analizados por medio de un análisis de varianza ANOVA de una vía seguida de la prueba Dunnett. Se empleó un nivel de significancia  $p < 0.05$  en las pruebas estadísticas realizadas.

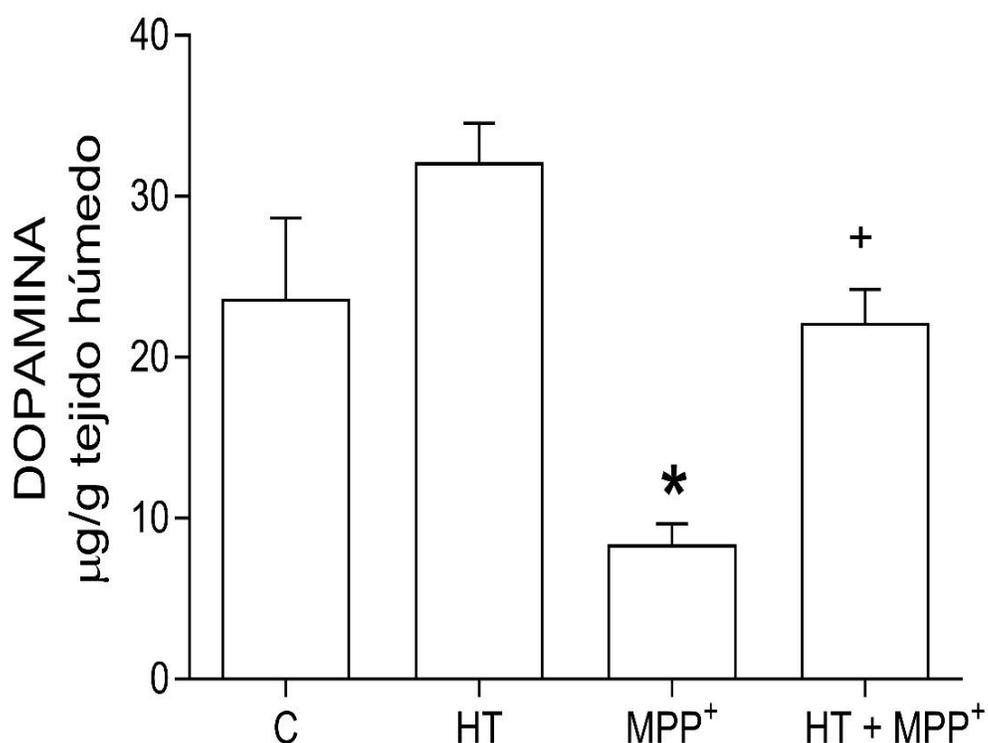
## 9. RESULTADOS.

**9.1 Disminución de giros ipsilaterales inducidos con apomorfina tras el pretratamiento con HT, AceHT y NO<sub>2</sub>HT.** Como se muestra en la **figura 28 (A) y (B)**, el pretratamiento con hidroxitirosol y sus derivados: acetato de hidroxitirosol y nitrohidroxitirosol en los animales del grupo control (grupo HT, grupo AceHT y grupo NO<sub>2</sub>HT), no presentaron ningún efecto (rotación ipsilateral) en la evaluación conductual. Por otra parte, el grupo experimental que recibió la inyección intraestriatal de MPP<sup>+</sup> (10µg/8 µL) mostró un marcado número de rotaciones ipsilaterales (350 ± 22 rotaciones/1 hora) a consecuencia del efecto neurotóxico inducido por el metabolito MPP<sup>+</sup>, que fue estadísticamente significativo cuando fue comparado con los grupos control (p = 0.015). Sin embargo, la administración intravenosa de 1.5 mg/Kg de hidroxitirosol (grupo HT + MPP<sup>+</sup>), así como de sus derivados (grupo Ace-HT + MPP<sup>+</sup>; NO<sub>2</sub>-HT + MPP<sup>+</sup>) mostraron un evidente efecto protector contra la neurotoxicidad inducida por MPP<sup>+</sup>, ya que el pretratamiento con estos compuestos fenólicos disminuyeron significativamente (p= 0.007, p= 0.007, p= 0.035, respectivamente) el número de rotaciones ipsilaterales en un 60% con respecto a el grupo MPP<sup>+</sup>.

**9.2 El pretratamiento con hidroxitirosol produce una preservación en el contenido de dopamina estriatal.** A pesar de que la administración intravenosa de hidroxitirosol a los animales del grupo control (grupo HT) mostraron un evidente incremento en los niveles de DA estriatal (32.13 ± 2.4 µg/g tejido húmedo), dicho incremento no resultó ser estadísticamente significativo cuando fue comparado con el grupo control (23.66 ± 4.9 µg/g tejido húmedo). En contraste, el grupo de ratas lesionadas con la inyección intraestriatal de MPP<sup>+</sup> (10µg/8 µL) presentó una marcada reducción en la concentración de DA estriatal (8.31 ± 1.2 µg/g tejido húmedo) que fue estadísticamente significativa cuando es comparada con el grupo control (p = 0.004). Dicha disminución del contenido de DA estriatal es otro marcador bioquímico de la neurotoxicidad inducida por el metabolito MPP<sup>+</sup>. Sin embargo, el pretratamiento con hidroxitirosol (Do = 1.5 mg/Kg, i.v) a los animales del grupo MPP<sup>+</sup> (grupo HT + MPP<sup>+</sup>) produjo una preservación significativa en el contenido de DA estriatal del 90% (22.16 ± 2-05 µg/g tejido húmedo), mostrando una neuroprotección del 60% en los niveles de DA estriatal cuando es comparado con el grupo MPP<sup>+</sup>, que fue estadísticamente significativa (p= 0.002) (**figura 29**).

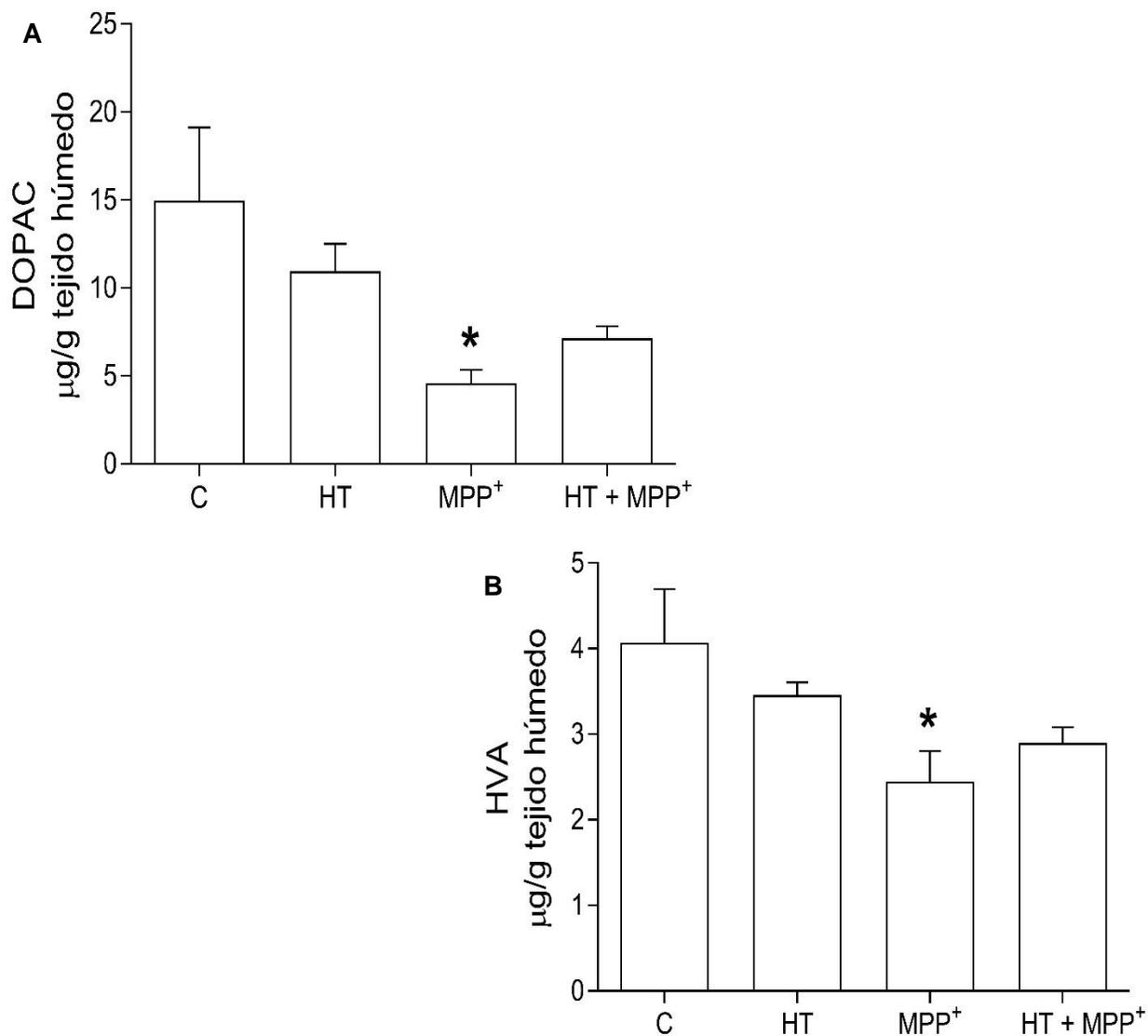


**Figura 28. Evaluación conductual (giros ipsilaterales).** Los animales fueron administrados con MPP<sup>+</sup> (10 µg/8 µL S.S.), 6 días después se administró apomorfina (1 mg/Kg) por vía subcutánea y se evaluó la frecuencia de rotaciones durante 60 minutos para cada rata. Cada barra representa el promedio ± ES del número de giros (n=7). \*Estadísticamente diferente de todos los grupos. +Estadísticamente diferente del grupo MPP<sup>+</sup>. P < 0.05, Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Mann-Whitney.



**Figura 29. Cuantificación de DA estriatal.** El pretratamiento con hidroxitirosol (Do= 1.5 mg/Kg) produce una preservación en el contenido de dopamina estriatal en el modelo de MPP<sup>+</sup> en rata. Cada barra representa el promedio  $\pm$  ES del contenido de DA estriatal ( $\mu\text{g/g}$  tejido húmedo) (n=7). \*Estadísticamente diferente de todos los grupos. +Estadísticamente diferente del grupo MPP<sup>+</sup>. P< 0.05, ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey.

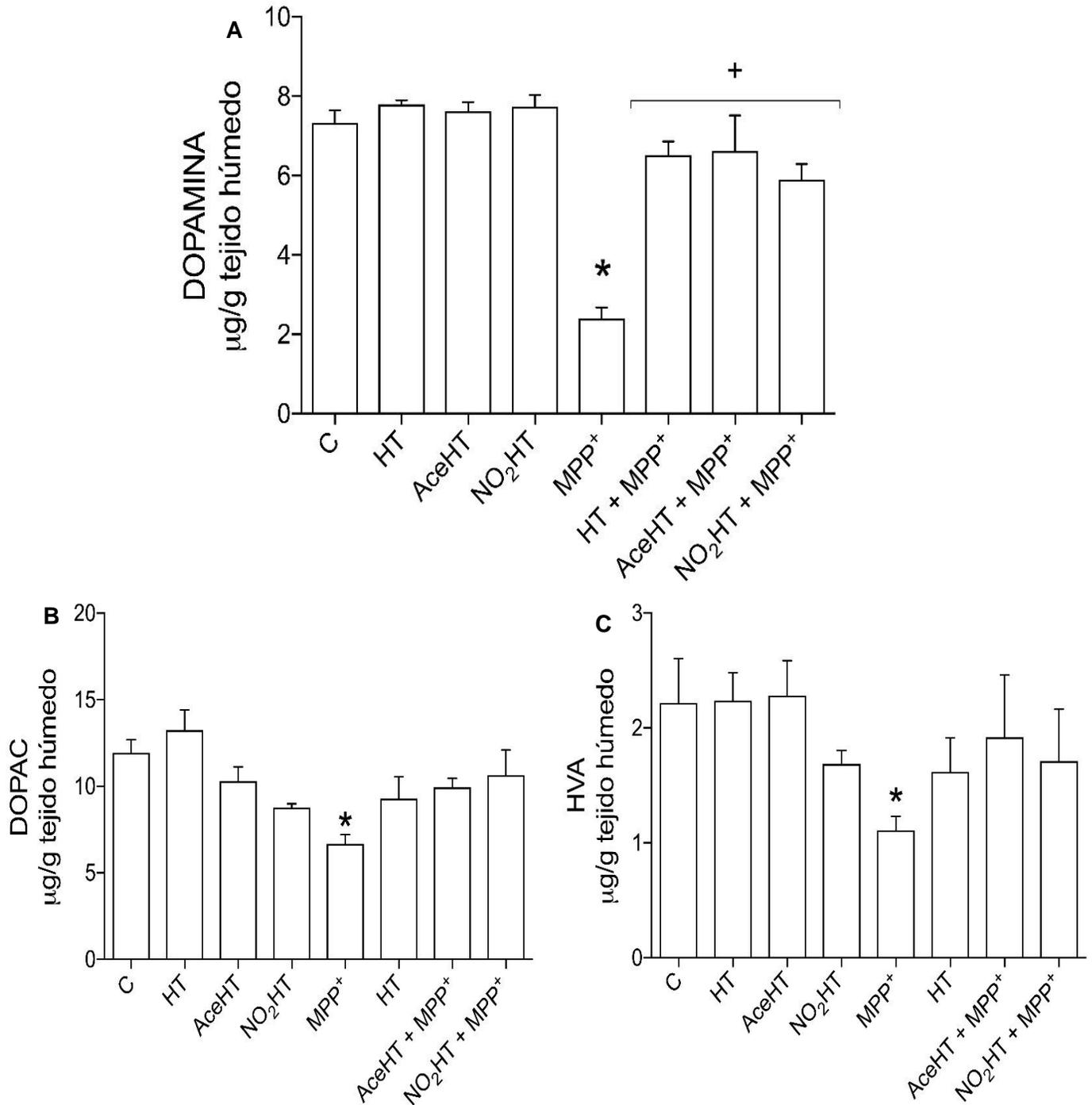
**9.3 Disminución en el contenido estriatal de los metabolitos de DA: ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) y ácido homovanílico (HVA) por efecto de la administración de MPP<sup>+</sup> y de HT.** Como se muestra en la **figura 30 (A) y (B)**, los animales del grupo control administrados con hidroxitirosol (grupo HT) (1.5 mg/Kg i.v.) presentaron una ligera disminución en el contenido de DOPAC estriatal ( $10.93 \pm 1.5 \mu\text{g/g}$  tejido húmedo) y en el contenido de HVA estriatal ( $3.45 \pm 0.14 \mu\text{g/g}$  tejido húmedo) que no resultaron estadísticamente significativas cuando fueron comparados con los niveles del grupo control ( $14.9 \pm 4.1 \mu\text{g/g}$  tejido húmedo (A);  $4.07 \pm 0.62 \mu\text{g/g}$  tejido húmedo (B)).



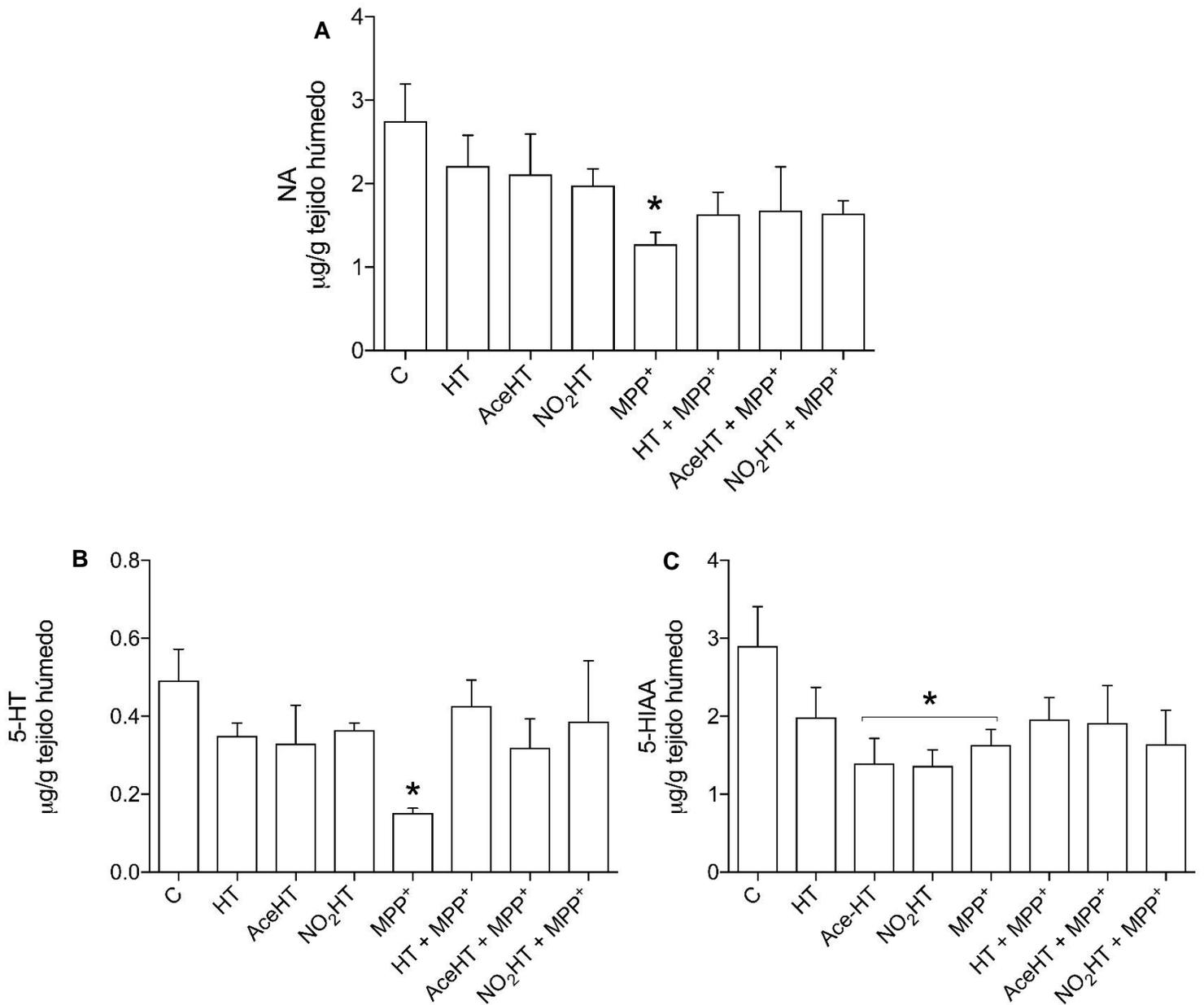
**Figura 30.** Efecto de la administración del HT en el contenido de DOPAC (A) y HVA (B) estriatal. Cada barra representa el promedio  $\pm$  ES del contenido de DOPAC y HVA estriatal ( $\mu\text{g/g}$  tejido húmedo) ( $n=7$ ). \*Estadísticamente diferente del grupo control.  $P < 0.05$ , ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey.

Por otro lado, los animales del grupo experimental MPP<sup>+</sup> (10 $\mu\text{g}/8 \mu\text{L}$ ) mostraron una disminución estadísticamente significativa de los niveles estriatales de DOPAC y HVA en un 70% y 40%, respectivamente, cuando son comparados con el grupo control ( $p= 0.003$ ). Sin embargo, aunque el pretratamiento con hidroxitirosol a los animales del grupo MPP<sup>+</sup> (grupo HT + MPP<sup>+</sup>) presentaron una tenue preservación en los niveles de DOPAC y HVA estriatal (7.1  $\pm$  0.65  $\mu\text{g/g}$  tejido húmedo (A); 2.89  $\pm$  0.18  $\mu\text{g/g}$  tejido húmedo (B)) no resultó ser estadísticamente significativa.

**9.4 Efecto del pretratamiento con HT y sus derivados, Ace-HT y NO<sub>2</sub>-HT, en el contenido de DA estriatal y sus metabolitos (DOPAC, HVA), así como en el contenido de 5-HT y NA estriatal.**



**Figura 31. Efecto de la administración de HT, AceHT y NO<sub>2</sub>HT en el contenido de DA (A), DOPAC (B) y HVA (C) estriatal.** Cada barra representa el promedio ± ES del contenido de DA, DOPAC y HVA estriatal (µg/g tejido húmedo) (n=7). \*Estadísticamente diferente de todos los grupos. +Estadísticamente diferente del grupo MPP<sup>+</sup>. P < 0.05, ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey.



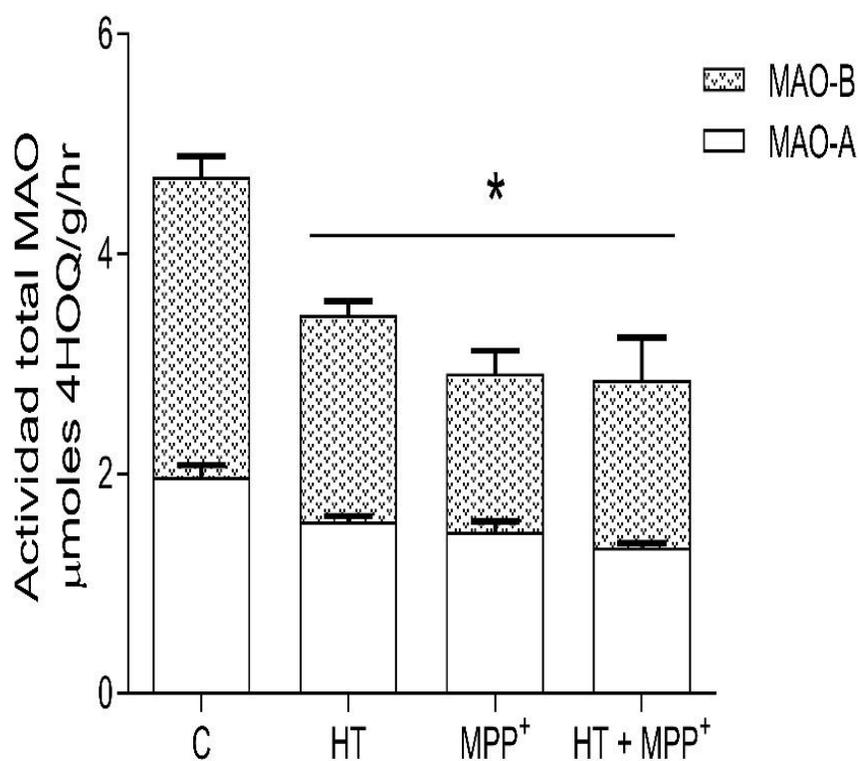
**Figura 32. Efecto de la administración de HT, AceHT y NO<sub>2</sub>HT, en el contenido de NA (A), 5-HT(B) y 5-HIAA (C) estriatal.** Cada barra representa el promedio ± ES del contenido de NA, 5-HT, 5-HIAA y estriatal (µg/g tejido húmedo) (n=7). \*Estadísticamente diferente del grupo control. P < 0.05, ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey.

Como se puede observar en la **figura 31 (A)**, la administración intravenosa de 1.5 mg/Kg de hidroxitirosol, acetate de hidroxitirosol y nitrohidroxitirosol en los animales del grupo control (grupo HT, grupo AceHT y grupo NO<sub>2</sub>HT) no mostraron ningún efecto sobre los niveles basales de DA estriatal. De lo contrario, la microinyección estriatal del metabolito MPP<sup>+</sup> produjo una disminución estadísticamente significativa ( $p= 0.0001$ ) de los niveles de DA estriatal ( $2.39 \pm 0.28 \mu\text{g/g}$  tejido húmedo) cuando es comparada con el grupo control ( $7.33 \pm 0.31 \mu\text{g/g}$  tejido húmedo) (**figura 31, A**). Además, este efecto neurotóxico inducido por el MPP<sup>+</sup> se vio reflejado en la disminución significativa de los niveles de DOPAC (**B**) ( $6.67 \pm 0.54 \mu\text{g/g}$  tejido húmedo) y de HVA (**C**) ( $1.10 \pm 0.12 \mu\text{g/g}$  tejido húmedo) cuando son comparados con los grupos control ( $11.93 \pm 0.75$ ;  $2.21 \pm 0.38 \mu\text{g/g}$  tejido húmedo, respectivamente) ( $p= 0.003$ ). Sin embargo, el pretratamiento con HT, AceHT y NO<sub>2</sub>HT, a los animales administrados con MPP<sup>+</sup> demostraron una preservación estadísticamente significativa de los niveles de DA estriatal ( $6.51 \pm 0.34$ ;  $6.62 \pm 0.90$ ;  $5.89 \pm 0.40 \mu\text{g/g}$  tejido húmedo, respectivamente) mostrando un efecto neuroprotector de un 80-90% en los niveles de DA estriatal cuando son comparados contra el grupo MPP<sup>+</sup> ( $2.39 \pm 0.28 \mu\text{g/g}$  tejido húmedo) ( $p= 0.0001$ ) (**figura 31, A**). Por otra parte, la administración de estos compuestos fenólicos en el grupo MPP<sup>+</sup> mostraron una ligera preservación de los niveles de los metabolitos de DA (DOPAC y HVA) que no fue estadísticamente significativa (**figura 31, B y C**).

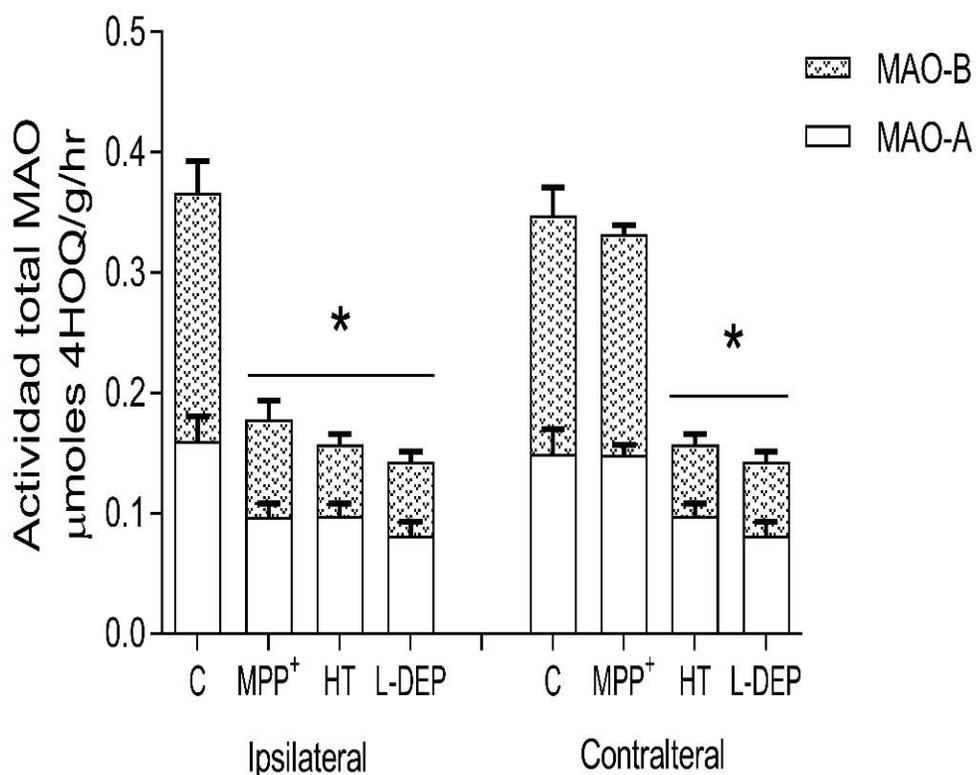
Además de la cuantificación de los niveles de DA estriatal y de sus metabolitos (DOPAC y HVA), se evaluó el efecto del pretratamiento con HT y sus derivados, en el contenido de las catecolaminas: noradrenalina y serotonina, así como del metabolito principal de serotonina (5-HIAA) (**figura 32**). Y podemos observar como la neurotoxicidad inducida por la administración del metabolito MPP<sup>+</sup> (grupo MPP<sup>+</sup>) disminuyó significativamente los niveles estriatales de noradrenalina ( $p= 0.02$ ) ( $1.27 \pm 0.14 \mu\text{g/g}$  tejido húmedo), serotonina ( $p= 0.006$ ) ( $0.15 \pm 0.012 \mu\text{g/g}$  tejido húmedo) y del metabolito 5-HIAA ( $p= 0.04$ ) ( $1.63 \pm 0.20 \mu\text{g/g}$  tejido húmedo) cuando son comparados con el grupo control ( $0.49 \pm 0.08 \mu\text{g/g}$ ;  $2.75 \pm 0.44 \mu\text{g/g}$ ;  $2.902 \pm 0.5$  tejido húmedo, respectivamente). Aunque, el pretratamiento con HT, AceHT y NO<sub>2</sub>HT en los animales del grupo MPP<sup>+</sup> mostraron una recuperación de los niveles de NA, 5-HT y 5-HIAA, no fueron estadísticamente significativos cuando fueron comparados contra el grupo MPP<sup>+</sup>. Además, la administración del HT y sus derivados en los animales del grupo control, produjeron una disminución en el contenido del metabolito de serotonina: 5-HIAA, que fue estadísticamente significativa para el AceHT y el NO<sub>2</sub>HT ( $p= 0.004$ ) cuando fueron

comparados con el grupo control, lo cual sugiere la participación de estos compuestos sobre la actividad de la MAO-B, enzima responsable del metabolismo de serotonina.

**9.5 El pretratamiento con HT disminuyó la actividad de la enzima MAO, así como de sus isoformas (MAO-A y MAO-B) en el cuerpo estriado de rata.** Con base a lo reportado en estudios *in vitro* sobre la potente inhibición del HT sobre la actividad de la enzima MAO, así como en los resultados demostrados en este trabajo sobre la tendencia a la disminución de los metabolitos de las catecolaminas por acción de la enzima MAO-B (figura 30 A, figura 32 C), se evaluó el efecto de la administración del HT sobre la actividad de la enzima MAO en el modelo de MPP<sup>+</sup> en rata. Y se demostró (figura 33) que la administración intravenosa de 1.5 mg/Kg de HT en el grupo control (grupo HT) produjo una disminución significativa del 30% en la actividad total de la enzima MAO ( $p= 0.007$ ), así como en la actividad de sus isoformas MAO-A (21%,  $p= 0.005$ ) y MAO-B (26%,  $p= 0.046$ ) cuando son comparadas contra el grupo control. Además, podemos observar que la neurotoxicidad inducida por el metabolito MPP<sup>+</sup> provoca una reducción significativa de la actividad de ambas isoformas, disminuyéndolas un 26% y 38%, respectivamente (MAO-A  $p=0.002$ ; MAO-B  $p=0.004$ ) versus el grupo control.



**Figura 33. Efecto de la administración de HT sobre la actividad total de la enzima MAO y sus isoformas (MAO-A y MAO-B).** Cada barra representa el promedio  $\pm$  ES, (n=7). \*Estadísticamente diferente del grupo control.  $P < 0.05$ , ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey.



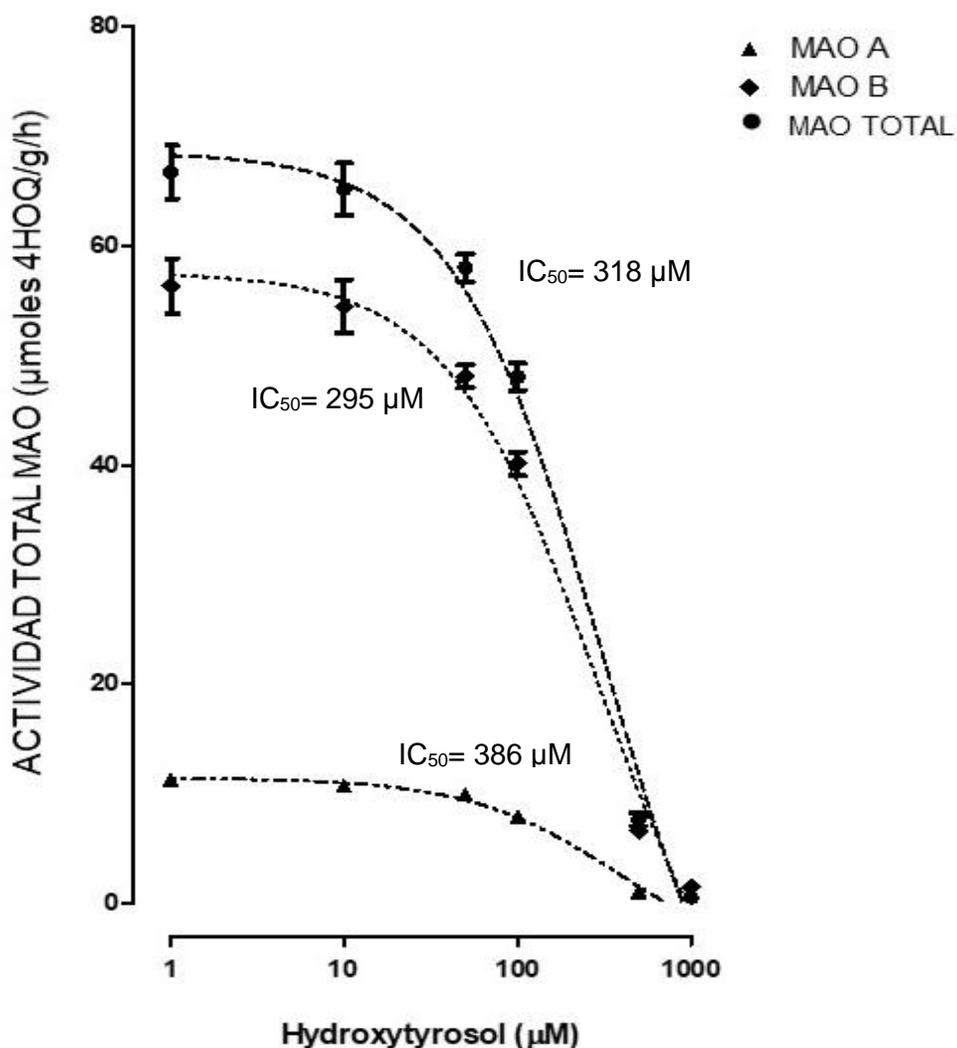
**Figura 34. Efecto de la administración de HT y L-deprenil sobre la actividad total de la enzima MAO y sus isoformas (MAO-A y MAO-B).** Cada barra representa el promedio  $\pm$  ES, (n=7). \*Estadísticamente diferente del grupo control (izquierda) y del grupo MPP<sup>+</sup> (derecha). P < 0.05, ANOVA de una vía seguida de la prueba de Tukey

Debido al efecto demostrado en los resultados previos sobre la actividad de la enzima MAO (figura 33), se realizó un estudio experimental, en el cual se evaluó un fármaco que se utiliza en la terapia de pacientes con la EP, el L-deprenil, un inhibidor irreversible de la enzima MAO-B, además del HT.

En la **figura 34** se muestra la actividad total de la enzima MAO, así como de sus isoformas (MAO-A y MAO-B) en el estriado dañado con la administración esterotóxica de MPP<sup>+</sup> (ipsilateral) y en el estriado administrado con solución salina (contralateral). La administración intraestriatal con MPP<sup>+</sup> produjo una disminución significativa en la actividad total de MAO, así como de sus isoformas (p < 0.05) debido a el efecto neurotóxico inducido por este metabolito, por lo que, el lado contralateral no mostró ninguna alteración en la actividad enzimática. Y por otro parte, podemos observar como la administración intravenosa del HT (1.5 mg/Kg) y la administración intraperitoneal del L-deprenil (1 mg/Kg) disminuyeron significativamente la actividad de las isoformas MAO-A ( $0.097 \pm 0.10$  μmoles 4HOQ/g/hr;  $0.08 \pm 0.11$  μmoles

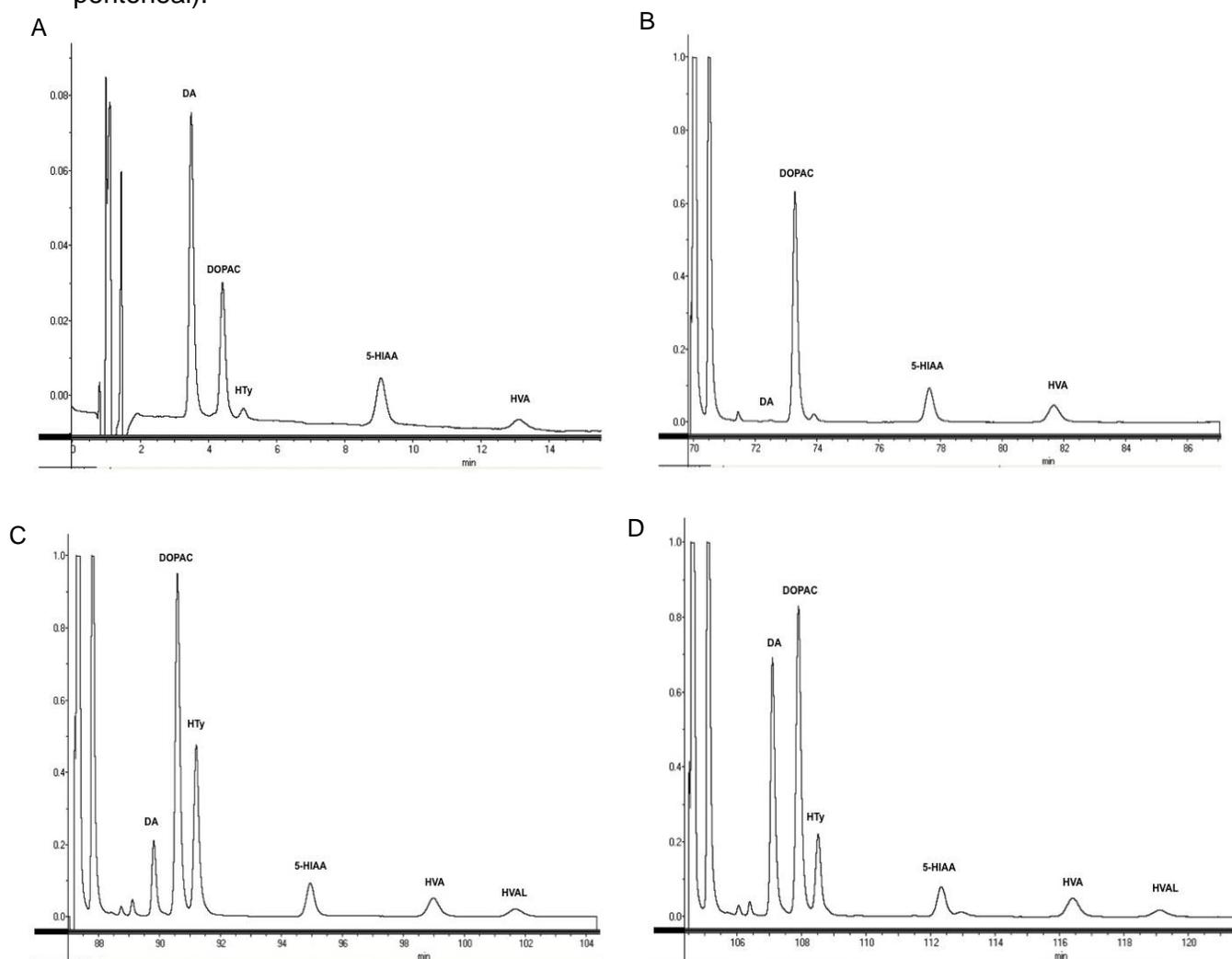
4HOQ/g/hr, respectivamente) y MAO-B ( $0.059 \pm 0.008$   $\mu$ moles 4HOQ/g/h;  $0.06 \pm 0.008$   $\mu$ moles 4HOQ/g/h, respectivamente), cuando es comparada contra el grupo control en ambos estriados.

Ya que estos resultados demuestran que el HT inhibe la enzima MAO-B de manera muy similar al fármaco L-deprenil, se realizó un experimento *ex vivo* en homogenados de estriado de rata sin ningún tratamiento previo, para calcular la  $IC_{50}$  del HT sobre la actividad total de la enzima MAO, así como de sus isoformas (MAO-A y MAO-B).



**Figura 35.  $IC_{50}$  del HT sobre la actividad de la enzima MAO.** Los homogenados se incubaron con concentraciones de 1, 10, 50, 100, 500 y 1000  $\mu$ M de HT. La  $IC_{50}$  calculada para el HT en la actividad total de MAO, así como para sus isoformas MAO-A y MAO-B, fueron 318, 386 y 295  $\mu$ M, respectivamente.

**9.6 Microdiálisis cerebral.** En relación con otro de los objetivos planteados en este trabajo, consistente en evaluar el efecto del HT sobre la liberación extracelular de DA en el núcleo estriado por efecto de la perfusión intraestriatal de MPP<sup>+</sup>, se empleó la técnica de microdiálisis como una herramienta complementaria para poder hacer un análisis de la aplicación local a nivel cerebral del HT sin interferencias a nivel sistémico. Sugiriendo que las variaciones en el metabolismo de la DA serían más detectables, y así nos permitiría inferir en el tipo de actividad que podría estar ejerciendo el HT sobre el SNC. Para lo cual, se perfundieron diferentes concentraciones de HT a través de la sonda de microdiálisis, y también fueron administradas diferentes dosis de HT sistémicamente (vía intravenosa y peritoneal).



**Figura. 36.** Cromatogramas de muestras de dializado cerebral. Cromatogramas que muestran los estándares de DA, DOPAC, HT, 5-HIAA y HVA (10 ng) **(A)**, valores basales de dializado estriatal **(B)**, valores de dializado estriatal después de la perfusión estriatal de MPP<sup>+</sup> 1 mM (15 minutos) y la administración sistémica de HT **(C)**, valores máximos de dializado estriatal por efecto de la perfusión estriatal de MPP<sup>+</sup> 1 mM **(D)**.

En la sección A de la figura 40 se muestra un cromatograma representativo de los patrones en el que se puede apreciar los picos correspondientes a la DA, sus metabolitos (DOPAC y HVA), el metabolito de serotonina (5-HIAA) y el HT. En la sección B observamos un cromatograma de dializado correspondiente a la perfusión intraestriatal continua de solución Ringer (niveles basales). En el apartado C se muestra el cromatograma de los valores de dializado estriatal después de realizar la perfusión intraestriatal de MPP<sup>+</sup> y la administración sistémica (Do= 1.5 mg/Kg i.v.) de HT, donde se demuestra la biodisponibilidad del HT en el cerebro, además de que se muestra la presencia del principal metabolito del HT, alcohol homovanílico (HVA).

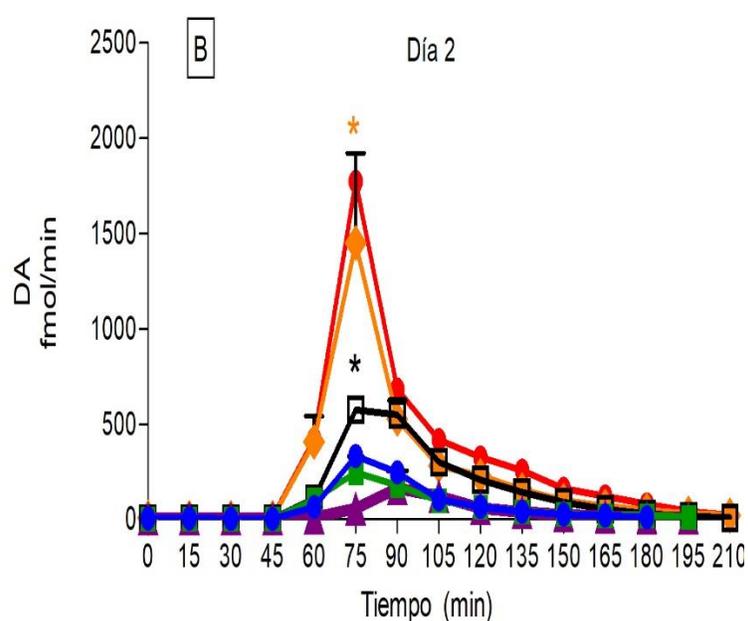
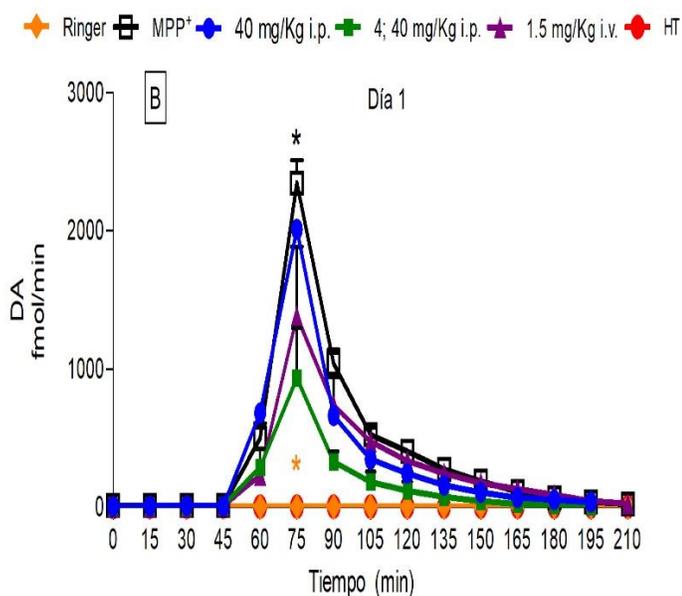
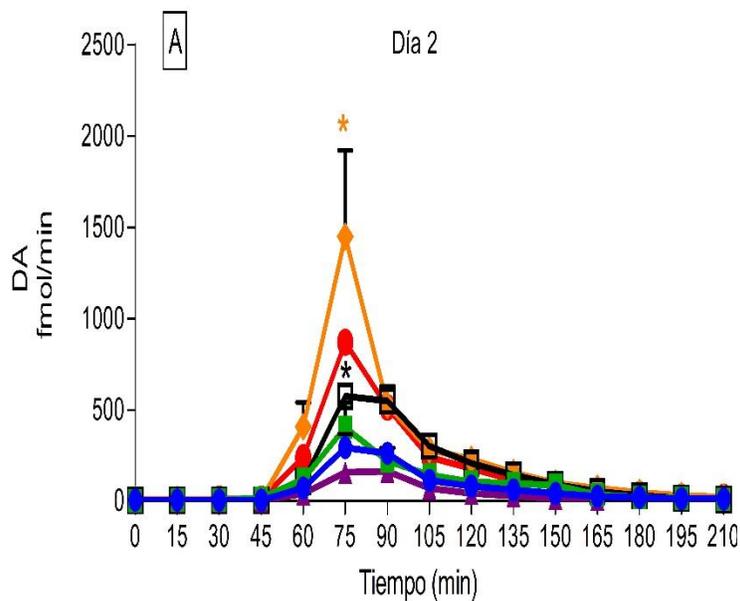
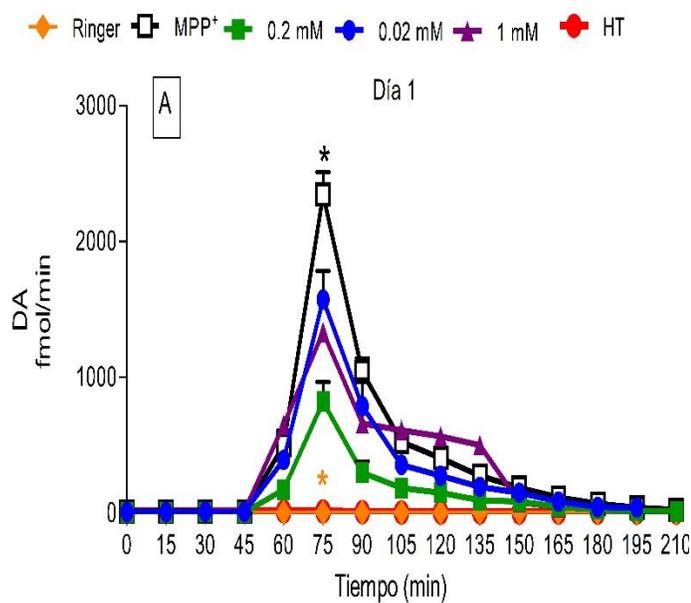
**9.6.1 Efecto de la perfusión intraestriatal de HT y MPP<sup>+</sup> sobre la liberación extracelular de DA.** Para determinar el efecto de la perfusión intraestriatal **(A)** y administración sistémica **(B)** del HT sobre los niveles extracelulares de DA (**figura 36**), DOPAC (**figura 37**), HVA (**figura 38**) y 5-HIAA (**figura 39**) en el núcleo estriado, se realizó la perfusión a través de la sonda de microdialisis de diferentes concentraciones de HT: 0.02 mM, 0.2 mM y 1 mM (A); y la administración sistémica de diferentes dosis de HT: 40 mg/kg i.p. y 1.5 mg/kg i.v. (B). El día 1: se realizó la perfusión o administración de HT más la perfusión de MPP<sup>+</sup> 1 mM durante 15 minutos; y el día 2: exclusivamente se perfundió el MPP<sup>+</sup> 1 mM durante 15 minutos a todos los grupos experimentales.

Como se puede observar en la **figura 36**: el día 1 (A) y (B), el grupo control mostro niveles extracelulares de DA estables durante el período de experimentación ( $5.73 \pm 1.57$  fmol/min), dicho grupo no fue sometido a ningún tipo de tratamiento (únicamente perfusión continua de solución Ringer). Por otro lado, los animales que fueron sometidos a la perfusión intraestriatal de MPP<sup>+</sup> (1 mM; 15 min) mostraron un incremento significativo en los niveles extracelulares de DA ( $2347.35 \pm 163.38$  fmol/min) respecto a los demás grupos.

Además, la perfusión intraestriatal de las diferentes concentraciones de HT (0.02 mM, 0.2 mM y 1 mM) más la perfusión de MPP<sup>+</sup> produjo un incremento significativo de los niveles de DA extracelular ( $1573 \pm 210$ ;  $821 \pm 144$ ;  $1333$  fmol/min, respectivamente) respecto a los animales del grupo control ( $5.73 \pm 1.57$  fmol/min) (**figura 36 (A)**). Del mismo modo, podemos observar en la **figura 31 (B)**, que la administración sistémica de HT (Do = 40 mg/Kg; 4:40mg/kg; 1.5 mg/kg) más la perfusión de MPP<sup>+</sup> mostró un incremento en los niveles de DA extracelular

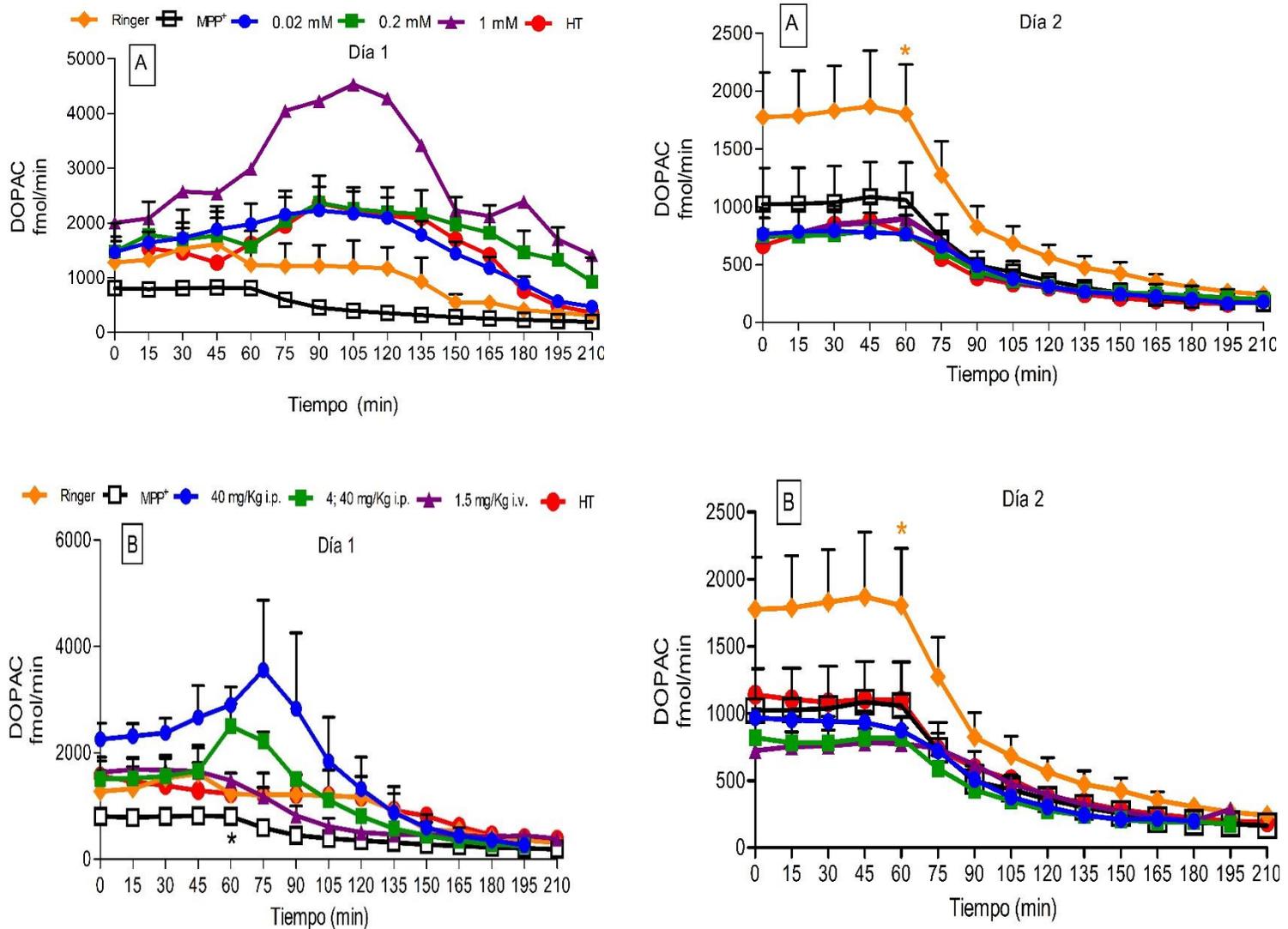
( $2011 \pm 59$ ;  $937 \pm 358$ ;  $1383 \pm 502$  fmol/min, respectivamente) con respecto al grupo de animales unicamente perfundidos con solución Ringer.

Por último, la figura 36 nos muestra que el **Día 2 (A, B)**, el grupo control (Ringer) tuvo un incremento significativo de los niveles de DA extracelular ( $1449 \pm 471$  fmol/min) después de la perfusión de MPP<sup>+</sup> (1 mM) con respecto a los demás grupos. También se observa como la perfusión con MPP<sup>+</sup> el día 2 en los grupos perfundidos o administrados con HT tuvieron un menor incremento en los niveles de DA extracelular en comparación con el grupo control y con respecto a el Día 1. Además, el grupo MPP<sup>+</sup> mostro un incremento significativo de los niveles de DA extracelular ( $549.47 \pm 81.13$  fmol/min) en comparación con los niveles de DA extracelular de los grupos perfundidos con las diferentes concentraciones de HT: 0.02 mM, 0.2 mM y 1 mM ( $260 \pm 43$ ,  $220 \pm 69$  y  $163$  fmol/min, respectivamente) y administrados sistémicamente con las dosis de 40 mg/kg, 4:40 mg/kg y 1.5 mg/kg de HT ( $247 \pm 30$ ,  $178 \pm 76$  y  $162 \pm 91$  fmol/min, respectivamente).



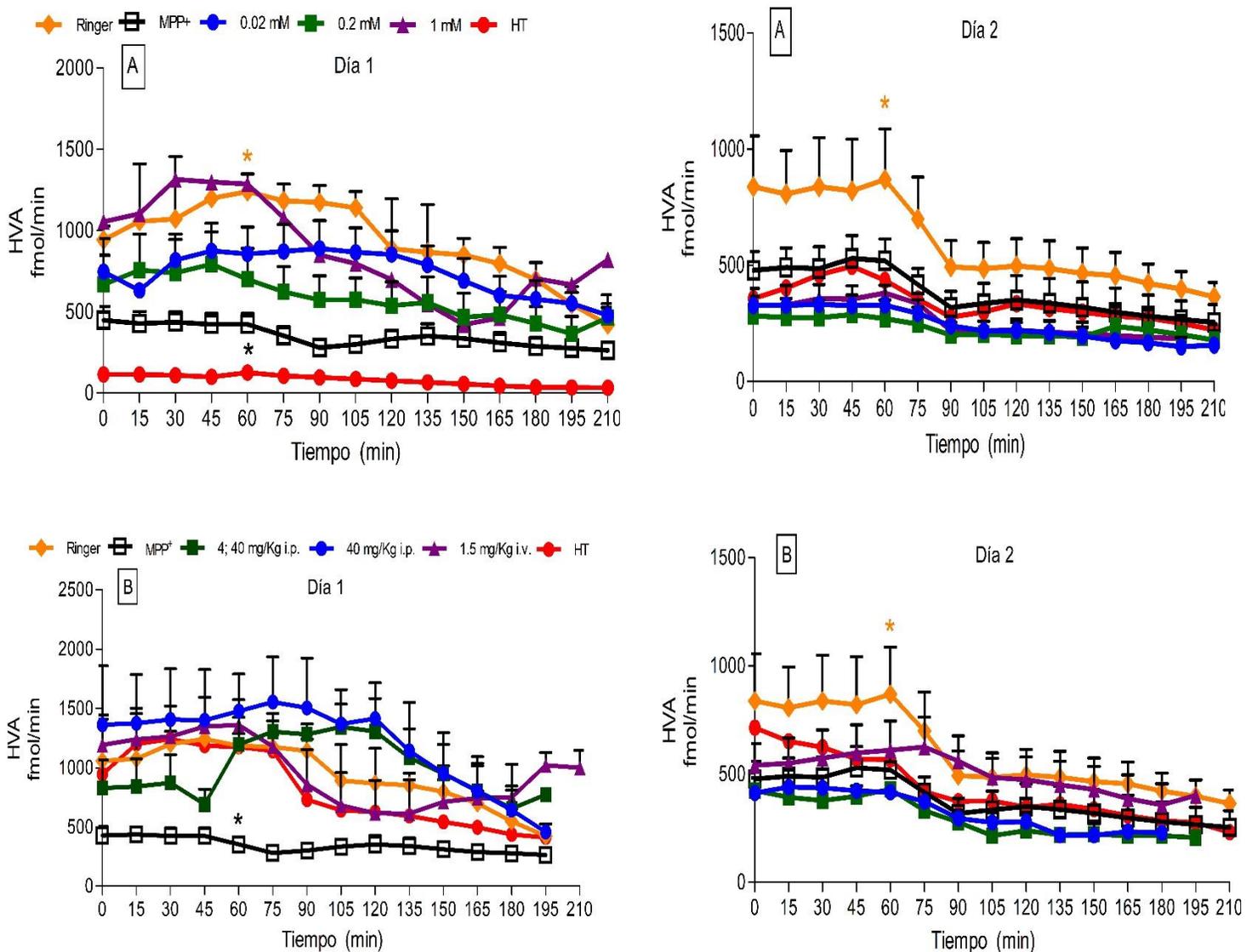
**Figura 37. Efecto de la administración de HT y perfusión de MPP<sup>+</sup> en los niveles de DA extracelular. (A)** Efecto de la perfusión de diferentes concentraciones de HT y **(B)** de la administración sistémica de diferentes dosis de HT con la perfusión de MPP<sup>+</sup> 1 mM durante 15 minutos en los niveles de DA extracelular del cuerpo estriado (**Día 1**). Efecto de una segunda perfusión de MPP<sup>+</sup> 1 mM durante 15 minutos, 24 horas después, en los niveles de DA extracelular en el cuerpo estriado (**Día 2**). Los resultados se muestran como la media  $\pm$  ES (n=5). \*P< 0.05, ANOVA de una vía seguida de la prueba de Kruskal-Wallis.

**9.6.2 Efecto de la perfusión intraestriatal de HT y MPP<sup>+</sup> sobre los niveles extracelulares de los metabolitos de DA: DOPAC y HVA.** En cuanto a los niveles de los metabolitos de DA: DOPAC y HVA, podemos observar que la perfusión continua de solución Ringer el día 1 mostró niveles estables de los metabolitos (figuras 37 y 38). Por otro lado, en el día 2 se mostraron niveles basales mayores de los metabolitos en el grupo control en comparación con los demás grupos, dichos niveles tuvieron una disminución significativa después de la perfusión de MPP<sup>+</sup> 1mM (figuras 37 y 38).



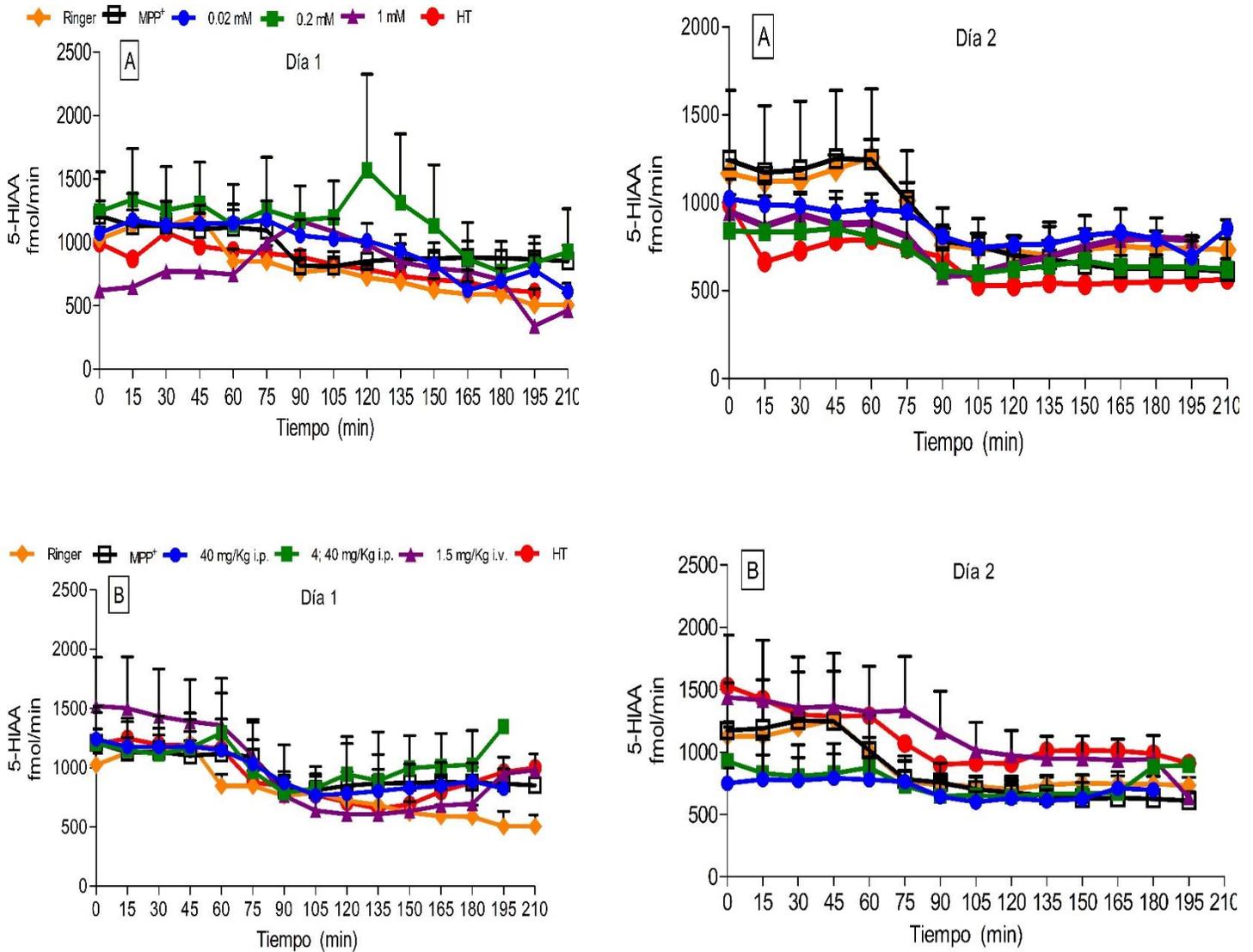
**Figura 38. Efecto de la administración de HT y perfusión de MPP<sup>+</sup> en los niveles de DOPAC extracelular. (A)** Efecto de la perfusión de diferentes concentraciones de HT y **(B)** de la administración sistémica de diferentes dosis de HT con la perfusión de MPP<sup>+</sup> 1 mM durante 15 minutos en los niveles de DOPAC extracelular del cuerpo estriado **(Día 1)**. Efecto de una segunda perfusión de MPP<sup>+</sup> 1 mM durante 15 minutos, 24 horas después, en los niveles de DA extracelular en el cuerpo estriado **(Día 2)**. \*Estadísticamente diferente de todos los grupos. P < 0.05, ANOVA de una vía seguida de la prueba de Kruskal-Wallis.

Además, en las figuras 37 y 38, podemos observar las variaciones en las concentraciones extracelulares de los metabolitos DOPAC y HVA, para las distintas concentraciones de HT y para las diferentes dosis administradas de HT en relación al grupo Ringer, y como se puede observar ninguna concentración o dosis de HT produjo modificaciones significativas en los niveles extracelulares de DOPAC y HVA.



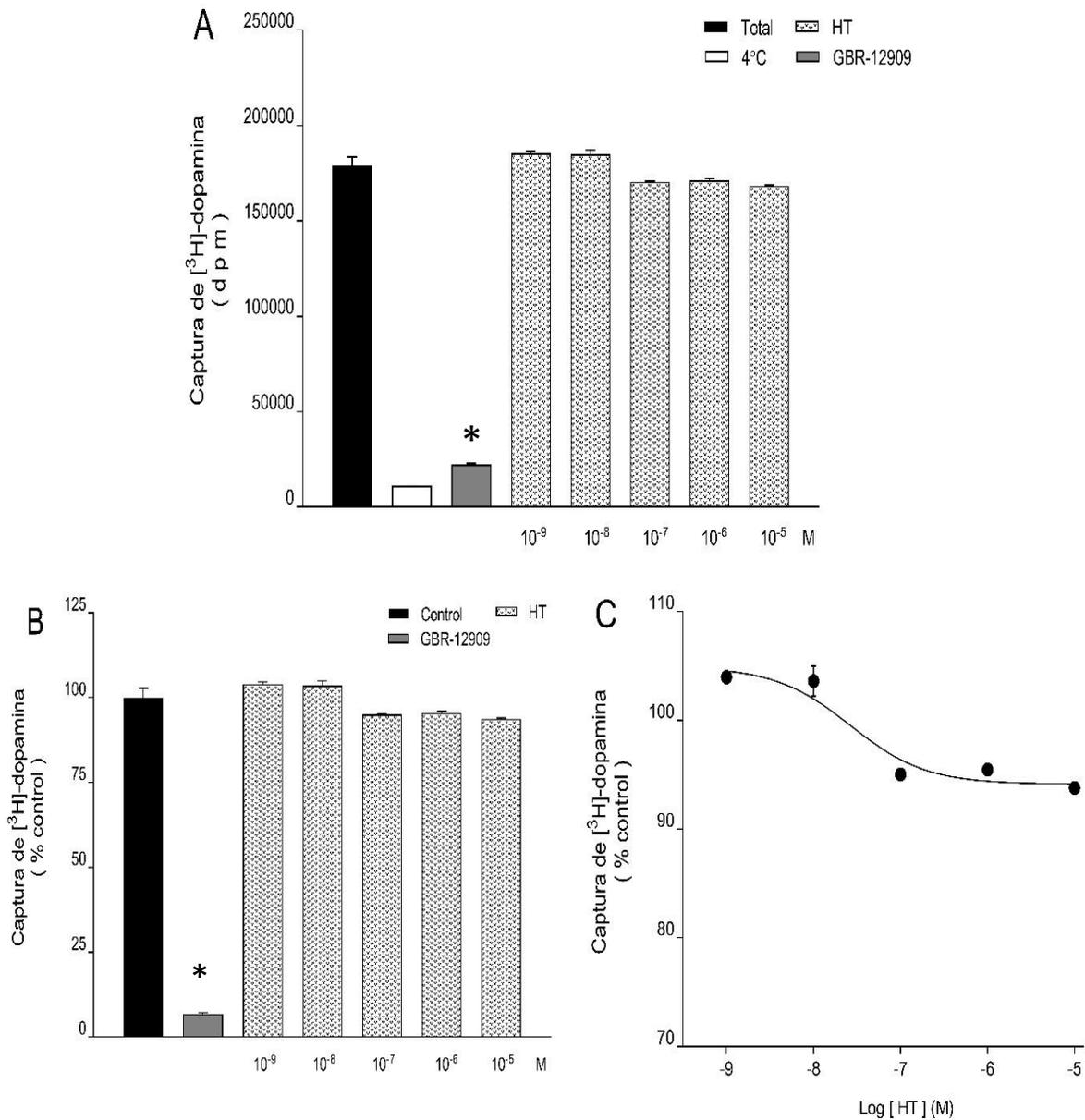
**Figura 39. Efecto de la administración de HT y perfusión de MPP<sup>+</sup> en los niveles de HVA extracelular. (A)** Efecto de la perfusión de diferentes concentraciones de HT y **(B)** de la administración sistémica de diferentes dosis de HT con la perfusión de MPP<sup>+</sup> 1 mM durante 15 minutos en los niveles de HVA extracelular del cuerpo estriado (**Día 1**). Efecto de una segunda perfusión de MPP<sup>+</sup> 1 mM durante 15 minutos, 24 horas después, en los niveles de DA extracelular en el cuerpo estriado (**Día 2**). \*Estadísticamente diferente de todos los grupos. P < 0.05, ANOVA de una vía seguida de la prueba de Kruskal-Wallis

Por último, se realizó la cuantificación de los niveles extracelulares del principal metabolito de la serotonina, el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), por efecto de la perfusión intraestriatal de HT y MPP<sup>+</sup>. Y como se muestra en la figura 39, la perfusión de las diferentes concentraciones (A) y dosis administradas (B) de HT, así como la perfusión intraestriatal de MPP<sup>+</sup> no produjo alguna alteración significativa en los niveles extracelulares del metabolito 5-HIAA.



**Figura 40. Efecto de la administración de HT y perfusión de MPP<sup>+</sup> en los niveles de 5-HIAA extracelular. (A)** Efecto de la perfusión de diferentes concentraciones de HT y **(B)** de la administración sistémica de diferentes dosis de HT con la perfusión de MPP<sup>+</sup> 1 mM durante 15 minutos en los niveles de 5-HIAA extracelular del cuerpo estriado **(Día 1)**. Efecto de una segunda perfusión de MPP<sup>+</sup> 1 mM durante 15 minutos, 24 horas después, en los niveles de DA extracelular en el cuerpo estriado **(Día 2)**. \*Estadísticamente diferente de todos los grupos. P < 0.05, ANOVA de una vía seguida de la prueba de Kruskal-Wallis.

**9.7 Efecto del HT en la captura de [<sup>3</sup>H]-dopamina por sinaptosomas del neostriado de rata.**



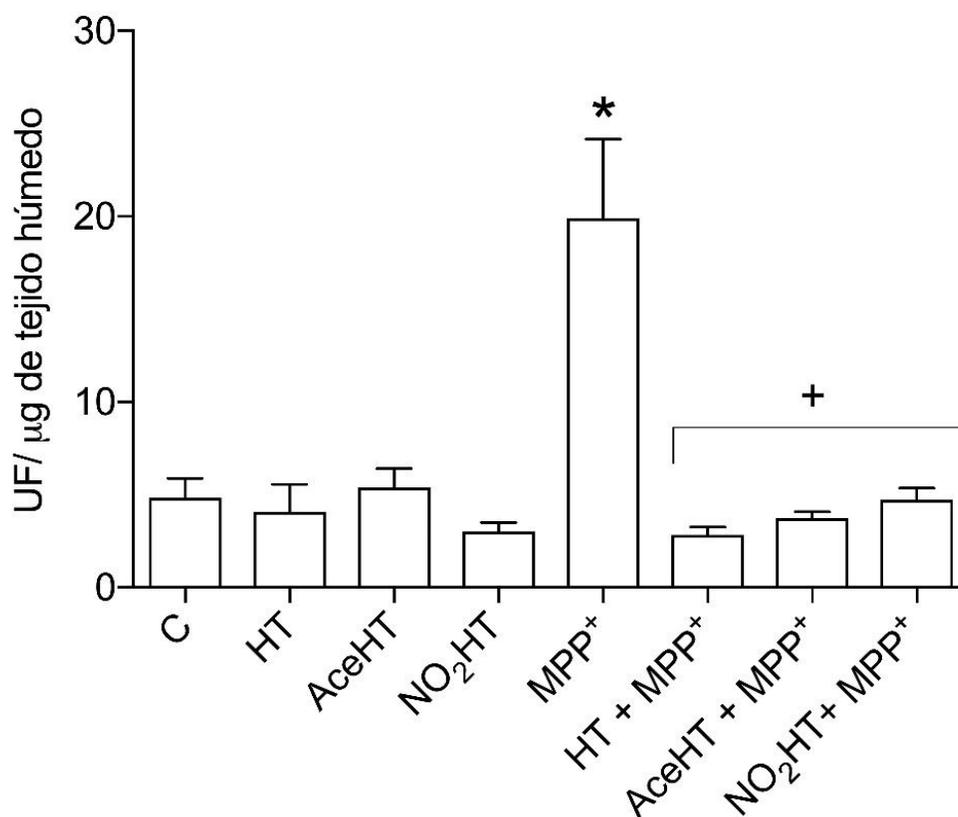
**Figura 41. Efecto del HT en la captura de [<sup>3</sup>H]-dopamina por sinaptosomas del neostriado de rata. (A)** Captura a 4°C, temperatura inespecífica (temperatura que se resta de todos los demás grupos). **(B)** Efecto del GBR-12909, Inhibidor selectivo del transportador de DA (DAT), y **(C)** el efecto de las diferentes concentraciones (10<sup>-9</sup>-10<sup>-5</sup> M) de HT sobre la captura del DAT. \*Estadísticamente diferente del total. P = 0.05 ANOVA de una vía seguida de la prueba Dunnett.

Con base a los resultados obtenidos mediante la técnica de microdiálisis, donde se demostro que la administración sistémica y perfusión intraestriatal de HT no provoco un aumento en la liberación de DA extracelular después de la perfusión intraestriatal con el metabolito MPP<sup>+</sup>, se planteo dentro de los objetivos de este trabajo, realizar un experimento para determinar la posible implicación del HT sobre la recaptura sináptica de DA. Dicho experimento se llevo a cabo en sinaptosomas de estriado de rata, utilizando un inhibidor selectivo del transportador de DA (GBR-12909) y diferentes concentraciones de HT ( $10^{-9}$ - $10^{-5}$  M) para determinar si un posible mecanismo de acción del HT sobre la liberación extracelular de DA, es la inhibición de la recaptura de DA a través del transportador de DA (DAT).

En la **figura 41 (A)** se muestra la captura del transportador de dopamina (DAT) a 4° C, ya que es considerada como una temperatura inespecífica (temperatura que se resta de todos los demás grupos). También podemos observar el efecto de un inhibidor selectivo del transportador de DA (GBR-12909), que a 10  $\mu$ M inhibe en un  $92.5 \pm 0.6\%$  la captura por el transportador de dopamina, como se esperaba (**B**). Por otro lado, se muestra el efecto de las diferentes concentraciones de HT ( $10^{-9}$ - $10^{-5}$  M) sobre la captura de dopamina por DAT, dicho efecto sobre DAT es muy reducido, ya que presenta menos del 10% de inhibición, aunque con una potencia de inhibición marcada a la concentración de 5 nM (**C**), estos resultados descartan el posible mecanismo del HT sobre la inhibición de la recaptura de DA a través del transportador de dopamina (DAT).

**9.8 Formación de productos lipídicos fluorescentes por el metabolito MPP<sup>+</sup>.** Después de demostrar el efecto protector del HT en el daño inducido por el metabolito neurotóxico MPP<sup>+</sup> en las pruebas bioquímicas (catecolaminas) y fisiológicas (prueba conductual), se planteó el objetivo de evaluar el efecto del pretratamiento del HT y sus derivados (AceHT y NO<sub>2</sub>HT) contra el estrés oxidativo generado por el metabolito MPP<sup>+</sup>. Para lo cual, 2 horas después de la administración i.v. de 1.5 mg/kg de HT, AceHT y NO<sub>2</sub>HT y de la administración estriatal de MPP<sup>+</sup> (10 $\mu$ g/8  $\mu$ l) se determino la formación de productos lipídicos fluorescentes. La formación de productos lipídicos fluorescentes detectados en el grupo de animales tratados únicamente con solución salina (i.e.) fueron considerados como los niveles basales de fluorescencia,  $4.829 \pm 1.04$  UF/ $\mu$ g de tejido húmedo (100%). La administración intravenosa del HT y sus derivados (Ace-HT y NO<sub>2</sub>-HT) no produjo ninguna alteración significativa en la formación

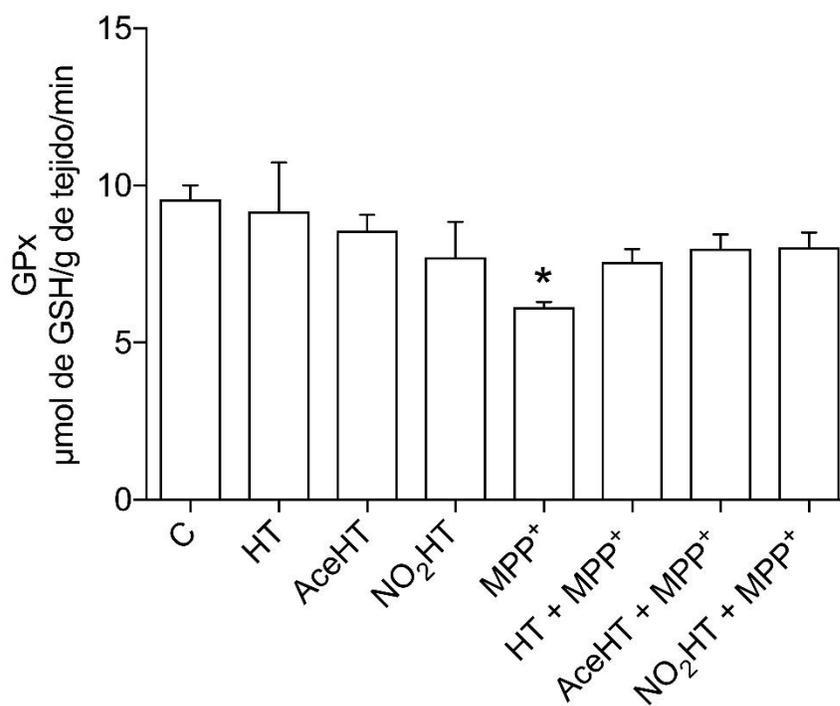
estriatal de los productos lipídicos fluorescentes ( $3.281 \pm 1.47$ ;  $4.525 \pm 1.02$ ;  $3.479 \pm 0.50$  UF/ $\mu$ g de tejido húmedo, respectivamente) en comparación con el grupo control (**Figura 42**).



**Figura 42. Efecto del HT y sus derivados (Ace-HT y NO<sub>2</sub>-HT) sobre la formación de productos lipídicos fluorescentes inducidos por MPP<sup>+</sup>.** Los resultados son expresados como la media  $\pm$  ES (n=5). \*Estadísticamente diferente de todos los grupos. +Estadísticamente diferente del grupo MPP<sup>+</sup>. (p<0.05) ANOVA de una vía seguida de una prueba de Tukey.

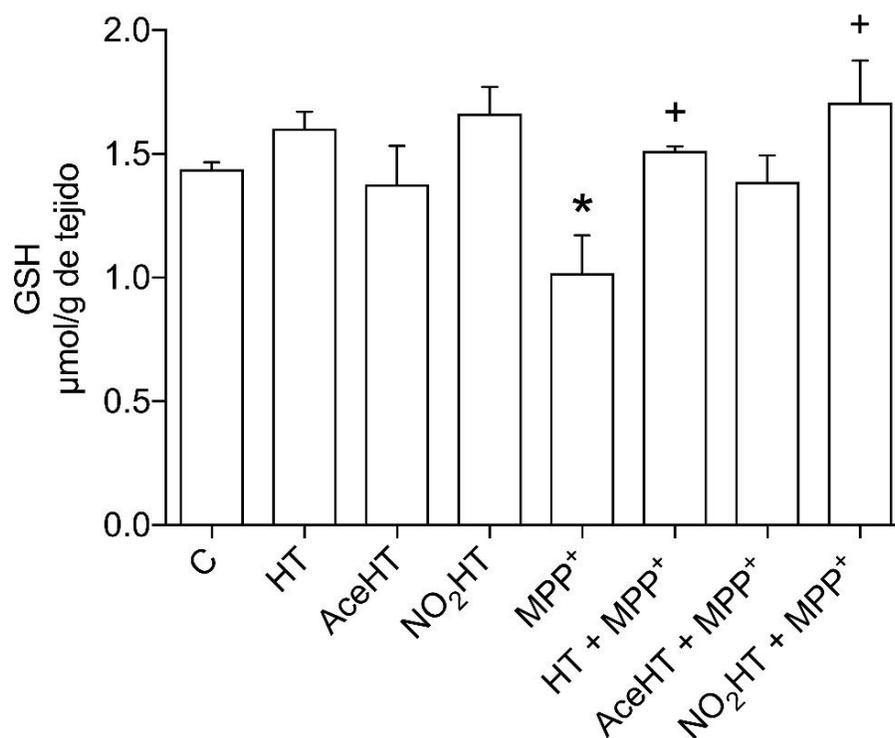
Por otro lado, el grupo de animales lesionados por microinyección intraestriatal de MPP<sup>+</sup> mostraron un incremento del 247.69%, que fue estadísticamente significativo (p=0.0005,  $16.79 \pm 4.25$  UF/ $\mu$ g de tejido húmedo) cuando fue comparado contra el grupo control. Sin embargo, el pretratamiento con HT, Ace-HT y NO<sub>2</sub>-HT en ratas lesionadas con el metabolito MPP<sup>+</sup> demostró un efecto protector al disminuir significativamente (180%) la formación de productos lipídicos fluorescentes ( $3.102 \pm 0.41$ ;  $3.971 \pm 0.34$ ;  $4.797 \pm 0.62$  UF/ $\mu$ g de tejido húmedo, respectivamente) versus el grupo MPP<sup>+</sup>.

**9.9 Disminución de la actividad de GPx por efecto de la administración de MPP<sup>+</sup>.** Los resultados del efecto del metabolito MPP<sup>+</sup> sobre la actividad de la enzima GPx son expresados como  $\mu\text{mol}$  GSH oxidado por gramo de tejido húmedo por minuto. Los valores basales se obtuvieron del grupo de animales tratados únicamente con solución salina (i.v., i.e.), el cual fue considerado como el grupo control ( $9.180 \pm 0.45 \mu\text{mol}$  GSH oxidado/g tejido húmedo/min). Los animales administrados vía i.v. con HT y sus derivados (AceHT y NO<sub>2</sub>HT) y con S.S por vía i.e. no mostraron diferencias significativas en la actividad de GPx en comparación con el grupo control. Por otro lado, el grupo de animales lesionados con  $10\mu\text{g}/8\mu\text{l}$  de MPP<sup>+</sup> i.e. presento una disminución estadísticamente significativa de la actividad de GPx ( $5.149 \pm 0.15$ ) en comparación con el grupo control ( $p=0.04$ ). Finalmente, los resultados obtenidos a partir de los grupos de animales pretratados con el HT, Ace-HT y NO<sub>2</sub>-HT y administrados con MPP<sup>+</sup> i.e. mostraron un ligero incremento de la actividad de la enzima ( $7.445 \pm 0.42$ ,  $8.211 \pm 0.44$ ,  $8.044 \pm 0.47$ , respectivamente) que no alcanzó diferencias significativas estadísticamente cuando fueron comparados con el grupo MPP<sup>+</sup> (Figura 43).



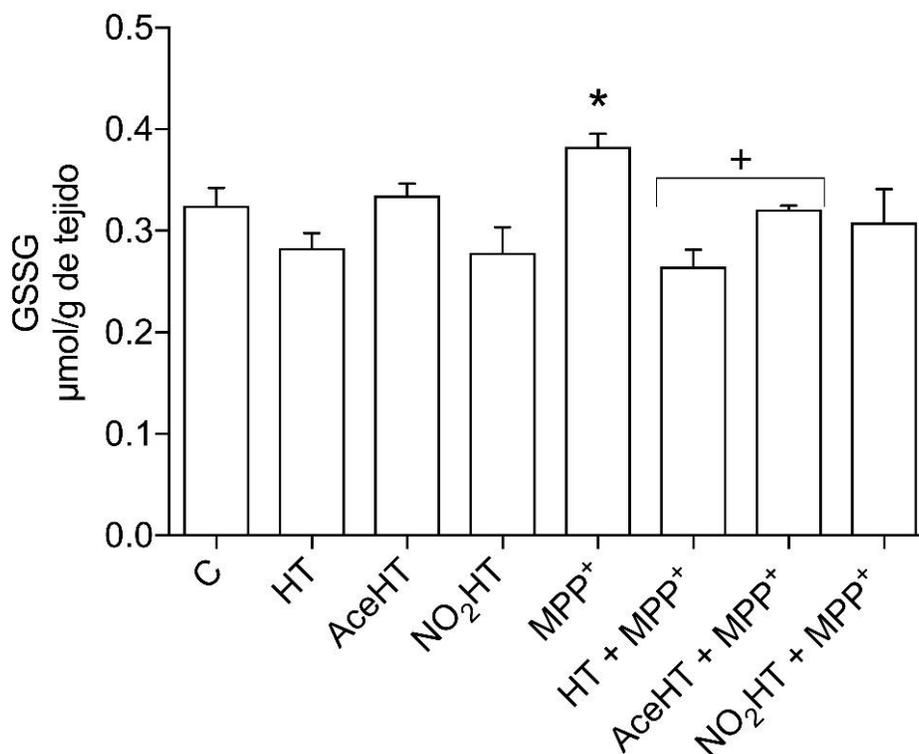
**Figura 43. Efecto del HT y sus derivados (Ace-HT y NO<sub>2</sub>-HT) sobre la actividad GPx en el modelo MPP<sup>+</sup> en rata.** Los resultados son expresados como la media  $\pm$  ES (n= 5). Los valores son expresados en  $\mu\text{mol}$  de GSH oxidado por g de tejido por min. \*Estadísticamente diferente del grupo control ( $p<0.05$ ). ANOVA de una vía seguida de una prueba de Tukey.

**9.10 Efecto de la administración de HT, Ace-HT y NO<sub>2</sub>-HT sobre el contenido estriatal de GSH en el modelo de MPP<sup>+</sup>.** Dos horas después de la administración i.v. de 1.5 mg/kg de HT y sus derivados (Ace-HT y NO<sub>2</sub>-HT) y de la infusión estriatal de MPP<sup>+</sup> (10µg/8 µl) se cuantificaron los niveles estriatales de GSH. Los valores obtenidos del grupo control fueron considerados niveles basales (1.454± 0.02 µmol/g de tejido). Los grupos control tratados con HT y NO<sub>2</sub>HT mostraron un tenue incremento que no alcanzó diferencia estadísticamente significativa cuando fue comparado con el grupo control. Por otro lado, el grupo MPP<sup>+</sup> mostró una disminución significativa (p= 0.04) del contenido de GSH (1.018±0.15) en relación los grupos control HT y NO<sub>2</sub>-HT. Del mismo modo, los grupos pretratados con HT y NO<sub>2</sub>-HT más MPP<sup>+</sup> presentaron niveles de GSH (1.514 ± 0.01, 1.791± 0.16) significativamente incrementados (p= 0.04) en comparación al grupo MPP<sup>+</sup> (Figura 44).



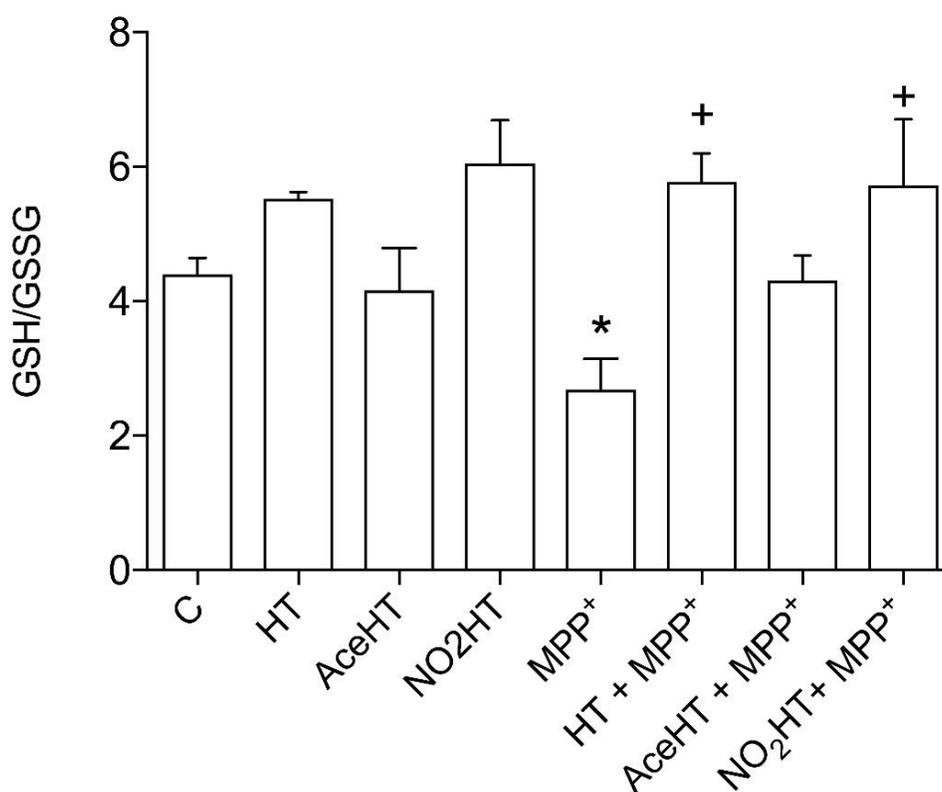
**Figura 44. Niveles de GSH por efecto del HT y sus derivados en el modelo MPP<sup>+</sup>.** Los niveles de GSH son representados como la media ± ES (n=5). \*Estadísticamente diferente del grupo NO<sub>2</sub>-HT. + Estadísticamente diferente del grupo MPP<sup>+</sup> (p<0.05). ANOVA seguida de una prueba de Tukey.

**9.11 Efecto del HT y sus derivados (Ace-HT y NO<sub>2</sub>-HT) sobre el incremento en el contenido de GSSG inducido por el metabolito MPP<sup>+</sup>.** Dos horas después de la administración i.v. de HT, Ace-HT y NO<sub>2</sub>-HT y de la infusión estriatal de MPP<sup>+</sup> (10µg/8 µl) se cuantificó el contenido estriatal de GSSG. El contenido de GSSG del grupo control fue considerado como los niveles basales (0.3409 ± 0.01 µmol/g tejido). Los grupos control de HT y NO<sub>2</sub>-HT mostraron una ligera disminución en el contenido de GSSG (0.2757 ± 0.01 µmol/g tejido, 0.2764 ± 0.02 µmol/g tejido, respectivamente) que no alcanzaron significancia estadística en comparación con el grupo control. Por otra parte, el grupo MPP<sup>+</sup> mostro un incremento estadísticamente significativo (0.3737 ± 0.01 µmol/g tejido) en comparación con los grupos control HT y NO<sub>2</sub>-HT (p= 0.004). Sin embargo, los grupos pretatados con HT, Ace-HT y NO<sub>2</sub>-HT más MPP<sup>+</sup> mostraron una evidente disminución en el contenido de GSSG, pero únicamente el grupo HT + MPP<sup>+</sup> (0.2697 ± 0.01 µmol/g tejido) y el grupo AceHT + MPP<sup>+</sup> (0.321 ± 0.003 µmol/g tejido) obtuvieron significancia estadística (p= 0.004) en relación al grupo MPP<sup>+</sup> (figura 45).



**Figura 45. Contenido de GSSG por efecto del HT y sus derivados en el modelo MPP<sup>+</sup>.** Los niveles de GSSG son representados como la media ± ES (n=5). \*Estadísticamente diferente del grupo HT, y NO<sub>2</sub>-HT. +Estadísticamente diferente del grupo MPP<sup>+</sup> (p<0.05). ANOVA de una vía seguida de una prueba de Tukey.

**9.12 Efecto del pretratamiento de HT, Ace-HT y NO<sub>2</sub>-HT en la relación GSH/GSSG en el modelo de MPP<sup>+</sup> en rata.** Otro marcador indicativo de estrés oxidativo que se estudio fue la relación entre glutatión reducido y glutatión oxidado GSH/GSSG. Como podemos observar en la figura 46 el grupo MPP<sup>+</sup> presento una disminución significativa ( $p= 0.04$ ) en el cociente GSH/GSSG ( $2.778 \pm 0.46$ , ratio) en comparación con los grupos control HT y NO<sub>2</sub>HT ( $5.506 \pm 0.10$ , ratio;  $5.595 \pm 0.63$ , ratio, respectivamente). Por otro lado, el pretratamiento con HT y NO<sub>2</sub>HT más MPP<sup>+</sup> mostro un incremento significativo ( $p= 0.004$ ) en el cociente GSH/GSSG ( $5.495 \pm 0.42$ , ratio;  $5.849 \pm 0.97$ , ratio, respectivamente) en comparación con el grupo MPP<sup>+</sup>, representado ua recuperación parcial del cociente GSH/GSSG.



**Figura 46. Efecto del HT, AceHT y NO<sub>2</sub>HT en la relación GSH/GSSG en el modelo MPP<sup>+</sup>.** El cociente de GSH y GSSG (GSH/GSSG) son representados como la media  $\pm$  el ES (n=5). \*Estadísticamente diferente del grupo HT, NO<sub>2</sub>HT. +Estadísticamente diferente del grupo MPP<sup>+</sup> ( $p<0.05$ ). ANOVA de una vía seguida de una prueba de Tukey.

## 10. DISCUSIÓN.

En el presente trabajo, se demostró que la administración intravenosa de 1.5 mg/Kg de hidroxitirosol y de sus derivados: acetato de hidroxitirosol y nitrato de hidroxitirosol ejercen un efecto protector en el modelo de estrés oxidante inducido por MPP<sup>+</sup> de la enfermedad de Parkinson en rata. El efecto protector de estos compuestos fenólicos (hidroxitirosol y acetato de hidroxitirosol) en el sistema nervioso central ha sido demostrado en modelos experimentales de stroke (Gonzalez-Corres, 2012) y de la enfermedad de Huntington (Tasset, 2011). Por otro lado, nuestro grupo de investigación demostró que la administración oral de un extracto metanólico de la planta *Buddleja cordata* ejerce un efecto protector y antioxidante en el modelo experimental de MPP<sup>+</sup>, atribuyendo dichos efectos al hidroxitirosol (Pérez-Barrón, 2014). Ya que la administración oral del extracto metanólico permite la formación del hidroxitirosol, a partir de la hidrólisis del verbascósido (principal componente del extracto metanólico, 23%), bajo condiciones de pH ácido y/o por esterasas microbianas en el tejido intestinal (Lankha, 1997). Además, este compuesto fenólico (hidroxitirosol) se encontró presente en muestras de estriado de ratas pretratadas con el extracto metanólico y administradas con MPP<sup>+</sup> (Pérez-Barrón, 2014), poniendo de manifiesto que para ejercer su efecto neuroprotector el hidroxitirosol debe permear el tejido cerebral. Por lo cual, se ha demostrado que el hidroxitirosol es capaz de atravesar la BHE (Gallardo, 2014) y también se ha evidenciado su alta permeabilidad cerebral después de una administración intravenosa de 1.5 mg/Kg de [<sup>14</sup>C]HT (D'Angelo, 2001).

Como primer objetivo de este trabajo, se planteó estudiar el efecto de estos compuestos fenólicos sobre el comportamiento dopaminérgico después del daño inducido por el metabolito neurotóxico MPP<sup>+</sup>. Como ya se mencionó anteriormente, el modelo experimental de la enfermedad de Parkinson inducido por MPP<sup>+</sup> en rata, reproduce algunas de las características fisiológicas y bioquímicas de esta enfermedad, como las rotaciones ipsilaterales inducidas por la administración de apomorfina (Schwarcz, 1979) y la depleción de los niveles de dopamina estriatal (Rubio-Osornio, 2009). El pretratamiento con estos compuestos fenólicos produjo una disminución significativa de las rotaciones ipsilaterales (HT: 70%, Ace-HT: 60%, NO<sub>2</sub>HT: 60%) inducidas por el daño provocado por el metabolito neurotóxico MPP<sup>+</sup>. Dicho efecto protector fue correlacionado con la preservación del 80-90% de los niveles de dopamina estriatal, por efecto del tratamiento con HT y sus derivados (Ace-HT, NO<sub>2</sub>-HT).

Por otro lado, se ha demostrado que el HT es capaz de proteger contra la muerte celular inducida por DA y 6-OHDA en modelos de células dopaminérgicas, sin embargo, el HT no fue capaz de ejercer su efecto protector contra la muerte celular inducida por el metabolito neurotóxico MPP<sup>+</sup> (Han, 2007; Yu, 2016). Sugiriendo que los mecanismos celulares que subyacen la toxicidad inducida en los modelos de DA y 6-OHDA difieren de los mecanismos de toxicidad inducida por MPP<sup>+</sup>. Por lo tanto, este es el primer estudio en evidenciar el efecto protector del HT en un modelo de daño inducido por MPP<sup>+</sup> en rata.

A pesar de que las investigaciones han relacionado el efecto protector del HT principalmente con su propiedad antioxidante (Rodríguez-Gutiérrez, 2012), también se han postulado otros mecanismos de protección, como la inhibición de la MAO, principal enzima encargada de la degradación de la DA. Además, la MAO-B puede promover el proceso de envejecimiento en el cerebro ya sea por bioactivación de neurotoxinas exógenas/endógenas o por un incremento de los niveles del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tóxico. También se ha sugerido que el aumento en la actividad de la MAO-B estriatal es un factor de predisposición o causante en la EP (Cohen, 1986). Existen estudios donde se ha evidenciado el efecto del HT sobre la actividad enzimática de la MAO, Geelings y col. demostraron el efecto inhibitorio del HT sobre la enzima MAO-B en mitocondrias de cerebro de rata (Geelings, 2003). También Goldstein y colab., mostraron que la incubación de HT en células PC12, es capaz de inhibir la degradación enzimática de dopamina por acción de la MAO, además de mitigar el incremento del metabolito citotóxico DOPAL, metabolito intermedio del metabolismo de la DA por la MAO (Goldstein, 2016). Coincidiendo estos hallazgos publicados con los resultados de este trabajo, donde demostramos que la administración intravenosa de HT (1.5 mg/Kg) produjo una significativa disminución en la actividad de la enzima MAO-B (44%) con una CI<sub>50</sub> = 295.3 μM. Además, se evidenció que el pretratamiento con HT inhibe ambas isoformas de la enzima MAO de manera muy similar al L-deprenil (inhibidor irreversible de MAO-B). Sugiriendo claramente, la capacidad protectora del HT sobre la actividad de la enzima MAO cerebral en la neurotoxicidad inducida por MPP<sup>+</sup>.

En este estudio se empleó la técnica de microdiálisis como una herramienta complementaria a las metodologías realizadas, para poder hacer un análisis de la aplicación local a nivel cerebral del HT sin interferencias a nivel sistémico. Sugiriendo que las variaciones en el metabolismo de la DA serían más detectables, y así nos permitiría inferir en el tipo de actividad que podría ejercer el HT sobre el SNC. Por lo que se procedió a evaluar el efecto del HT sobre la liberación extracelular de dopamina por efecto de la

perfusión intraestriatal de MPP<sup>+</sup>. Es importante mencionar que la medida de los niveles extracelulares de DA por la técnica de microdiálisis en este estudio ha sido difícil de realizar, debido a los bajos niveles basales que se obtuvieron en los dializados, resultando difícil la interpretación de los resultados que se obtenían. Además, el hecho de que la DA tiene un tiempo de retención en el cromatograma muy cercano al tiempo de retención del HT, también dificultaba la cuantificación de DA cuando se administraba sistémicamente dicho compuesto.

A pesar de que la cuantificación de la DA y sus metabolitos es una de las ventajas que presenta la microdiálisis, la explicación y discusión de las variaciones de los niveles de los metabolitos resulta difícil de interpretar, ya que la concentración de DOPAC en dializado no refleja del todo los niveles reales, además en dializado la concentración de DOPAC es 100 veces mayor a la de la DA (Arbuthnott, 1990a). De la misma manera, es necesario considerar que la cantidad de DA y sus metabolitos obtenida en los dializados es aquella que se encuentra en el espacio extracelular, por lo tanto, es aquella que se escapa de los diferentes procesos fisiológicos de inactivación como la recaptación, la metabolización y la difusión (Pani, 1990).

Debido a que solo existen estudios de la administración de HT (Gallardo, 2015), o la perfusión intraestriatal de MPP<sup>+</sup> (Santiago, 1990) sobre la liberación extracelular de DA en el cuerpo estriado, y no existen investigaciones experimentales acerca de la administración y perfusión de HT más MPP<sup>+</sup>, se planteo evaluar este objetivo experimental.

Con base a los resultados obtenidos, se observo que la administración intraestriatal y sistémica de HT produjo un incremento significativo en los niveles extracelulares de DA en comparación con los niveles basales, sin embargo, dicho efecto no puede ser atribuido directamente al HT, ya que la administración se realizo en combinación con MPP<sup>+</sup>. Y el incremento en la liberación de los niveles de DA estriatal por efecto de la perfusión del MPP<sup>+</sup>, por un mecanismo de toxicidad neuronal, ya ha sido ampliamente investigada (Johnson, 1989; Rollema, 1988a).

El hecho de que la administración de HT produjera un incremento significativo de los niveles de DA extracelular, y no se haya visto acompañado de un descenso significativo de los niveles del metabolito DOPAC, no se puede decir que no exista una correlación con nuestros estudios donde se demuestra que el HT actúa inhibiendo la enzima MAO. Sugiriendose que el HT podría no estar interviniendo a nivel de la degradación de DA de nueva síntesis, ya que la concentración extracelular de sus metabolitos en este estudio no

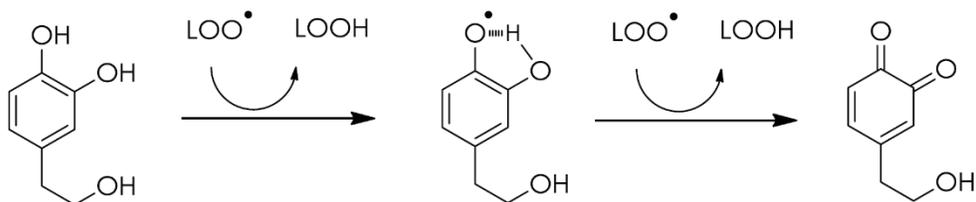
parece ser alterada. Además, se sugiere que el HT podría presentar otros mecanismos, como la inhibición de la recaptura de DA o el incremento de la excitabilidad neuronal (Rivett, 1982; Lamensdorf, 1996; Zhou 2001). Otra hipótesis podría ser que el HT solo inhiba a la MAO neuronal y no a la enzima glial que sería la responsable de la metabolización de la DA que se recupera en la microdiálisis. Además de que, otros autores han indicado que posiblemente, los inhibidores de MAO actúen más sobre la DA recaptada que sobre la DA de nueva síntesis (Butcher, 1990).

Debido a la obtención de estos resultados, en donde los niveles de los metabolitos extracelulares se mantuvieron inalterados, se sugirió que un posible mecanismo para el HT podría ser el bloqueo de la recaptación de DA. Por lo que, en este trabajo se planteó el objetivo de determinar el efecto del HT sobre la recaptación de DA por el transportador de DA (DAT), para lo cual se utilizó un inhibidor selectivo de del transportador de dopamina (GBR-12909). Y se observó que el efecto del HT sobre la recaptura de DA por DAT fue muy reducido, ya que presento menos del 10% de inhibición en la recaptura de DA, aunque con una potencia de inhibición marcada a la concentración de 5 nM, por lo tanto, podemos descartar la teoría del que el HT actúa como un inhibidor de DAT.

Por otra parte, una de las propiedades más descritas para el HT y sus derivados, es su potente actividad antioxidante demostrada en diversos estudios experimentales (Hollman, 2011; Mateos, 2003; Rodriguez-Morató, 2015). Por lo que fue considerado de interés estudiar la capacidad antioxidante de estos compuestos fenólicos en el modelo de estrés oxidativo inducido por MPP<sup>+</sup> en rata. En primer lugar, se determinaron los posibles efectos de los compuestos estudiados en animales sin el daño oxidativo generado por el metabolito MPP<sup>+</sup>, y en estas condiciones ninguno de los compuestos administrados modifico significativamente la peroxidación lipídica (formación de productos fluorescentes) como parámetro representativo de estrés oxidativo. Este comportamiento es coherente con el que presenta la mayoría de los compuestos antioxidantes que ejercen su actividad antioxidante únicamente en situaciones de estrés oxidativo y no muestran ningún efecto en las situaciones de equilibrio bioquímico.

En segundo lugar, se evaluó el efecto antioxidante de los compuestos fenólicos en una situación de inducción química de estrés oxidativo en el cuerpo estriado. La peroxidación lipídica fue inducida por microinyección estriatal del metabolito neurotóxico MPP<sup>+</sup>, mostrando un incremento significativo en la formación de productos lipídicos fluorescentes, debido a la sobreproducción de especies reactivas (Blum, 2001). Sin embargo, el pretratamiento con HT y sus derivados (Ace-HT y NO<sub>2</sub>-HT) en ratas lesionadas

con MPP<sup>+</sup> demostró su potente efecto antioxidante al disminuir significativamente la formación de productos lipídicos fluorescentes en un 70-80%. Estos resultados se correlacionan con la alta actividad antioxidante ampliamente descrita para estos compuestos fenólicos en diversos estudios (Visioli, 1998; Gonzalez-Correa, 2012; Peng, 2015 ). Se ha sugerido, que la estructura orto-difenólica del HT es fundamental para que pueda ejercer su actividad antioxidante (De la Cruz, 2015; Rodríguez-Gutiérrez, 2012; Visioli, 1998), debido a la capacidad de donar electrones de los grupos hidroxilo en la posición orto y la subsecuente formación de puentes hidrógeno intramoleculares estables con el radical fenoxílico (figura 20) (Rodríguez-Gutiérrez, 2012). De esta manera, interrumpiendo la etapa de propagación de los radicales alquilperoxilo formados durante la oxidación lipídica.



**Figura 20.** Mecanismo antioxidante del HT por donación de hidrógeno

Por último, dirigimos nuestro trabajo hacia el análisis del sistema de defensa endógeno glutatión. Donde se evaluó el efecto del HT y sus derivados (AceHT y NO<sub>2</sub>HT) en contra del daño de estrés oxidativo inducido por MPP<sup>+</sup> en el estriado de rata en el contenido de GSH y GSSG, así como en la actividad de GPx. El contenido de GSH, así como de GSSG, son considerados biomarcadores de daño oxidativo intracelular (Bharath, 2002). Como se pudo observar en los resultados de este estudio, la infusión del metabolito neurotóxico MPP<sup>+</sup> mostró una clara disminución en el contenido de GSH. Dicho efecto es inducido por la administración intraestriatal de MPP<sup>+</sup>, provocando una sobreproducción del radical <sup>•</sup>O<sub>2</sub><sup>-</sup> y de la molécula de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por efecto de la inhibición del complejo I mitocondrial con la subsecuente disminución en la síntesis de ATP, lo cual disminuye la actividad de biosíntesis de la GSH sintetasa (Blum, 2000). Sin embargo, el pretratamiento con los compuestos fenólicos fue capaz de incrementar el contenido de GSH en animales dañados con MPP<sup>+</sup>. De la misma manera, la administración del metabolito MPP<sup>+</sup> ocasiono un notable incremento en el contenido de GSSG, que fue claramente disminuido por el pretratamiento

con los compuestos fenólicos, de los cuales solo el HT alcanzó significancia estadística cuando fue comparado con el grupo MPP<sup>+</sup>. Además, el pretratamiento con estos compuestos fenólicos produce una recuperación parcial por el daño inducido por este metabolito neurotóxico, ya que se mostro una recuperación significativa de la relación GSH/GSSG, siendo capaces de contrarrestar el estrés oxidativo generado por el MPP<sup>+</sup>. Por otra parte, aunque la administración de estos compuestos fenólicos produjo un claro incremento en la actividad de GPx, dicho incremento no alcanzó significancia estadística contra el daño inducido por MPP<sup>+</sup>. Sin embargo, nuestros resultados son consistentes con otros estudios experimentales *in vitro*, donde se demuestra que el HT ejerce una protección indirecta en el organismo a través del incremento (GPx y GSH) y disminución (GSSG) de sistemas antioxidantes endógenos (Martín, 2009; de la Cruz, 2015; Peng, 2015).

Por otra parte, a pesar de que existen estudios que demuestran que los derivados esteres (AceHT) (Trujillo, 2006; Lorenz, 2006; Pereira-Caro, 2009) y derivados nitrocatecoles (NO<sub>2</sub>HT) presentan actividades mejoradas respecto al propio HT libre, siendo en la mayoría de los casos, más liposolubles o incrementando su actividad antioxidante (Gallardo, 2016), y por el lado contrario se ha demostrado que el HT posee una mejor actividad neuroprotectora que sus derivados nitrocatecoles (NO<sub>2</sub>HT) en un modelo de infarto cerebral *in vitro* (Gallardo, 2015), es importante mencionar que en nuestro estudio no se encontró ninguna diferencia significativa en la actividad protectora y antioxidante entre los diferentes tratamientos con HT y sus derivados: AceHT y NO<sub>2</sub>HT.

En términos generales, este es el primer estudio que demuestra el efecto protector y antioxidante del HT y sus derivados: AceHT y NO<sub>2</sub>HT en el modelo de estrés oxidativo inducido por MPP<sup>+</sup> de la enfermedad de Parkinson en rata. Sugiriendo claramente, la capacidad protectora del HT sobre la actividad de la enzima MAO cerebral en la neurotoxicidad inducida por MPP<sup>+</sup>. Sin descartar que esto compuestos fenólicos podrían estar participando por diferentes vías implicadas en el daño cerebral generado en el modelo de MPP<sup>+</sup>.

## 11. CONCLUSIONES.

1. Los resultados de este trabajo demuestran el efecto protector del HT y sus derivados, AceHT y NO<sub>2</sub>HT, ya que el pretratamiento con dichos compuestos disminuyó el número de rotaciones ipsilaterales inducidas por el daño generado por el metabolito MPP<sup>+</sup>.
2. Dicho efecto protector fue corroborado con la preservación de los niveles de dopamina estriatal de animales lesionados con MPP<sup>+</sup> y pretratados con HT, AceHT y NO<sub>2</sub>HT.
3. Se demostró que el HT es un potente inhibidor de las isoformas de la enzima MAO, por lo que se propone como un mecanismo neuroprotector potencial contra la neurotoxicidad producida por MPP<sup>+</sup>, así como su posible uso en el tratamiento farmacológico de la EP.
4. Dicho efecto neuroprotector se debe a la alta permeabilidad cerebral del HT demostrada después de su administración intravenosa (Do= 1.5 mg/Kg) empleando la técnica de microdiálisis cerebral.
5. La administración de HT, AceHT y NO<sub>2</sub>HT reduce el daño oxidativo inducido por MPP<sup>+</sup> al modificar positivamente la relación GSH/GSSG y la disminución en la formación de productos lipídicos.

## 12. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:

- Arbuthnott G, Fairbrother I, Butcher S. Dopamine release and metabolism in the rat striatum: An analysis by *in vivo* brainmicrodialysis. *Pharmacol Ther.* 1990a;48(3):281-93.
- Adams RN, Murrill E, McCreery R, et al. 6-Hidroxydopamine, a new oxidation mechanism. *Eur J Pharmacol.* 1972. 17, 287-292.
- Adams JD, Klaidan LK, Leung AC. MPP<sup>+</sup> and MPDP<sup>+</sup> induced oxygen radical formation with mitochondrial enzymes. *Free Rad Biol Med.* 1993. 15, 181-186.
- Adam-Vizi V. Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources. *Antioxid Redox Signal.* 2005. 7, 9-10. Review.
- Aeschbach R, Loliger J, Scott BC, Murcia A, Butler J, Halliwell B, Aruoma OI. Antioxidant action of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone, and hydroxytyrosol. *Food. Chem. Toxic.* 1994. 32: 31–36.
- Agid Y, Javoy-Agid F y Ruberg M. Biochemistry of neurotransmitters in Parkinson´s disease, in *Movement Disorders 2* (Marsden C. D. And Fahn S., eds.). 1987. 166-230. Butterworths, London.
- Ahlskog JE, Muentner MD. Frequency of levodopa-related dyskinesias and motor fluctuations as estimated from the cumulative literature. *Mov. Disord.* 2001. 16, 448–458.
- Alcudia F, Cert A, Espartero JL., Mateos R, Trujillo M. Method of preparing hydroxytyrosol esters, esters thus obtained and use of same. PCT WO 2004/005237, 2004.
- Alexander SPH, Mathie A, Peters JA. Guide to receptors and channels. 5th ed. *Br J Pharmacol.* 2011. 164 Suppl 1:44.
- Aluf Y, Vaya J, Khatib S, Loboda Y, Finberg JP. Selective inhibition of monoamine oxidase A or B reduces striatal oxidative stress in rats with partial depletion of the nigro-striatal dopaminergic pathway. *Neuropharmacology.* 2013. 65:48-57.
- Attwell D, Mobbs P. Neurotranmitter transporters. *Curr Opin Neurobiol.* 1994. 4, 353-9.

- Bahena-Trujillo R, Flores G and Arias-Montaña J. Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central. *Rev Biomed.* 2000. 11, 39-60.
- Baldioli M, Servili M, Perretti G, Montedoro G.F. Antioxidant activity of tocopherol and phenolic compounds of virginolive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1996. 73, 1589-1593.
- Baraldi PG, Simoni D, Manfredini S, Menziani E. Preparation of 3,4-dihydroxybenzeneethanol: A reinvestigation. *Liebigs Ann. Chem.* 1983. 684-686.
- Beal MF. Metabolic disorders and neurotoxicology. *Curr Opin Neurol.* 1995. 6, 467-8.
- Beal MF. Energetics in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci.* 2000. 7, 298-304. Review
- Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci.* 1990. 4, 1620-4.
- Belluzzi E, Bisaglia M, Lazzarini E, Tabares LC, Beltramini M, Bubacco L. Human SOD2 modification by dopamine quinones affects enzymatic activity by promoting its aggregation: possible implications for Parkinson's disease. *PLoS One.* 2012.
- Bernini R, Gilardini M, Maria S, Merendino N, Romani A, Velotti F. Hydroxytyrosol-Derived Compounds: A Basis for the Creation of New Pharmacological Agents for Cancer Prevention and Therapy. *J. Med. Chem.* 2015. 58, 9089–9107.
- Bertrán-González J, Hervé D, Girault JA, Valjent E. What is the degree of segregation between striatonigral and striatopallidal projections? *Front Neuroanat.* 2010. 4, 136.
- Ben-Shachar D, Riederer P, Youdim MBH. Iron-melanin interaction and lipid peroxidation: implications for Parkinson's disease. *J Neurochem.* 1991b. 57, 1609-1614.
- Bharath S, Hsu M, Kaur D, Rajagopalan S and Andersen JK. Glutathione, iron and Parkinson's disease. 2002. *Biochem Pharmacol* 64:1037-1048.
- Bisignano G, Tomaino A, Lo Cascio R, Crisafi G, Uccella N, Saija A. On the in vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *J. Pharm. Pharmacol.* 1999. 51, 971-974.

- Blum D, Torch S, Lambeng N, Nissou M, Benabid A, Sadoul R, y Verna M. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog in Neurobiolo*. 2001. 65, 135-172.
- Boll MC, Alcaraz-Zubeldia M, Montes S, Rios C. Free copper, ferroxidase and SOD1 activities, lipid peroxidation and NO(x) content in the CSF. A different marker profile in four neurodegenerative diseases. *Neurochem Res*. 2008. 9, 1717-23.
- Boll MC, Alcaraz-Zubeldia M and Rios C. Medical management of Parkinson's disease: focus on neuroprotection. *Curr Neuropharmacol*. 2011. 2, 350-359.
- Bonifacio MJ, Palma P, Almeida L, Soares-da-Silva P. Catechol-O-methyltransferase and its inhibitors in Parkinson's disease. *CNS Drugs*. 2007. 13, 352-379.
- Braak H, Del Tredici K and Rub U. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 2003. 24, 197-211.
- Buisman GJH, Helteren CTW, Kramer GFH, Veldsink JW, Derksen JTP, Cuperus FP. Enzymatic esterifications of functionalized phenols for the synthesis of lipophilic antioxidants. *Biotechnol. Lett*. 1998. 20, 131-136.
- Butcher SP, Fairbrother IS, Kelly JS, Arbuthnott GW. Effects of selective monoamine oxidase inhibitors on the in vivo release and metabolism of dopamine in the rat striatum. *J Neurochem*. 1990. 3, 981-8.
- Calabrese V, Scapagnini G, Giuffrida S, Bates and Clark J. Mitochondrial involvement in brain function and dysfunction: Relevance to aging, neurodegenerative disorders and longevity. *Neurochem Res*. 2001. 26, 739-764.
- Carluccio MA, Siculella L, Ancora MA, Massaro M, Scoditti E, Storelli C, Visioli F and Distante A. Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2003. 23, 622-629.
- Castrejón SM. Radicales libres y sistemas antioxidantes. En: Bioquímica: un enfoque básico aplicado a las ciencias de la vida. Editores: Diaz-Zagoya JC, Juárez-Oropeza MA. McGraw-Hill Interamericana, México. 2007. 611-628.
- Caudle WM, Richardson JR, Wang MZ, Taylor TN, Guillot TS, McCormack AL, Colebrooke RE, Di Monte DA, Emson PC, Miller GW. Reduced vesicular storage of

dopamine causes progressive nigrostriatal neurodegeneration. *J Neurosci.* 2007. 30), 8138-48.

- Chavez-León E, Ontiveros-Uribe M and Carrillo-Ruiz J. La enfermedad de Parkinson: neurología para psiquiatras. *Salud Mental.* 2013. 36, 315-324.
- Chiba K, Trevor A, Catagnoli N. Metabolism of the neurotoxic tertiary amine, MPTP, by brain monoamine oxidase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984. 120, 574-578.
- Chiba K, Trevor A, Catagnoli N. Active uptake of MPP<sup>+</sup>, a metabolite of MPTP, by brain synaptosomes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1985. 128, 1228-1232.
- Chimi H, Cillard J, Cillard P, Rahmani M. Peroxyl radical scavenging activity of some natural phenolic antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1991, 68, 307–312.
- Clarke C. Neuroprotection and pharmacotherapy for motor symptoms in Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 2004. 3, 466-74.
- Cohen G, Heikkila RE. The generation of hydrogen peroxide, superoxide radical, and hydroxyl radical by 6-hydroxydopamine, dialuric acid, and related cytotoxic agents. *J Biol Chem* 1974. 249, 2447-2452.
- Cohen G. Monoamine oxidase, hydrogen peroxide, and Parkinson's disease. *Advances in Neurology: Parkinson's disease.* 1986. 45, 119-125. Raven Press, New York.
- Cooper JR, Bloom FE, Roth RH. The biochemical basis of neuropharmacology. 7th Ed. New York/Oxford, Oxford University Press. 1996. 293-351.
- Copeland ES, Campbell IC, Murphy DL. *Biochim Biophys Acta.* 1983. 743, 186-194.
- Cumming P, Brown E, Damsma G, Fibiger H. Formation and clearance of interstitial metabolites of dopamine and serotonin in the rat striatum: An *in vivo* microdialysis study. *J Neurochem.* 1992. 59(5):1905-14.
- Davis G, Williams A, Markey S, Ebert M, Caine E, Reichert C. y Kopin I. Chronic parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psych Res.* 1979. 1, 249-254.
- D'Amato RJ, Lipman ZP, Synder SH. Selectivity of the parkinsonian neurotoxin MPTP: toxic metabolite MPP<sup>+</sup> binds to neuromelanin. *Science.* 1986. 231, 987-989.
- D'Angelo S, Manna C, Migliardi V, Mazzoni O, Morrica P and Capasso, G. Pharmacokinetics and metabolism of hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive

oil. *Drug Metab. Dispos.* 2001. 29: 1492–1498.

- De Bock M, Derraik JG, Brennan CM, Biggs JB and Morgan PE. Olive (*Olea europaea* L.) leaf polyphenols improve insulin sensitivity in middle-aged overweight men: a randomized, placebo-controlled, crossover trial. *PLOS One.* 2013. 8, e57622–e57630.
- De la Torre-Carbot K, Chávez-Servin JL, Jauregui O, Castellote AI, Lamuela-Raventos RM and Fito M. Presence of virgin olive oil phenolic metabolites in human low density lipoprotein fraction: determination by high-performance liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta.* 2007. 583: 402–410.
- De la Puerta R, Ruíz-Gutiérrez V, Hoult J.R.S. Inhibition of Leukocyte 5-lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil. *Biochem. Pharmacol.* 1999. 57, 445-449.
- DeLong M y Wichmann T. Circuits and circuit disorders of the basal ganglia. *Arch Neurol.* 2007. 64, 20-24.
- Desole MS, Esposito G, Fresu L, Migheli R. Correlation between 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP<sup>+</sup>) levels, ascorbic acid oxidation and glutathione levels in the striatal synaptosomes of the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)- treated rat. *Neurosci Lett.* 1993. 161, 121-123.
- Dexter D, Carayon A, Javoy-Agid F, Wells F, Daniel S, Lees A, Jenner P. and Marsden C. Alterations in the levels of iron, ferritin and other trace metals in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia. *Brain.* 1991. 114, 1953-1975.
- Dexter D and Jenner P, Review: Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. *Free radical biology and medicine.* 2013. 62, 132-144.
- Di Monte D, Jewell SA, Ekstrom G. 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP<sup>+</sup>) cause rapid ATP depletion in isolated hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1986. 137, 310-315.
- Dringen R, Gutterer JM, Hirrlinger J. Glutathione metabolism in brain, metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *Eur J Biochem.* 2000. 267, 4912-4916.
- Enochs WS, Sarna T, Zecca L, Riley PA, Swartz HM. The roles of neuromelanin, binding of metal ions, and oxidative cytotoxicity in the pathogenesis of Parkinson's disease: a hypothesis. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect.* 1994. 2, 83-100.

- Fahn S. and Cohen G. The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease. Evidence supporting it. *Ann. Neurol.* 1992. 32, 804- 812.
- Fahn S and Przedborski S. Parkinsonism. In: *Merrit's Neurology* (Rowland L.P., ed). Lippincott Williams & Wilkins, New York. 679-693.
- Farooqui T, Farooqui AA. Lipid-Mediated Oxidative Stress and Inflammation in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Parkinsons Dis.* 2011. doi:10.4061/2011/247467.
- Feldman RS, Meyer JS, Quenzer LF. Principles of neuropsychopharmacology. Sunderland, Sinauer. 1997. 277-344.
- Fernández-Mar MI, Mateos R, García-Parrilla MC, Puertas B and Cantos-Villar E. Bioactive compounds in wine: resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: A review. *Food Chem.* 2012. 130, 797– 813.
- Furneri PM, Piperno A, Sajia A. and Bisignano G. Antimycoplasmal activity of hydroxytyrosol. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004. 48, 4892–4894.
- Fuxe K. Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. IV. Distribution of monoamine nerve terminals in the central nervous system. *Acta Physiol Scand.* 1965. 64, 37-85.
- Gallardo E, Palma-Valdés R, Espartero JL. and Santiago, M. *In vivo* striatal measurement of hydroxytyrosol, and its metabolite (homovanillic alcohol), compared with its derivative nitrohydroxytyrosol. *Neurosci. Lett.* In press; 2014.
- Gallardo E, Madrona A, Palma-Valdés R, Trujillo M, Espartero J.L, Santiago M. The effect of hydroxytyrosol and its nitroderivatives on catechol-O-methyl transferase activity in rat striatal tissue. *RSC Adv.* 2014. 4, 61086–61091.
- Gallardo E, Madrona A, Palma-Valdés R, Espartero J.L, Santiago M. Effect of intracerebral hydroxytyrosol and its nitroderivatives on striatal dopamine metabolism: A study by in vivo microdialysis. *Life Sci.* 2015. 134, 30–35.
- Gallardo E, Palma-Valdés R, Sarriá B, Gallardo I, Mateos R, Espartero J.L. Synthesis and Antioxidant Activity of Alkyl Nitroderivatives of Hydroxytyrosol. *Molecules.* 2016, 21, 656.
- Garthwaite, J. and Boulton, C. Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu Rev Physiol.* 1995. 57, 683-706.

- Geellings A, López-Huerta EL, Morales JC, Boza J and Jiménez J. Natural products and derivatives thereof for protection against neurodegenerative diseases. United States Patent Application Publication 2003; US 2003/0236202 A1.
- Gerfen CR, Surmeier DJ. Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Annu Rev Neurosci.* 2011. 34, 441-66.
- Gerlach M, Ben-Shachar D, Riederer P and Youdim MB. Altered brain metabolism of iron as a cause of neurodegenerative diseases? *J Neurochem.* 1994. 63, 1609-1623.
- Glover V, Sandler M, Owen F and Riley G. Dopamine is a monoamine oxidase B substrate in man. *Nature.* 1977. 265, 80-81.
- Glover V, Elsworth JD, Sandler M. Dopamine oxidation and its inhibition by (-)-deprenyl in man. *J Neural Transm Suppl.* 1980; 16:163-72.
- Glowinski J, and Iversen L. Regional studies of catecholamines in the rat brain. Disposition of 3H-norepinephrine, 3H-dopamine and 3HDOPA in various regions of the brain. *J Neurochem.* 1966. 13, 655-669.
- Goetz CG. Charcot on Parkinson's disease. *Mov Disord.* 1986. 1, 27-32.
- Goldstein D, Jinsmaa Y, Sullivan P, Holmes C, Kopin I, Sharabi Y. 3,4-Dihydroxyphenylethanol (Hydroxytyrosol) mitigates the increase in spontaneous oxidation of dopamine during monoamine oxidase inhibition in PC12 cells. 2016. *Neurochem Res.* 41, 2173-2178.
- Gómez-Chavarín M, Roldan-Roldan G, Morales-Espinosa G and Pérez-Soto G. Mecanismos fisiopatológicos involucrados en la enfermedad de Parkinson. *Arch. Neurocién (Mex).* 2012. 17, 25-33.
- González-Correa JA, Navas MD, López-Villodres J, Trujillo M, Espartero JL and De La Cruz JP. Neuroprotective effect of hydroxytyrosol and hydroxytyrosol acetate in rat brain slices subjected to hypoxia-reoxygenation. *Neulet.* 2008. 446, 143-146.
- Gordin A, Kaakkola S, Teravainen H. Clinical advantages of COMT inhibition with entacapone—A review. *J. Neural Transm.* 2004. 111, 1343–1363.
- Gordon MH, Paiva-Martins F, Almeida M. Antioxidant activity of hydroxytyrosol acetate compared with that of other olive oil polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* 2001. 49, 2480-2485.

- Goya L, Mateos R, Bravo L. Effect of the olive oil phenol hydroxytyrosol on human hepatoma HepG2 cells. Protection against oxidative stress induced by tert-butylhydroperoxide. *Eur. J. Nutr.* 2007. 46, 70–78.
- Graham DG. Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones. *Mol Pharmacol.* 1978. 14, 633-643.
- Granger DL, Lehninger AL. Sites of inhibition of mitochondrial electron transport in macrophage-injured neoplastic cells. *J Cell Biol.* 1982. 1, 527-35.
- Grasso S, Siracusa L, Spataforma C, Renis M, Tringali C. Hydroxytyrosol lipophilic analogues: Enzymatic synthesis, radical scavenging activity and DNA oxidative damage protection. *Bioorg. Chem.* 2007. 35:137-152.
- Hafeman D, Sunde R, and Hoekstra. Effect of dietary selenium on erythrocyte and liver glutathione peroxidase in the rat. *J. Nutr.* 1974. 104, 580-587.
- Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem.* 2006. 97, 1634-1658.
- Hantraye P. Modeling dopamine system dysfunction in experimental animals. *Nucl Med Biol.* 1998. 25, 721-728.
- Heikkila R, Cabat F, Manzano L. y Duvoisin R. Effects of 1-methyl-4-phenyl 1,2,3,6-tetrahydropyridine on neostriatal dopamine in mice. *Neuropharmacology.* 1984. 23, 711-713.
- Han J, Talorete TP, Yamada P and Isoda H. Anti-proliferative and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells. *Cytotechnology.* 2009. 59, 45–53.
- Han JM, Lee YJ, Lee SY, Kim EM, Moon Y, Kim HW, Hwang O. Protective effect of sulforaphane against dopaminergic cell death. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2006. 321, 249-256.
- Harman D. The biologic clock: the mitochondria? *J Am Geriatr Soc.* 1972. 4,145-7.
- Hashimoto T, Ibi M, Matsuno K, Nakashima S, Tanigawa T, Yoshikawa T and Yabe-Nishimura C. An endogenous metabolite of dopamine, 3,4-dihydroxyphenylethanol, acts as a unique cytoprotective agent against oxidative stress-induced injury. *Free Radic. Biol. Med.* 2004. 36: 555–564.

- Heales SJ, Lam AA, Duncan AJ, Land JM. Neurodegeneration or neuroprotection: the pivotal role of astrocytes. *Neurochem Res.* 2004. 29,513-519.
- Heo JY, Park JH, Kim SJ, Seo KS, Han JS, Lee SH, Kim JM, Park JI, Park SK, Lim K. DJ-1 null dopaminergic neuronal cells exhibit defects in mitochondrial function and structure: involvement of mitochondrial complex I assembly. *PLoS One.* 2012. 3, e32629.
- Hirsch EC, Brandel JP, Galle P, Javoy-Agid F and Agid Y. Iron and aluminium increase in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease: an x-ray microanalysis. *J Neurochem.* 1991. 56, 446-451.
- Hitzema N, Rafii F. *Am Fam Physician.* 2009. 1, 28-30.
- Hu T, He XW, Jiang JG and Xu XL. Hydroxytyrosol and its potential therapeutic effects. *J Agric Food Chem.* 2014. 19, 1449-55.
- Hung HC and Lee EH. MPTP produces differential oxidative stress and antioxidative responses in the nigrostriatal and mesolimbic dopaminergic pathways. *Free Radic Biol Med.* 1998. 24, 76-84.
- Hunot S, Boissiere F, Faucheux B, Brugg B, Mouatt-Prigent A, Agid Y and Hirsch E. Nitric oxide synthase and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Neuroscience.* 1996. 72, 355-63.
- Jackson DM, Westlind-Danielsson A. Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioral aspects. *Pharmacol Ther.* 1994. 64, 291-369.
- Jain L, Benko R, Safranek S. Clinical inquiry. Which drugs work best for early Parkinson's disease? *J Fam Pract.* 2012. 2, 106-8.
- Jemai H, Bouaziz M, Fki I, El Feki A and Sayadi S. Hypolipidemic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from Chemlali olive leaves. *Chem. Biol. Interact.* 2008. 176, 88-98.
- Jenner P. The MPTP-treated primate as a model of motor complications in PD: primate model of motor complications. *Neurology.* 2003. 61, S4-11.
- Jossan SS, Gillberg PG, Gottfries CG, Karlsson I, Oreland L. Monoamine oxidase B in brains from patients with Alzheimer's disease: a biochemical and autoradiographical study. *Neuroscience.* 1991. 1, 1-12.

- Kaufman S. The enzymology of the aromatic amino acid hydrolase. En: Kaufman S ed. *Amino acids in health and disease: new perspectives*. New York: Alan R. Liss. 1987. 205-232.
- Kavya R., Saluja R., Singh S. And Dikshit M. Nitric oxide synthase regulation and diversity: Implications in Parkinson's disease. *Nitric Oxide*. 2006. 15, 280-294.
- Kopin IJ and Markey SP. MPTP toxicity: implication for research in Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci*. 1988. 11, 81-96.
- Kohyama N, Nagata T, Fujimoto S.I, Sekiya K. Inhibition of arachidonate lipoxygenase activities by 2-(3,4-dihydroxyphenyl) ethanol, a phenolic compound from olives. *Biosci., Biotechnol., Biochem*. 1997. 61, 347-350.
- Kumar H. The role of free radicals in the aging brain and Parkinson's disease: convergence and parallelism. *Int J Mol Sci*. 2012. 13, 10478-10504.
- Kupsch A, Gerlach M, Puppeter SC. Pretreatment with nimodipine prevents MPTP-induced neurotoxicity at the nigral, but not at the striatal level in mice. *Neuroreport*. 1995. 6, 621-625.
- Kurkowska-Jastrzebska I, Wronska A, Kohutnicka M. The inflammatory reaction following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine intoxication in mouse. *Exp Neurol*. 1999. 156, 50-61.
- Lamensdorf I, Youdim MB, Finberg JP. Effect of Long-Term treatment with selective monoamine oxidase A and B inhibitors on dopamine release from rat striatum *in vivo*. *J Neurochem*. 1996. 67(4):1532-9.
- Lang AE and Lozano AM. Parkinson's disease. First of two parts. *N Engl J Med*. 1998. 15, 1044-53.
- Lang AE and Lozano AM. Parkinson's disease. Second of two parts. *N Engl J Med*. 1998. 16, 1130-43.
- Langston J, Ballard P, Tetrud J. e Irwin L. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine analog synthesis. *Science*. 1983. 219, 979-980.
- Lankha PK and Lonsane BK. Production and application of tannin acyl hydrolase. State of the art. *Adv. Appl. Microbiol*. 1997. 44: 215–60.
- Leentjens AF. The role of dopamine agonists in the treatment of depression in patients with Parkinson's disease: a systematic review. *Drugs*. 2011. 3, 273-86.

- Lerner AJ, Riley D. Neuropsychiatric aspects of dementias associated with motor dysfunction. En: Yudofsky SC, Hales RE (eds). The American psychiatric publishing textbook of neuropsychiatry and behavioral sciences. Quinta edición. Arlington: APPI; 2008.
- Levitt M, Spctor S, Sjoerdsma A, Udenfriend S. Elucidation of the rate-limiting step in norepinephrine biosynthesis in the perfused guinea-pig heart. *J Pharmacol Exp Ther.* 1965. 23, 1493-501.
- Lorenz P. Use of 1-arylisochroman derivatives as cell proliferation inhibitors for the treatment of cancer. *Ger.* 2006. 17 pp., DE 102006005221.
- Madrona A, Pereira-Caro G, Mateos R, Rodríguez G, Trujillo M, Fernández-Bolaños J, Espartero J.L. Synthesis of hydroxytyrosyl alkyl ethers from olive oil waste waters. *Molecules.* 2009. 14, 1762–1772.
- Malaspina D, Corcoran C, Schobel S and Hamilton SP. Epidemiological and genetic aspects of neuropsychiatric disorders. En: Yudofsky SC, Hales RE (eds). The American psychiatric publishing textbook of neuropsychiatry and behavioral sciences. Quinta edición. Arlington: APPI; 2008.
- Mann JJ, Stanley M. Postmortem monoamine oxidase enzyme kinetics in the frontal cortex of suicide victims and controls. *Acta Psychiatr Scand.* 1984. 2, 135-9.
- Marsh L and Margolis RL. Neuropsychiatric aspects of movement disorders. En: Kaplan, Sadock's (eds.). Comprehensive textbook of psychiatry. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2009. 481-493.
- Martín MA, Ramos S, Granado-Serrano AB, Rodríguez-Ramiro I, Trujillo M, Bravo L and Goya L. Hydroxytyrosol induces antioxidant/detoxifiant enzymes and Nrf2 translocation via extracellular regulated kinases and phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B pathways in HepG2 cells. *Mol. Nutr. Food Res.* 2010. 54, 956–966.
- Martin HL, Teismann P. Glutathione: a review on its role and significance in Parkinson's disease. *FASEB J.* 2009. 23, 3263-3272.
- Martínez-Sámano J, Torres-Durán PV, Juárez-Oropeza MA. El glutatión y su asociación con las enfermedades neurodegenerativas, la esquizofrenia, el envejecimiento y la isquemia cerebral. *REB.* 2011. 2, 56-67.

- Mateos R, Domínguez M.M, Espartero J.L., Cert, A. Antioxidant effect of phenolic compounds, R-tocopherol, and other minor components in virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem.* 2003. 51, 7170-7175.
- McGeer PL, Itagaki S, McGeer EG. Expression of the histocompatibility glycoprotein HLA-DR in neurological disease. *Acta Neuropathol.* 1988. 76. 550-557.
- McNaught KS, Jenner P. Dysfunction of rat forebrain astrocytes in culture alters cytokine and neurotrophic factor release. *Neurosci Lett.* 2000. 285, 61-65.
- Miyasaki JM, Martin W, Suchowersky O, Weiner WJ, Lang AE. Practice parameter: initiation of treatment for Parkinson's disease: an evidence-based review: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology.* 2002. 1,11-7.
- Morinan A, Garrat HM. An improved fluorometric assay for brain monoamine oxidase. *J. Pharmacol. Methods.* 1985. 13, 213–223.
- Mochizuki H, Imai H, Endo K. Iron accumulation in the substantia nigra of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced hemiparkinsonian monkeys. *Neurosci Lett.* 1994b. 168, 251-253.
- Nagatsu T, Levitt M and Underfriend S. Tyrosine hydroxylase: the initial step in norepinephrine biosynthesis. *J Biol Chem.* 1964. 239, 2910-7.
- Nagatsu T. Biopterin cofactor and regulation of monoamine-synthesizing mono-oxygenase. *Trends Pharmacol Sci.* 1981. 2, 277-9.
- Nicklas WJ, Vyas I, Heikkila RE. Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-pyridine, a metabolite of the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *Liffe Sci.* 1985. 36, 2503-2508.
- Oertel WH. Recent advances in treating Parkinson's disease. *F1000Res.* 2017. 6:260. doi: 10.12688/f1000research.10100.1.
- Olanow CW. A radical hypothesis for neurodegeneration. *Trends Neurosci.* 1993. 11, 439-44. Review
- Oreland L, Arai Y, Stenstrom A, Fowler CJ. Monoamine oxidase activity and localization in the brain and the activity in relation to psychiatric disorders. *Mod Probl Pharmacopsychiatry.* 1983. 19, 246-54.

- Oishi T, Hasegawa E, Murai Y. Sulfhydryl drugs reduce neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the mouse. *J Neural Transm. Park Dis Dement Sect.* 1993. 6, 45-52.
- Pani L, Gessa GL, Carboni S, Portas CM, Rossetti ZL. Brain dialysis and dopamine: Does the extracellular concentration of dopaminerefect synaptic release? *Eur J Pharmacol.* 1990. 180(1):85-90.
- Parker WD Jr, Parks JK, Swerdlow RH. Complex I deficiency in Parkinson's disease frontal cortex. *Brain Res.* 2008. 1189, 215-8.
- Parkinson J. An essay on the shaking palsy. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 2002. 14, 223-236.
- Paxinos G, and Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. New York: Acad Press.1998.
- Pennathur S, Jackson-Lewis V, Przedborski S. Mass spectrometric quantification of 3-nitrotyrosine, *ortho*-tyrosine, and *o-o'*-dityrosine in brain tissue of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mice, a model of oxidative stress in Parkinson's disease. *J Biol Chem.* 1999. 274, 34621-34628.
- Pereira-Caro G, Madrona A, Bravo L, Espartero JL, Alcudia F, Cert A, Mateos R. Antioxidant activity evaluation of alkyl hydroxytyrosyl ethers, a new class of hydroxytyrosol derivatives. *Food Chem.* 2009. 115:86-91.
- Petroni A, Blasevich M, Salami M, Papini N, Montedoro GF and Galli C. Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic components of olive oil. *Thromb. Res.* 1995. 78, 151–160.
- Pinto J, Paiva-Martins F, Corona G, Debnam ES, Oruna- Concha, MJ. Absorption and metabolism of olive oil secoiridoids in the small intestine. *Br. J. Nutr.* 2011. 105, 1607–1618.
- Przedborski S, Jackson-Lewis V. Mechanisms of MPTP toxicity. *Mov Disord.* 1998. 13, 35-8.
- Ramsay RR and Singer TP. Energy-dependent uptake of *N*-methyl-4-phenylpyridinium, the neurotoxic metabolite of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, by mitochondria. *J Biol Chem.* 1986. 261, 7585-7587.

- Ramsden DB, Parsons RB, Ho SL, Waring RH. The aetiology of idiopathic Parkinson's disease. *Mol Pathol*. 2001. 6, 369-80. Review.
- Reith ME, Xu C, Chen NH. Pharmacology and regulation of the neuronal dopamine transporter. *Eur J Pharmacol*. 1997. 324, 1-10.
- Riederer P and Jellinger K. Neurochemical insights into monoamine oxidase inhibitors, with special reference to deprenyl (selegiline). *Acta Neurol. Scand. Suppl*. 1983. 95, 43-55.
- Rios C and Tapia R. Changes in lipid peroxidation induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and 1-methyl-4-phenylpyridinium in mouse brain homogenates. *Neurosci Lett*. 1987. 77, 321-326.
- Rivett AJ, Eddy BJ, Roth JA. Contribution of sulfate conjugation, deamination, and O-Methylation to metabolism of dopamine and norepinephrine in human brain. *J Neurochem*. 1982. 39(4):1009-16.
- Robbins-Trevor W. Milestones in dopamine research. *Semin Neurosci*. 1992. 4, 93-97.
- Rodríguez-Morató J, Xicota L, Fitó M, Farré M, Dierssen M, de la Torre R. Potential role of olive oil phenolic compounds in the prevention of neurodegenerative diseases. *Molecules*. 2015. 20, 4655–4680.
- Rodríguez-Oroz MC, Jahanshahi M, Krack P. Initial clinical manifestations of Parkinson's disease: features and pathophysiological mechanisms. *Lancet Neurol*. 2009. 8, 1128-1139.
- Rubio-Osornio M, Montes S, Pérez-Severiano F, Aguilera P, Floriano-Sánchez E, Monroy-Noyola A, Rubio C, Ríos C. Copper reduces striatal protein nitration and tyrosine hydroxylase inactivation induced by MPP+ in rats. *Neurochem Int*. 2009. 7, 447-51.
- Santiago LD, Rivas AS. Estrés oxidativo, metabolitos oxidados de dopamina y enfermedad de Parkinson. *Rev Fac Med UNAM*. 2008. 51, 1104-107.
- Santiago M, Westerink BHC. Characterization of the in vivo release of dopamine as recorded by different types of intracerebral micro-dialysis probes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 1990. 342, 407–14.

- Schaffer S, Muller WE and Eckert GP. Cytoprotective effects of olive mill wastewater extract and its main constituent hydroxytyrosol in PC12 cells. *Pharmacol. Res.* 2010. 62: 322–327.
- Schapira A, Cooper J, Dexter D y Marsden C. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 1990; 54:823-827.
- Schnaitman C, Erwin VG, Greenawalt JW. *J Cell Biol.* 1967. 32, 719-735.
- Schwarcz R, Fuxe K, Agnati LF, Hokfelt T, Coyle JT. Rotational behaviour in rats with unilateral striatal kainic acid lesions: a behavioural model for studies on intact dopamine receptors. *Brain Res.* 1979. 170, 485--495.
- Sherer TB, Betarbet R and Greenamyre JT. Pathogenesis of Parkinson's disease. *Curr Opin Invest Drugs.* 2001. 2, 657-62.
- Schulz JB, Matthews RT, Muqit MM. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase by 7-nitroindazole protects against MPTP-induced neurotoxicity in mice. *J Neurochem.* 1995. 64, 936-939.
- Simonyi A, Wang RL, Miller M, Yusof PB, Shelat AY, Sun GY. Polyphenols in cerebral ischemia: novel targets for neuroprotection. *Mol. Neurobiol.* 2005. 31: 135-147.
- Sofic E, Rieder P, Heinsen H, Beckmann H, Reynolds GP. Increased iron(III) and total iron content in post mortem substantia nigra of parkinsonian brain. *J Neural Transm.* 1988. 74, 199-205.
- Spina MB, Cohen G. Exposure of striatal synaptosomes to L-dopa increases levels of oxidized glutathione. *J Pharmacol Exp Ther.* 1988. 247, 502-507.
- Stocchi F, Rascol O, Kieburtz K, Poewe W, Jankovic J, Tolosa E, Barone P, Lang AE, Olanow CW. Initiating levodopa/carbidopa therapy with and without entacapone in early Parkinson disease: the STRIDE-PD study. *Ann Neurol.* 2010. 1, 18-27.
- Storey E, Hyman BT, Jenkins B. 1-Methyl-4-phenylpyridinium produces excitotoxic lesions in rat striatum as a result of impairment of oxidative metabolism. *J Neurochem.* 1992. 58, 1975-1978.
- Surmeier DJ, Ding J, Day M, Wang Z, Shen W. D1 and D2 dopaminereceptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal médium spiny neurons. *Trends Pharmacol Sci.* 2007. 30, 228-35.

- Surmeier DJ, Carrillo-Reid L, Vargas J. Dopaminergic modulation of striatal neurons, circuits, and assemblies. *Neuroscience*. 2011. 198, 3-18.
- Takahashi N, Miner LL, Sora I, Ujike H, Revay RS, Kostic V, Jackson-Lewis V, and Przedborski S, Uhl GR. VMAT2 knockout mice: heterozygotes display reduced amphetamine-conditioned reward, enhanced amphetamine locomotion, and enhanced MPTP toxicity. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 1997. 94, 9938-9943.
- Tasset I, Pontes AJ, Hinojosa AJ, de la Torre R and Túnez I. Olive oil reduces oxidative damage in a 3-nitropropionic acid-induced Huntington's disease-like rat model. *Nutr Neurosci*. 2011. 14, 106-11.
- Tetrud JW, Langston JW, Redmon DE Jr, Roth RH, Sladek JR y Angel RW. MPTP-induced tremor in human and non-human primates. *Neurology*. 1986. 36, 308-308.
- Toulouse A. and Sullivan A. Progress in Parkinson's disease-Where do we stand? *Prog Neurobiol*. 2008. Doi:10.1016/j.pneurobio.2008.05.003.
- Triggs WJ, y Willmore LJ. In vivo lipid peroxidation in rat brain following intracortical Fe<sup>++</sup> injection. *J. Neurochem*. 1984. 42, 976-979.
- Trujillo M, Gallardo E, Madrona A, Bravo L, Sarriá B, González-Correa JA, Mateos R, Espartero JL. Synthesis and antioxidant activity of nitrohydroxytyrosol and its acyl derivatives. *Agric. Food Chem*. **2014**, 62, 10297–10303.
- Turski L, Bressler K, Rettig KJ, Loschmann PA. Protection of substantia nigra from MPP<sup>+</sup> neurotoxicity by *N*-methyl-d-aspartate antagonists. *Nature*. 1991. 349, 414-418.
- Visioli F, Bellomo G, Montedoro G.F, Galli C. Low-density lipoprotein oxidation is inhibited in vitro by olive oil constituents. *Atherosclerosis* 1995. 117, 25-32.
- Visioli F. Galli C. Olive oil phenols and their potential effects on human health. *J. Agric. Food Chem*. 1998. 46, 4292-4296.
- Visioli F, Galli C, Galli G y Caruso D. Biological activities and metabolic fate of olive oil phenols. *Eur. J. Lipid Sci. Technol*. 2002. 104, 677-684.
- Visioli F and Bernardini E. Extra virgin olive oil's polyphenols: biological activities. *Curr Pharm Des*. 2011. 17, 786-804.

- Volkow ND, Ding YS, Fowler JS, Wang GJ, Logan J, Gatley SJ, Hitzemann R, Smith G, Fields SD, Gur R. Dopamine transporters decrease with age. *J Nucl Med.* 1996. 4, 554-9.
- Walter U, Niehaus L, Probst T, Benecke R, Meyer BU, Dressler D. Brain parenchyma sonography discriminates Parkinson's disease and atypical parkinsonian syndromes. *Neurology.* 2003. 1, 74-7.
- Weiner N, Molinoff PB. Catecholamines. En: Siegel GJ, Agranoff B, Albers RW, Molinoff PB. Eds. *Basic Neurochemistry.* 4<sup>th</sup> Ed. New York: Raven Press. 1989. 233-51.
- Weiner WJ. Is levodopa toxic? *Arch Neurol.* 2000. 57, 408-410.
- Westerink BH, Bosker FJ, Wirix E. Formation and metabolism of dopamine in nine areas of the rat brain: Modifications by haloperidol. *J Neurochem.* 1984. 42(5):1321-7.
- Westerink BHC, Damsma G, Rollema H, De Vries JB, Horn AS. Scope and limitations of in vivo brain dialysis: a comparison of its application to various neurotransmitter systems. *Life Sci.* 1987. 41, 1763 – 76.
- Westerink BHC, Hofsteede H, Damsma G, De Vries J. The significance of extracellular calcium for the release of dopamine, acetylcholine and amino acids in conscious rats, evaluated by brain microdialysis. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 1988. 337(4):373-8.
- Westlund KN, Denney RM, Kochersperger LM, Rose RM, Abell CW. Distinct monoamine oxidase A and B populations in primate brain. *Science* 1985; 230:181-3.
- Wichman T and Dostrovsky JO. Pathological basal ganglia activity in movement disorders. *Neuroscience.* 2011. 198, 232-44.
- Wu R-M, Chen R-C and Chiueh C. Effect of MAO-B Inhibitors on MPP<sup>+</sup> toxicity *in vivo.* *Reactive Oxygen Species: From Radiation to Molecular Biology.* 2000. 899, 255-261.
- Wüllner U, Loschmann PA, Schulz JB, Schimed A. Glutathione depletion potentiates MPTP and MPP<sup>+</sup> toxicity in nigral dopaminergic neurones. *Neuroreport.* 1996. 7, 921-923.

- Yan MH, Wang X, Zhu X. Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. *Free Radic Biol Med.* 2013. 62, 90-101.
- Youdim MB, Ben Shachar D, Riederer P. Is Parkinson's disease a progressive siderosis of substantia nigra resulting in iron and melanin induced neurodegeneration? *Acta Nurol Scand Suppl.* 1989. 126, 47-54.
- Youdim MBH, Buccafusco JJ. CNS targets for multi-functional drugs in the treatment of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *J. Neural Transm.* 2005. 112, 519–537.
- Yu G, Deng A, Tang W, Ma J, Yuan C, Ma J. Hydroxytyrosol induces phase II detoxifying enzyme expression and effectively protects dopaminergic cells against dopamine- and 6-hydroxydopamine induced cytotoxicity. *Neurochem Internat.* 2016. 96, 113-120.
- Yu PH. Inhibition of monoamine oxidase activity by phenylpropanolamine, an anorectic agent. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 1986. 2, 163-71.
- Zecca L, Zucca FA, Albertini A, Rizzio E, Fariello RG. A proposed dual role of neuromelanin in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology.* 2006. 7, S8-11. Review.
- Zhou Y, Zhao Z, Xie J. Effects of isatin on rotational behavior and DA levels in caudate putamen in parkinsonian rats. *Brain Res.* 2001. 917(1): 127-32.
- Zhou C, Huang Y, Przedborski S. Oxidative stress in Parkinson's disease: a mechanism of pathogenic and therapeutic significance. *Ann N Y Acad Sci.* 2008. 1147, 93-104.
- Zuo L, Motherwell MS. The impact of reactive oxygen species and genetic mitochondrial mutations in Parkinson's disease. *Gene.* 2013. 1, 18-23.

## 13. ANEXOS.

### Hydroxytyrosol inhibits MAO isoforms and prevents neurotoxicity inducible by MPP<sup>+</sup> *in vivo*

Gabriela A. Perez-Barron<sup>1</sup>, Sergio Montes<sup>2</sup>, Moises Rubio-Osornio<sup>3</sup>, Jose G. Avila-Acevedo<sup>4</sup>, Sara Garcia-Jimenez<sup>1</sup>, Luis C. Rios<sup>2</sup>, Antonio Monroy-Noyola<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Neuroproteccion, Facultad de Farmacia, Universidad Autonoma del Estado de Morelos, Av. Universidad 1001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, Mexico, <sup>2</sup>Departamento de Neuroquimica, Instituto Nacional de Neurologia y Neurocirugia, M.V.S., Av. Insurgentes Sur 3877, La Fama, Ciudad de Mexico, Mexico, <sup>3</sup>Laboratorio de Enfermedades Neurodegenerativas, Instituto Nacional de Neurologia y Neurocirugia, M.V.S., Av. Insurgentes Sur 3877, La Fama, Ciudad de Mexico, Mexico, <sup>4</sup>Laboratorio de Fitoquimica, UBIPRO, Facultad de Estudios Superiores-Iztacala, Universidad Nacional Autonoma de Mexico, Av. De los Barrios 1, Col. Los Reyes Iztacala, Tlanepantla, Edo. de Mexico, Mexico

#### TABLE OF CONTENTS

1. Abstract
2. Introduction
3. Materials and methods
  - 3.1. Animals
  - 3.2. Hydroxytyrosol treatment
  - 3.3. Intrastratial MPP<sup>+</sup> administration
  - 3.4. Behavioral assessment
  - 3.5. Quantification of striatal catecholamines levels by HPLC
    - 3.6. MAO type A and B activities
    - 3.7. Statistics
4. Results
  - 4.1. MPP<sup>+</sup>-induced circling behavior is reduced by HTy
  - 4.2. HTy prevents striatal dopamine depletion induced by MPP<sup>+</sup>
  - 4.3. Striatal DOPAC and HVA concentrations
  - 4.4. Total activity of MAO after HTy pretreatment
5. Discussion
6. Acknowledgement
7. References

#### 1. ABSTRACT

Parkinson's disease is considered to be due to an increase in the catabolism of dopamine by the action of monoamine oxidase (MAO) enzymes which leads to an increase in reactive oxygen species (ROS) and loss of dopaminergic neurons. Here, in a model of neurotoxicity inducible by 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>), we tested the effect of hydroxytyrosol (HTy), a potent antioxidant, on generation of ROS. Five minutes after a single intravenous administration of 1.5 mg/Kg of HTy, Wistar rats received an intrastratial micro-injection of 10 micrograms of MPP<sup>+</sup> while control animals received saline solution. Six days later, all animals were treated with apomorphine (1 mg/Kg), subcutaneously and ipsilateral rotations were assessed within an hour. Then, the rats were sacrificed, striatal tissues were removed and their catecholamines and MAO-A and B activities were quantitated. Pretreatment with HTy significantly diminished the number of ipsilateral rotations. This recovery correlated with significant preservation of striatal dopamine and significant inhibition

of the MAO activity. These results are consistent with the inhibitory effect of HTy on the MAO isoforms and form a basis for the neuroprotective mechanism of this phenylpropanoid in MPP<sup>+</sup> induced Parkinson's disease.

## 2. INTRODUCTION

Parkinson's disease (PD) is a chronic, progressive and complex neurodegenerative disorder. After Alzheimer's disease, PD is the second most common neurological disease which after age 65, affects 1% of the population World-wide (1). PD is characterized by degeneration of the dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta (SNc) with a decrease in the level of striatal dopamine (DA) (2). There is still no effective pharmacological treatment for reversing or halting the progress of the neurodegeneration.

In support of an environmental cause of the disease, organic molecules such as MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) and its metabolite MPP<sup>+</sup> (1-methyl-4-phenylpyridine) have been shown to cause the degeneration of nigrostriatal dopaminergic neurons with extreme specificity (3). An alternative hypothesis posits that the disease is caused by loss of dopaminergic neurons by the increase in the catabolism of DA, producing endogenous neurotoxins, including reactive oxygen species (ROS) that, by virtue of generation of free radicals, damage dopaminergic neurons of the nigrostriatal pathway (4-5). ROS can be generated from DA, preferentially by the type B of monoamine oxidase (MAO), a main intracellular catabolic enzyme for dopamine in the SNc (6). The neuronal and extra-neuronal sources of MAO B have been shown to be elevated in PD (7). For this reason, the current clinical therapies of PD are based on the use of MAO-B inhibitors, that have traditionally been derived from natural resources. These include selegiline (deprenil) and rasagiline, drugs that exhibit potent neuroprotective effects *in vitro* and *in vivo* (8-9). By molecular docking technique as well as by *in vitro* and *in vivo* experiments, it has been shown that flavonoids, xanthenes, tannins, proanthocyanidins, iridoid glucosides, curcumin, alkaloids and cannabinoids, all exert inhibitory activity on MAO-B. These natural compounds have a half maximal inhibitory concentration 50 (IC<sub>50</sub>), higher for the MAO-B (0.8-154 μM) than MAO-A (37.6-800 μM) isoform (10). One model of PD is inducible in mice by the neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). Using this model, the neuroprotective efficacy of polyphenolic compounds, such as curcumin and its metabolite tetrahydrocurcumin has been attributed to its action on MAO-B (11).

In models of oxidative stress in rodents, the neuroprotective effect of the methanolic extract of *Buddleja cordata* and extra virgin olive oil have all been attributed to the antioxidant property of 3,4-dihydroxyphenyl ethanol known as hydroxytyrosol (HTy), or polyphenols that exist in these sources (12-13). HTy is a phenylpropanoid found in diverse vegetable species, either in an isolated form or chemically bound through ester bonds to sugars, forming acetoside, verbascoside and oleuropein compounds (12-13). Several *in vitro* studies including neuronal cells exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or ferrous salts and sodium nitroprusside have demonstrated that the HTy is a potent antioxidant (14-16). This compound is rapidly absorbed in animals and humans when administered by the oral route (17-19). HTy has been shown to be neuroprotective both in hypoxia-reoxygenation and Huntington's disease animal models (20-21). At a dose of 2.5 mg/Kg administered for 14 days, the toxic effect of 3-nitropropionic acid was preventable in rats by the antioxidant effect of HTy on striatal tissues (21). This treatment also led to a significant decrease of the lipid peroxide levels and an increase of the reduced glutathione (GSH) (21). An *in vitro* study using mitochondria from rat brain tissue showed that the HTy is a potent inhibitor of MAO-B with an IC<sub>50</sub> of 16.3 μM (22).

Given that there has been no *in vivo* experimental evidence for the neuroprotective effect of HTy, in the present study, the effect of HTy on MAO isoforms, were characterized in the rat brain striatum in a rat MPP<sup>+</sup> oxidative model of PD. We also assessed the behavioral impact and catecholamines levels and identified the IC<sub>50</sub> of MAO-A and B *in vitro* in cells that were derived from the same brain region.

## 3. MATERIALS AND METHODS

### 3.1. Animals

Experiments were performed using male NIH strain Wistar rats (220–250 g). Animals were maintained under standard conditions (12:12 light–dark cycles, 23 ± 2°C and 40% relative humidity). They were fed standard (Purina™) chow diet and were provided free access to water. All animals were treated humanely to minimize discomfort in accordance with the ethical principles and regulations specified by the Animal Care and Use Committee of the National Institute of Neurology and Neurosurgery and the standards of the National Institutes of Health of Mexico.

### 3.2. Hydroxytyrosol treatment

Animals were pretreated with HTy before MPP<sup>+</sup> administration. Animals were randomly allocated to either one of the following experimental groups (n=5-7): Control Group (C), rats treated with saline solution (1 mL, i.v.) and 8 µL of 0.6% intrastriatal saline solution. The HTy experimental animals received HTy (1.5 mg/Kg, i.v.) and 8 µL of 0.6% intrastriatal saline solution. The MPP<sup>+</sup> group (MPP<sup>+</sup>), animals were treated with saline solution (1.5 mg/Kg i.v.) and MPP<sup>+</sup> (10 µg/8 µL saline solution). In the HTy + MPP<sup>+</sup> group, rats were administered with HTy (1.5 mg/Kg i.v.) plus MPP<sup>+</sup> (10 µg/8 µL saline solution). HTy was dissolved in saline solution and a single intravenous dose (1.5 mg/Kg) (18) was administered five minutes before intrastriatal MPP<sup>+</sup> stereotaxic injection. The 3-hydroxytyrosol was purchased from Sigma Aldrich (México).

### 3.3. Intrastriatal MPP<sup>+</sup> administration

All animals were anesthetized with ketamine/xylazine combination (50 mg/Kg/4 mg/Kg, intraperitoneally). After 15 minutes, a single intravenous dose of HTy or saline solution was administered to animals. Five minutes later, rats were infused for 5 min with a single intrastriatal stereotaxic microinjection of 10 µg of MPP<sup>+</sup> dissolved in 8 µL of sterile saline and were injected at the stereotaxic coordinates: 0.5 mm anterior to bregma, -3.0 mm lateral to bregma and -4.5 mm ventral to the dura in the right striatum (23). The control animals were administered with 8 µL of saline solution. All rats were killed by decapitation at different times after MPP<sup>+</sup> administration and the striatum of the right hemisphere was dissected out and stored at -70°C until the performance of neurochemical measurements.

### 3.4. Behavioral assessment

Six days after the intrastriatal MPP<sup>+</sup> injection, animals of the four experimental groups were treated subcutaneously with apomorphine at a dose of 1 mg/kg. Rats were placed individually in rectangular acrylic boxes for 1 h to count ipsilateral rotations. The results are expressed as the total number of ipsilateral rotations over a 1-hour period (turns/h) (24).

### 3.5. Quantification of striatal catecholamines levels by HPLC

Striatal DA, DOPAC (3,4-Dihydroxyphenylacetic acid) and HVA (Homovanillic acid) contents were assessed by HPLC coupled to electrochemical detection (25). Seven days after the MPP<sup>+</sup> injection, the striatum was dissected out and sonicated into a perchloric acid-sodium metabisulfite solution (1 M, 0.1 % w/v). The homogenate was centrifuged at 14,000 x g for 10 min at 4°C and the supernatant was analyzed. Data were collected and processed by interpolation into a standard curve. The results are expressed as µg of catecholamine per gram of wet tissue weight.

### 3.6. MAO type A and B activities

Activities of striatal MAO were assayed *in vivo* and *in vitro* using a method described by Morinan and Garratt (26). Corpora striata from animals with experimental treatments (*in vivo* experiments) or without any previous treatment (*in vitro* experiments) were homogenized in 2.5 mL of phosphate buffer. Three aliquots of 250 µL were removed from the diluted homogenates. 250 µL of phosphate buffer (50 mM, pH 7.4) was added to two of the aliquots. To the third aliquot, 250 µL of 4 µM deprenyl (MAO-B inhibitor) or 4 µM clorgyline (MAO-A inhibitor) was added. After incubation at 37°C for 10 min, aliquots

were added to 500 µL of kynuramine (50 µM, MAO substrate) and the reaction was stopped by adding 1 mL of 10% w/v trichloroacetic acid only to one aliquot. Then, following an additional incubation at 37°C for 30 min, the reactions were stopped by adding 1 mL of 10% w/v trichloroacetic acid to the second and third aliquot. After cooling and centrifugation (12,000 rpm, 10 min), an aliquot of 1 mL of the supernatant was added to 1 mL of 1 N aqueous NaOH. Fluorescence was then measured at 315 nm excitation and 380 nm emission using a Perkin-Elmer LS50B Luminescence spectrophotometer. In each experiment, calibration curves were constructed by measuring the fluorescence intensity of 4-hydroxyquinoline (4-HOQ) standards. 4-HOQ is the product of MAO activity on kynuramine. MAO activity was expressed as nmol of 4-HOQ formed/1 h incubation per g of tissue wet weight. Specific MAO inhibitor (deprenyl or clorgyline) were used to measure these MAO isoforms. The IC<sub>50</sub> of HTy for both MAO isoforms were calculated with inhibition curves from the *in vitro* assay.

### 3.7. Statistics

The experimental behavioral assessment data were analyzed using the Kruskal-Wallis test, followed by multiple comparisons using the Mann-Whitney U-test. The results of the striatal catecholamines content and MAO activities were analyzed by one-way ANOVA, followed by a Tukey's test for multiple comparisons. The statistical analyses were performed using SPSS 22.0 software. Values of  $P < 0.05$  were considered to be of statistical significance.

## 4. RESULTS

### 4.1. MPP<sup>+</sup>-induced circling behavior is reduced by HTy

Behavioral assessment was carried out to evaluate the neuroprotective effect of the intravenous pretreatment with HTy (1.5 mg/kg) against long-term MPP<sup>+</sup>-induced neurotoxic effect. As compared to the C or HTy-alone groups, MPP<sup>+</sup> administration produced a marked increase on circling behavior ( $350 \pm 22$  rotations/h) after apomorphine administration (see Figure 1). The HTy pretreatment significantly prevented ( $p = 0.004$ ) the effect of apomorphine-induced circling-behavior in the animals that received MPP<sup>+</sup> (HTy + MPP<sup>+</sup> group). The number of ipsilateral turns was reduced by 65 % ( $123 \pm 15$  rotations/h), when compared against rats that were treated only with the neurotoxin (MPP<sup>+</sup> group).

### 4.2. HTy prevents striatal dopamine depletion induced by MPP<sup>+</sup>

The neuroprotective effect of HTy reduce MPP<sup>+</sup>-induced striatal dopamine depletion (Figure 2). HTy, administered at 1.5 mg/kg to control rats did cause any change in dopamine content ( $29.58 \pm 1.5$   $\mu\text{g/g}$  wet tissue), as compared to the values of the control group ( $23.66 \pm 4.9$   $\mu\text{g/g}$  wet tissue). However, animals that were treated with MPP<sup>+</sup> showed a significant reduction (70 %) ( $8.31 \pm 1.2$   $\mu\text{g/g}$  wet tissue) of striatal dopamine ( $p = 0.001$ ), as compared to control values. Administration of HTy to MPP<sup>+</sup>-infused rats (HTy + MPP<sup>+</sup> group) fully restored dopamine values to the levels that were observed in the control group ( $20.27 \pm 1.9$   $\mu\text{g/g}$  wet tissue) ( $P=0.007$ , vs MPP<sup>+</sup> group). After treatment with HTy, the striatal dopamine content was 45 % higher than the values obtained in the MPP<sup>+</sup>-only group.

### 4.3. Striatal DOPAC and HVA concentrations

Animals injected with MPP<sup>+</sup> (M group) showed a statistically significant decrease ( $p < 0.05$ ) of striatal DOPAC as compared to the control group (C) (-70%) and hydroxytyrosol group (HTy group) (-50%) (Figure 3). Rats pretreated with hydroxytyrosol plus MPP<sup>+</sup> (HTy + MPP<sup>+</sup> group) also significantly maintained ( $p < 0.05$ ) striatal DOPAC levels (-30%) as compared to the control group (C) values. In contradistinction, striatal HVA levels decreased ( $p < 0.05$ ) by MPP<sup>+</sup> administration (Figure 4), as compared to HTy group. However, the HTy pre-treatment did not prevent this effect, and striatal HVA levels were similar to those of the HTy + MPP<sup>+</sup> group.

### 4.4. Total activity of MAO after HTy pretreatment

Both the administration of HTy (-30%) and intra-striatal administration of MPP<sup>+</sup> (-38%) significantly decreased MAO activity ( $p < 0.05$ ), as compared to control group values (Figure 5). While, pretreatment with HTy led to a 40% reduction in the total activity of the MAO when animals were treated with HTy plus MPP<sup>+</sup> ( $2.87$   $\mu\text{moles 4HOQ/g/h}$ ). This inhibition was significant ( $p < 0.05$ ) when compared to the values obtained in the control group ( $4.71$   $\mu\text{moles 4HOQ/g h}$ ). Meanwhile, MAO activity in the contralateral hemisphere (left hemisphere) of the same animal that was not treated MPP<sup>+</sup>, showed no change in the level of either MAO isoforms (Figure 6). While MAO-B isoform activity was reduced by 70%, both the systemic administration (i.v.) of HTy or L-deprenyl (1 mg/Kg, i.p.) produced a significant inhibition ( $p < 0.05$ ) of MAO-A isoform by 40% and 50%, respectively. The inhibitory effect of HTy on MAO isoforms was quantitated by *in vitro* kinetic studies with rat striatal tissue (animals without any chemical treatment). These analyses showed the inhibitory concentration of the HTy to be 50 (IC<sub>50</sub>) of 386  $\mu\text{M}$  for isoform A and 295  $\mu\text{M}$  for B (Figure 7).

## 5. DISCUSSION

The results of the present study provide the first direct *in vivo* evidence of inhibition of MAO isoforms and neuroprotective effect of HTy in the MPP<sup>+</sup> model of Parkinson's disease in rats. Recently, in a model of oxidative stress induced by MPP<sup>+</sup> in rats, our group demonstrated the neuroprotective and antioxidant effects of the methanolic extract of the *Buddleja cordata* plant that has a significant amounts of HTy (12). The HTy of *B. cordata* is chemically bound through ester bonds to sugars, that form a verbascoside or acteoside (23%, methanolic extract) (12). The oral administration of this natural extract generates bioavailable HTy from verbascoside under conditions of acidic pH exists in stomach. This form of the HTy is subsequently activated by microbial esterases in the intestine (27). High absorption of this extract

easily allows the metabolite to enter the bloodstream and pass the Blood-Brain-Barrier (BBB) to enter the brain (28-29). The neuroprotective effect of the methanolic extract derived from *B. cordata* is likely attributable to HTy, rather than to the phenolic compound that was identified chromatographically in striatal tissue from rats pretreated with the methanolic extract (12).

Using a model of hypoxia-reoxygenation in rats, the neuroprotective effect of HTy has also been reported after administration of either 0.25 or 0.5 mL/Kg of olive oil extract for 30 days or 5 or 10 mg/kg for 7 days (20, 30). The neuroprotective effect of HTy has also been demonstrated in a rat model of Huntington's disease by an oral administration of 2.5mg / kg for 14 days (21). This treatment also reduced striatal lipid peroxide formation by 58.5%, and of GSH by 39%. In nitroprusside-induced oxidative stress, extracts that allowed administration of HTy at a dose of 100 mg/kg for 12 days decreased lipid peroxidation (MDA) by 95%. In addition, HTy (24  $\mu$ M) reduced the cytotoxicity of pro-oxidants on brain cells (DBC) by 40-50% and significantly decreased the cytotoxicity induced by both stressors, as measured by the preservation of mitochondrial membrane potential and ATP levels (31). It has been previously shown, that 5 minutes after an intravenous administration of 1.5 mg/Kg of or after intra-peritoneal injection of 20 and 40 mg/Kg or after intraperitoneal injection of 20 and 40 mg/Kg,  $^{14}$ C labeled HTy can easily pass the BBB (18, 29). In the present study, an intravenous dose of 1.5 mg / Kg of HTy, prior to the injection of the MPP<sup>+</sup>, led to a decrease in the ipsilateral rotations (70%) and the preservation of striatal dopamine levels (78%).

The biological effects of HTy have been attributed to its ability to donate electrons from the hydroxyl groups in the ortho position and the subsequent formation of stable intramolecular hydrogen bridges with the phenoxylic radicals, as well as the catechol ring of its chemical structure that favors a metal-chelating effect (32-35). As shown in the present study, additional mode of action for HTy involves an inhibitory effect that HTy exerts on enzymes which are involved in the catabolism of catecholamines, specifically MAO-B. Catabolism of dopamine by the action of MAO produces hydrogen peroxide as a by-product, that in turn, may serve as a substrate for production of the cytotoxic hydroxyl radical by Fenton's chemistry (36). As HTy inhibits MAO at similar concentrations as those employed in the present study, this action may be important in reducing formation of hydroxyl radicals *in vivo*. As has been reported for other polyphenolic compounds derived from vegetable species, the preservation of the dopamine levels by HTy, might be due to its inhibitory effect on MAO isoforms, mainly MAO-B (12). This enzymatic inhibition suggests a decrease in the catabolism of DA, as well as a decreased generation of ROS (5). Clinical studies have reported an increase in the oxidation of DA by MAO-B in the brain of patients with Parkinson's disease and such an effect might lead to the inhibition of both the exogenous neurotoxins such as MPP<sup>+</sup> as well as endogenous neurotoxins such as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (14). Studies using isolated mitochondria from rat brain tissue have confirmed the inhibitory effect of HTy on MAO-B, reporting an IC<sub>50</sub> of 16.3  $\mu$ M, a level which is 11.9 times lower than the IC<sub>50</sub> that was obtained in this study (194  $\mu$ M).

In conclusion, we demonstrated that, at the same dose, HTy inhibits striatal MPP<sup>+</sup> neurotoxicity and exerts neuroprotective effect on both isoforms of MAO. Given that the adult human brain has high levels of MAO-B protein, these findings suggest that natural substrates that contain a high level of HTy should protect the degeneration of the dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta (SNc) in PD (37).

**6. ACKNOWLEDGMENT:** This project has been supported partially by SEP/ CONACYT 257092. Pérez-Barrón is grateful to CONACYT for the scholarship grants (349836).

## 7. REFERENCES

1. C.M. Tanner, S.M. Goldman: Epidemiology of Parkinson's Disease. *Neurol Clinic* 14, 317-335 (1996) doi:[10.1016/S0733-8619\(05\)70259-0](https://doi.org/10.1016/S0733-8619(05)70259-0)
2. D.T. Dexter, P. Jenner. Review Article Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. *Free Radic Bio Med* 6, 132-144 (2013) doi:[10.1016/j.freeradbiomed.2013.01.018](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.01.018)
3. Y. Agid, F. Javoy-Agid, M. Ruberg: Biochemistry of neurotransmitters in Parkinson's disease. *Mov Disor* 166-230 (1987) (DOI not found)
4. S. Fahn, G. Cohen: The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: Evidence supporting it. *Ann Neurol* 32, 804-812 (1992) doi:[10.1002/ana.410320616](https://doi.org/10.1002/ana.410320616)

5. V. Glover, M. Sandler, F. Owen, G. Riley: Dopamine is a monoamine oxidase B substrate in man. *Nature* 265, 80–81 (1997) [doi:10.1038/265080a0](https://doi.org/10.1038/265080a0)
6. G. Cohen: Monoamine oxidase, hydrogen peroxide, and Parkinson's disease. *Adv Neurol* 45, 119–125 (1986) (DOI not found)
7. P. Riederer, K. Jellinger: Neurochemical insights into monoamine oxidase inhibitors, with special reference to deprenyl (selegiline). *Acta Neurol Scand Suppl* 95, 43–55 (1983) [doi:10.1111/j.1600-0404.1983.tb01516.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.1983.tb01516.x)
8. R.M. Wu, R.C. Chen, C.C. Chiueh: Effect of MAO-B inhibitors on MPP<sup>+</sup> toxicity *in vivo*. *Ann NY Acad Sci* 899, 255-26 (2000) [doi:10.1111/j.17496632.2000.tb06191.x](https://doi.org/10.1111/j.17496632.2000.tb06191.x)
9. S. Carradori, R. Silvestri: New Frontiers in Selective Human MAO-B Inhibitors. *J Med Chem* 58, 6717-32 (2015) [doi:10.1021/jm501690r](https://doi.org/10.1021/jm501690r)
10. S. Carradori, M. D'Ascenzio, P. Chimenti, D. Secci, A. Bolasco: Selective MAO-B inhibitors: a lesson from natural products. *Mol Divers* 18, 219–243 (2014) [doi:10.1007/s11030-013-9490-6](https://doi.org/10.1007/s11030-013-9490-6)
11. A. Rajeswari, and M. Sabesan: Inhibition of monoamine oxidase-B by the polyphenolic compound, curcumin and its metabolite tetrahydrocurcumin, in a model of Parkinson's disease induced by MPTP neurodegeneration in mice. *Inflammopharmacology* 16, 96–99 (2008) [doi:10.1007/s10787-007-1614-0](https://doi.org/10.1007/s10787-007-1614-0)
12. G.A. Pérez-Barrón, J.G. Avila-Acevedo, A.M. García-Bores, S. Montes, S. García-Jiménez, I. León-Rivera, M. Rubio-Osornio, A. Monroy-Noyola: Neuroprotective effect of *Buddleja cordata* methanolic extract in the 1-methyl-4-phenylpyridinium Parkinson's disease rat model. *J Nat Med* 69, 86-93 (2015) [doi:10.1007/s11418-014-0866-4](https://doi.org/10.1007/s11418-014-0866-4)
13. M.J. Oliveras-López, G. Berna, E.M. Carneiro, H. López-García de la Serrana, F. Martín, M.C. López: An extra-virgin olive oil rich in polyphenolic compounds has antioxidant effects in OF1 mice. *J. Nutr.* 138, 1074–1078 (2008) [doi:10.1093/jn/138.6.1074](https://doi.org/10.1093/jn/138.6.1074)
14. T. Hashimoto, M. Ibi, K. Matsuno, S. Nakashima, T. Tanigawa, T. Yoshikawa, C. Yabe-Nishimura: An endogenous metabolite of dopamine, 3,4-dihydroxyphenylethanol, acts as a unique cytoprotective agent against oxidative stress-induced injury. *Free Radic Biol Med* 36, 555–564 (2004) [doi:10.1016/j.freeradbiomed.2003.12.003](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2003.12.003)
15. S. Schaffer, W.E. Muller, G.P. Eckert: Cytoprotective effects of olive mill wastewater extract and its main constituent hydroxytyrosol in PC12 cells. *Pharmacol Res* 62, 322–327 (2010) [doi:10.1016/j.phrs.2010.06.004](https://doi.org/10.1016/j.phrs.2010.06.004)
16. T. Hu, X.W. He, J.G. Jiang, X.L. Xu: Hydroxytyrosol and its potential therapeutic effects. *J Agric Food Chem* 19, 1449-55 (2014) [doi:10.1021/jf405820v](https://doi.org/10.1021/jf405820v)
17. J. Pinto, F. Paiva-Martins, G. Corona, E.S. Debnam, M.J. Oruna-Concha, D. Vauzour, M.H. Gordon, J.P.E. Spencer: Absorption and metabolism of olive oil secoiridoids in the small intestine. *Br J Nutr* 105, 1607–1618 (2011) [doi:10.1017/S000711451000526X](https://doi.org/10.1017/S000711451000526X)
18. S. D'Angelo, C. Manna, V. Migliardi, O. Mazzoni, P. Morrica, G. Capasso, G. Pontoni, P. Galletti, V. Zappia: Pharmacokinetics and metabolism of hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil. *Drug Metab Dispos* 29, 1492–1498 (2011) (DOI not found)
19. K. De la Torre-Carbot, J.L. Chávez-Servin, O. Jaurregui, A.I. Castellote, R.M. Lamuela-Raventos, M. Fito, M.I. Covas, D. Muñoz-Aguayo, M.C. López-Sabater: Presence of virgin olive oil phenolic metabolites in human low density lipoprotein fraction: determination by high-performance liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 583, 402–410 (2007) [doi:10.1016/j.aca.2006.10.029](https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.10.029)
20. J.A. González-Correa, M.D. Navas, J. López-Villodres, M. Trujillo, J.L. Espartero, J.P. De La Cruz: Neuroprotective effect of hydroxytyrosol and hydroxytyrosol acetate in rat brain slices subjected to hypoxia-reoxygenation. *Neulet* 446, 143-146 (2008) [doi:10.1016/j.neulet.2008.09.022](https://doi.org/10.1016/j.neulet.2008.09.022)

21. I. Tasset, A.J. Pontes, A.J. Hinojosa, R. de la Torre, I. Túnez: Olive oil reduces oxidative damage in a 3-nitropropionic acid-induced Huntington's disease-like rat model. *Nutr Neurosci* 14, 106-11 (2011) [doi:10.1179/1476830511Y.0000000005](https://doi.org/10.1179/1476830511Y.0000000005)
22. A. Geellings, E.L. López-Huerta, J.C. Morales, J. Boza, J. Jiménez: Natural products and derivatives thereof for protection against neurodegenerative diseases. United States Patent Application Publication, US 2003/0236202 A1 (2003) (DOI not found)
23. G. Paxinos, C. Watson: The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. 4th. New York: *Academic Press*, 456 (1998) (DOI not found)
24. R. Schwarcz, K. Fuxe, L.F. Agnati, T. Hokfelt, J.T. Coyle: Rotational Behavior in rats with unilateral striatal kainic acid lesions: a behavioural model for studies on intact dopamine receptors. *Brain Res* 170, 485-95 (1979) [doi:10.1016/0006-8993\(79\)90966-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(79)90966-1)
25. M. Alcaraz-Zubeldia, P. Rojas, C. Boll, C. Ríos: Neuroprotective effect of acute and chronic administration of copper (II) sulfate against MPP<sup>+</sup> neurotoxicity in mice. *Neurochem Res* 26, 61–6 (2001) [doi:10.1023/A:1007680616056](https://doi.org/10.1023/A:1007680616056)
26. A. Morinan, H.M. Garrat: An improved fluorometric assay for brain monamine oxidase. *J Pharmacol Methods* 13, 213–223 (1985) [doi:10.1016/0160-5402\(85\)90021-X](https://doi.org/10.1016/0160-5402(85)90021-X)
27. P.K. Lankha, B.K. Lonsane: Production and application of tannin acyl hydrolase. *Adv Appl Microbiol* 44, 215–60 (1997) [doi:10.1016/S0065-2164\(08\)70463-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)70463-5)
28. L. Poquet, M.N. Clifford, G. Williamson: Transport and metabolism of ferulic acid through the colonic epithelium. *Drug Metab Dispos* 36, 190–97 (2008) [doi:10.1124/dmd.107.017558](https://doi.org/10.1124/dmd.107.017558)
29. E. Gallardo, R. Palma-Valdés, J.L. Espartero, M. Santiago: In vivo striatal measurement of hydroxytyrosol, and its metabolite (homovanillic alcohol), compared with its derivative nitrohydroxytyrosol. *Neurosci Lett* 579, 173-6 (2014) [doi:10.1016/j.neulet.2014.07.037](https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.07.037)
30. A. González-Correa, J. Muñoz-Marín, M.M. Arrebola, A. Guerrero, F. Narbona, J. López-Villodres, J.P. De La Cruz: Dietary virgin olive oil reduces oxidative stress and cellular damage in rat brain slices subjected to hypoxia–reoxygenation. *Lipids* 42, 921–929 (2007) [doi:10.1007/s11745-007-3097-6](https://doi.org/10.1007/s11745-007-3097-6)
31. S. Schaffer, M. Podstawa, F. Visioli, P. Bogani, W.E. Müller, G.P. Eckert: Hydroxytyrosol-rich olive mill wastewater protects brain cells in vitro and ex vivo. *J Agric Food Chem* 55, 5043–5049 (2007) [doi:10.1021/jf0703710](https://doi.org/10.1021/jf0703710)
32. G. Rodríguez-Gutiérrez, G.G. Duthie, S. Wood, P. Morrice, F. Nicol, M. Reid, L.L. Cantlay, T. Kelder, G.W. Horgan, G.J. Fernández-Bolaños, B. de Roos: Alperujo extract, hydroxytyrosol, and 3,4-dihydroxyphenylglycol are bioavailable and have antioxidant properties in vitamin E-deficient rats—a proteomics and network analysis approach. *Mol Nutr Food Res* 56, 1137-47 (2012) [doi:10.1002/mnfr.201100808](https://doi.org/10.1002/mnfr.201100808)
33. F. Visioli, A. Bellomo, C. Galli: Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols, *Biochem Biophys Res Commun* 247, 60–64 (1998a) [doi:10.1006/bbrc.1998.8735](https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8735)
34. R. Aeschbach, J. Loliger, B.C. Scott, A. Murcia, J. Butler, B. Halliwell, O.I. Aruoma: Antioxidant action of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone, and hydroxytyrosol. *Food Chem Toxic* 32, 31–36 (1994) [doi:10.1016/0278-6915\(84\)90033-4](https://doi.org/10.1016/0278-6915(84)90033-4)
35. F. Visioli, G. Bellomo, C. Galli: Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochem Biophys Res Commun* 247, 60–64 (1998b) [doi:10.1006/bbrc.1998.8735](https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8735)
36. M. Gerlach, D. Ben-Shachar, P. Riederer, M.B. Youdim: Altered brain metabolism of iron as a cause of neurodegenerative diseases? *J Neurochem* 63, 1609-1623 (1994) (DOI not found)

37. J. Tong, J.H. Meyer, Y. Furukawa, I. Boileau, L.J. Chang, A.A. Wilson, S. Houle, S.J. Kish: Distribution of monoamine oxidase proteins in human brain: implications for brain imaging studies. *J Cereb Blood Flow Metab* 33, 863–871 (2013) doi:10.1038/jcbfm.2013.19

**Abbreviations:** HT: Hydroxytyrosol; MPP<sup>+</sup>: 1-Methyl-4-phenylpyridinium; PD: Parkinson disease; MPTP: 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine; MAO: Monoamine oxidase; MAO-A: Monoamine oxidase A; MAO-B: Monoamine oxidase B; DA: Dopamine; DOPAC: 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid; HVA: Homovanillic acid; GSH: Glutathione

**Keywords:** Hydroxytyrosol, MPP<sup>+</sup>, Parkinson's disease, Monoamine oxidase, Neuroprotection.

**Figure 1.** Effect of hydroxytyrosol on apomorphine-induced rotations in the rat MPP<sup>+</sup> model. Rats were pretreated with HT (1.5 mg/kg), fifteen minutes after, were infused with MPP<sup>+</sup> and six days later, the animals were treated with apomorphine and ipsilateral rotations were recorded for 1 h. C, control; HT, hydroxytyrosol; MPP<sup>+</sup>, 1-methyl-4-phenylpyridinium; HT + MPP<sup>+</sup>. Data are the mean ± SEM. n = 7 rats per group. \*Statistically different versus all other groups. +Statistically different versus MPP<sup>+</sup> group. P < 0.05, Kruskal-Wallis test followed by Mann-Whitney's U-test.

**Figure 2.** Effect of hydroxytyrosol on striatal dopamine content in a rat MPP<sup>+</sup> model. C, control; HT, hydroxytyrosol; MPP<sup>+</sup>, 1-methyl-4-phenylpyridinium; HT + MPP<sup>+</sup>. Data are represented as the mean ± SEM for n = 7 rats per group. \*Statistically different from all other groups. \*Statistically different from MPP<sup>+</sup> group and HT group. P < 0.05, one-way ANOVA followed by Tukey's test.

**Figure 3.** Hydroxytyrosol pretreatment effect on DOPAC levels in the MPP<sup>+</sup> model in rat. This chart illustrates DOPAC levels detected in the right striatum of each treatment group; C, control group; HT, Hydroxytyrosol group; MPP<sup>+</sup>, 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine group; HT + MPP<sup>+</sup> group. Data are the mean ± SEM, n = 7 rats per group. \*Statistically different from Control group. P < 0.05, one-way ANOVA followed by Tukey's test.

**Figure 4.** Hydroxytyrosol pretreatment effect on HVA levels in the MPP<sup>+</sup> model in rat. This chart illustrates HVA levels detected in the right striatum of each treatment group; C, control group; HT, hydroxytyrosol group; MPP<sup>+</sup>, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine group; HT + MPP<sup>+</sup> group. Data are the mean ± SEM, n = 7 rats per group. \*Statistically different from HT group. P < 0.05, one-way ANOVA followed by Tukey's test.

**Figure 5.** Inhibitor Effect of hydroxytyrosol on MAO isoforms in the striatum of rats administrated with MPP<sup>+</sup>. Each bar is the mean ± SEM of 7 animals per group. C, control; HT, hydroxytyrosol (1.5 mg/Kg); MPP<sup>+</sup>, 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (10 µg/8 µL S.S.); HT + MPP<sup>+</sup>. \*Statistically different from the control group. P < 0.05, one-way ANOVA followed by Tukey's test.

**Figure 6.** Total MAO activity in both rat brain striatum 2 h after a single ipsilateral striatum injection of MPP<sup>+</sup> or treatment with hydroxytyrosol or L-deprenyl. Results are expressed as mean ± SEM of 5 animals per group. C, control group; MPP<sup>+</sup>, 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (10 µg/8 µL S.S.); HT, hydroxytyrosol (1.5 mg/Kg, i.v.). L-DEP, L-deprenyl (2 mg/Kg i.p.). \*Statistically different from The control group. P < 0.05, one-way ANOVA followed by Tukey's test.

**Figure 7.** *In vitro* determination of half maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of HT on MAO isoforms of rat striatum. Each value represents the mean ± ES of 3-5 assays. One hundred twenty five µL of rat striatum homogenate (Without pharmacological treatment) were incubated with 125 µL of TH (1, 5, 10, 50, 100, 500 and 1000 µM) and 4 µM deprenyl as MAO-B specific inhibitor. ●IC<sub>50</sub> 318, ▲ 386, ◆295

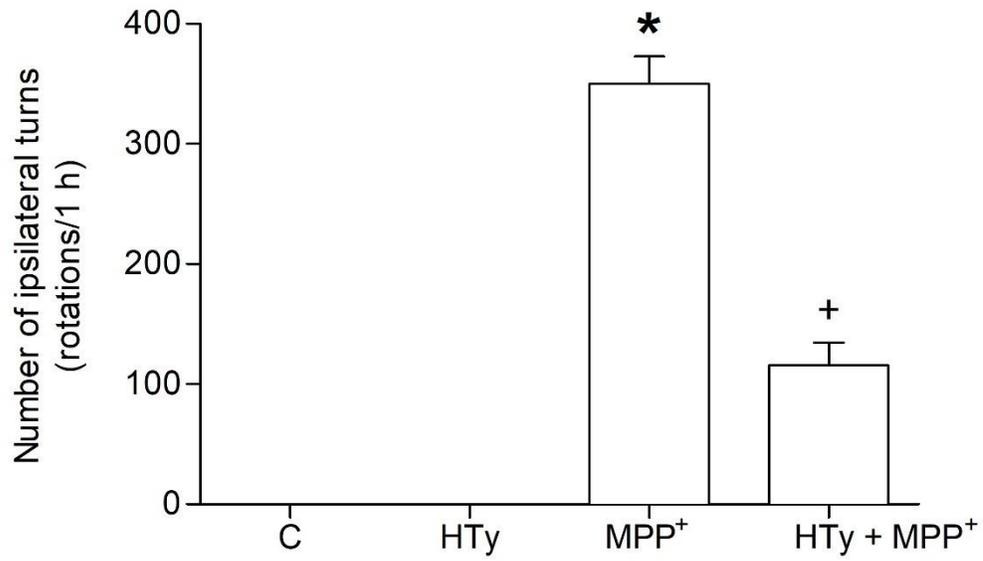


Figure. 1

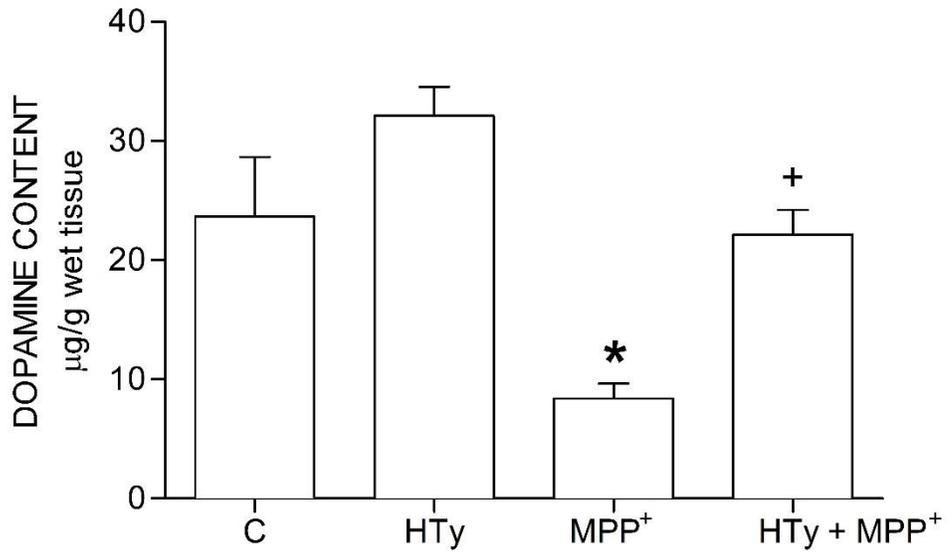


Figure 2.

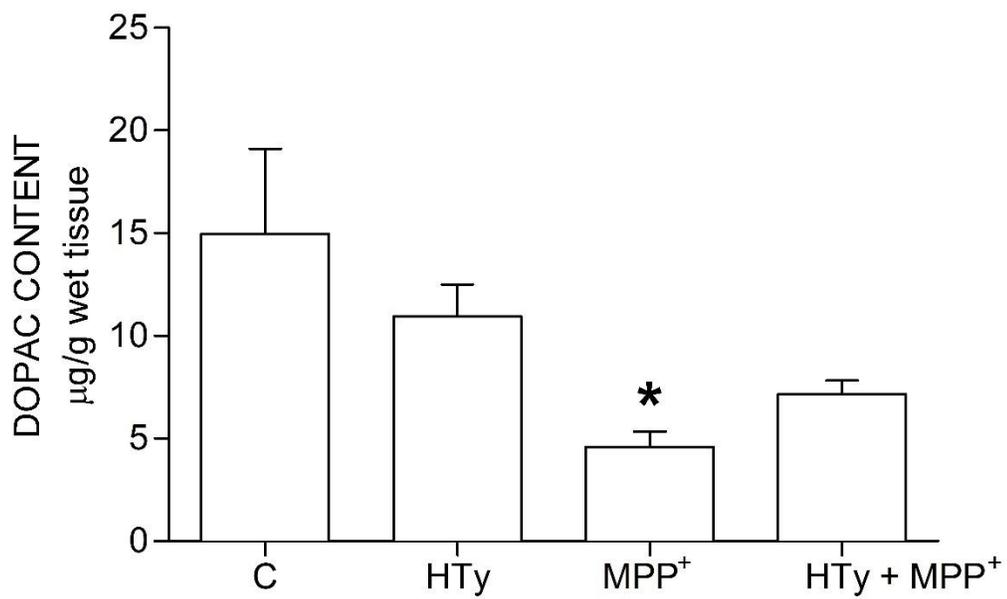


Figure 3.

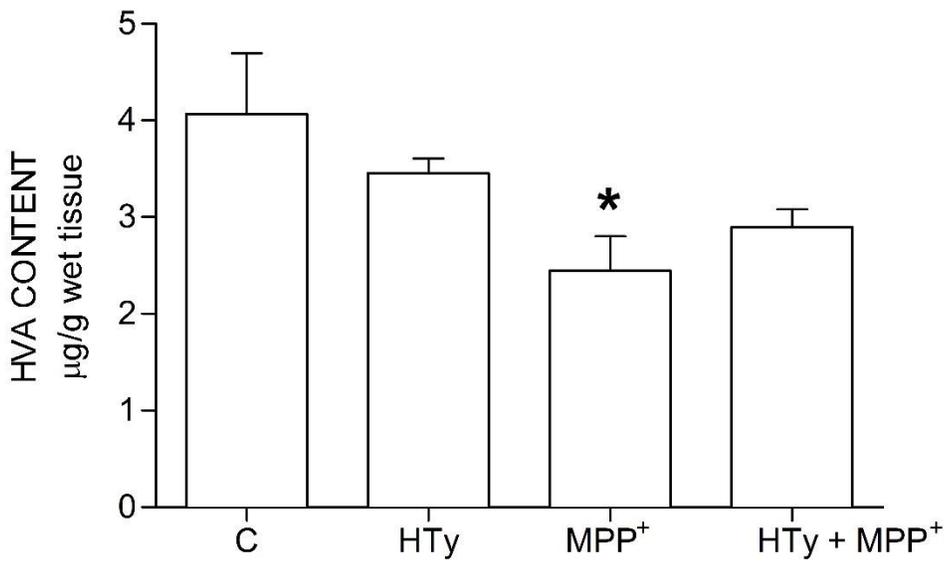


Figure 4.

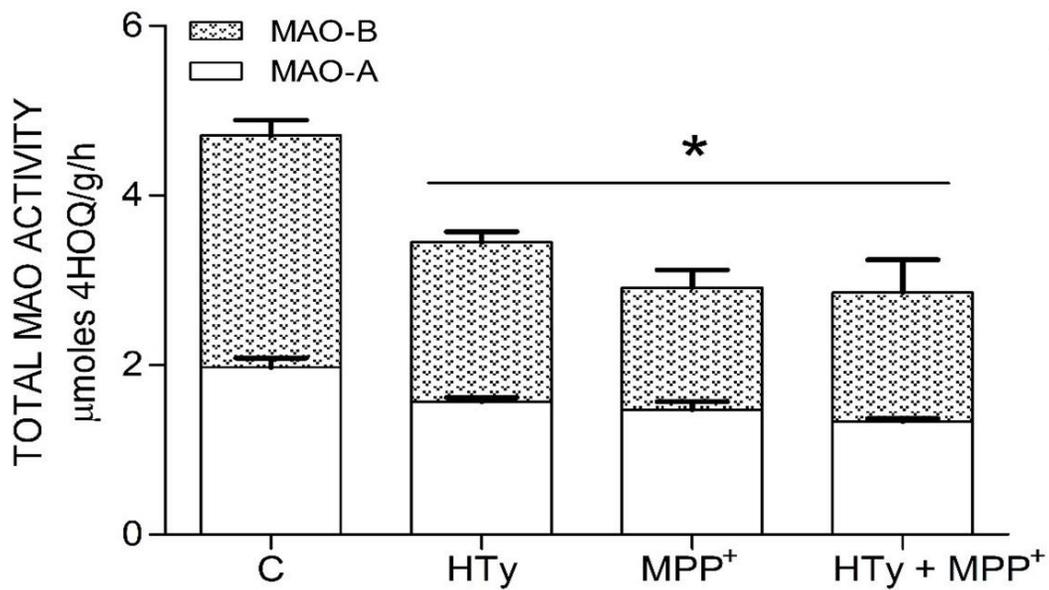


Figure 5.

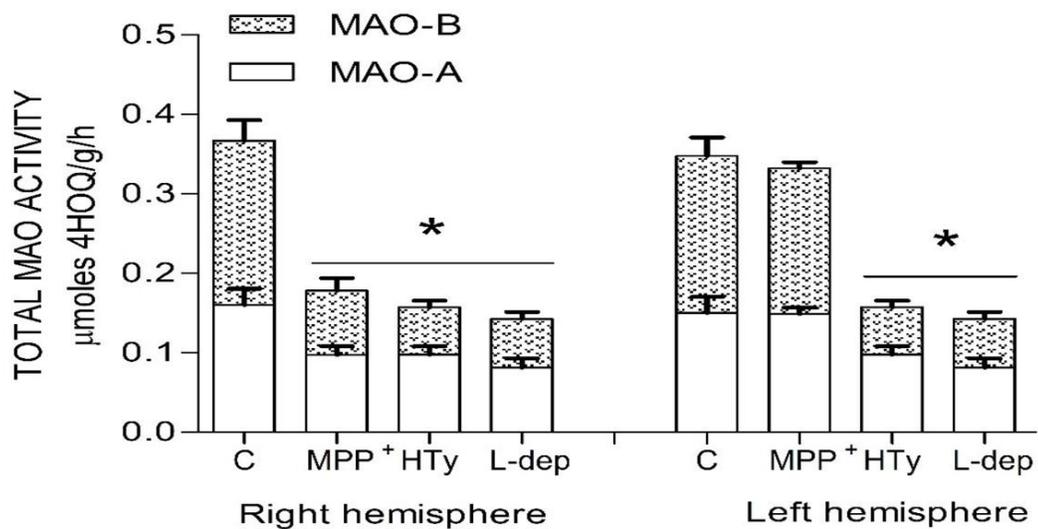


Figure 6.

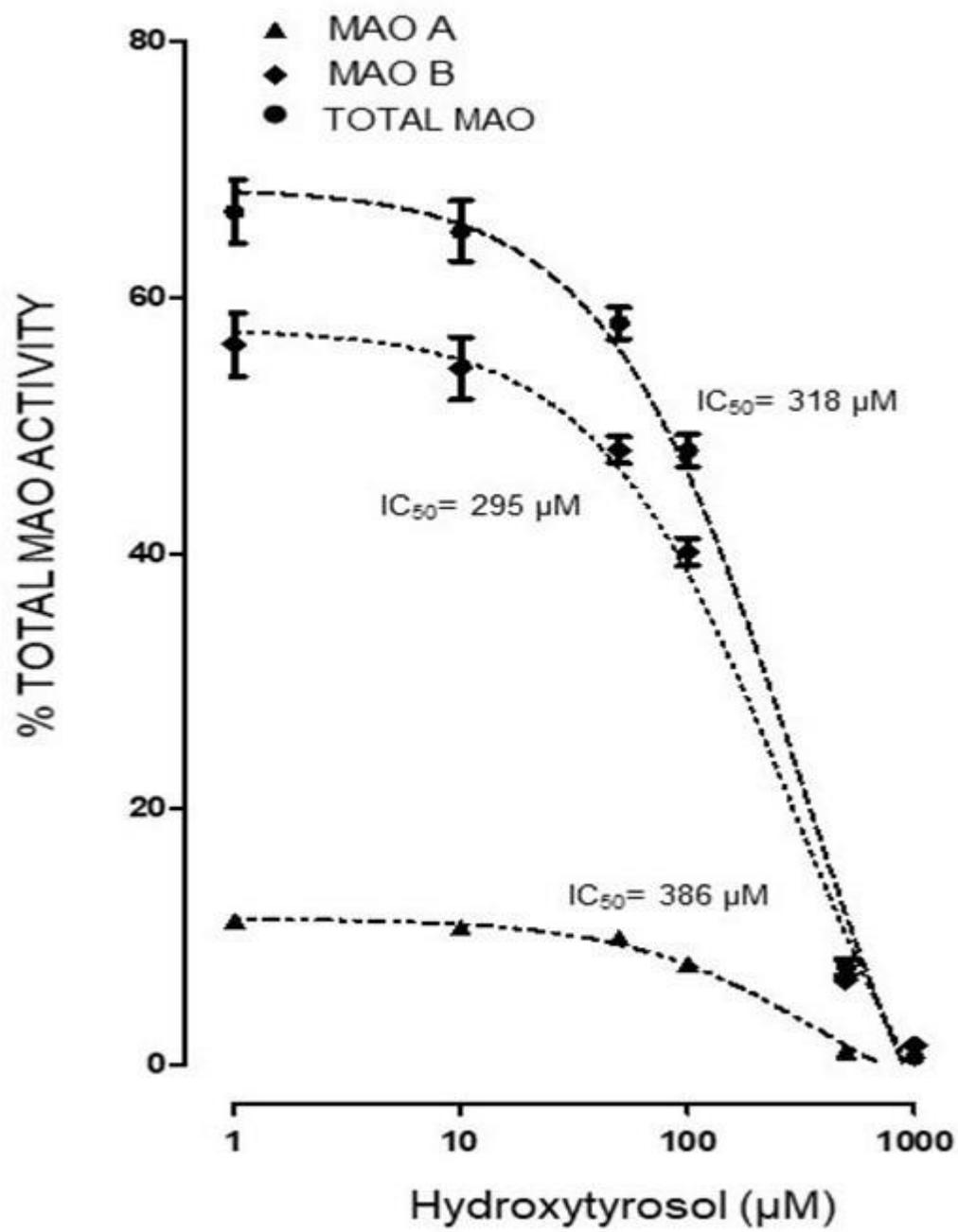


Figure 7.

**VOTO APROBATORIO**

**PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA  
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

**Nombre del alumno:** Gabriela Alejandra Pérez Barrón

---

**Título de la tesis:** "Efecto neuroprotector del hidroxitirosol, acetato de hidroxitirosol y nitrohidroxitirosol en el modelo de MPP<sup>+</sup> de la enfermedad de Parkinson en rata"

---

**Grado a obtener:**

Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:**  
Yoshagandeth Aguirre Vidal

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

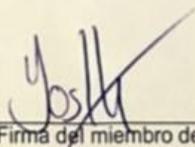
Si se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

**Observaciones (solo en caso de rechazo):**

---

---

---

  
Firma del miembro del jurado

26/Julio/2019  
Fecha

**VOTO APROBATORIO**  
**PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA**  
**FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

**Nombre del alumno:** Gabriela Alejandra Pérez Barrón

---

**Título de la tesis:** "Efecto neuroprotector del hidroxitirosol, acetato de hidroxitirosol y nitrohidroxitirosol en el modelo de MPP<sup>+</sup> de la enfermedad de Parkinson en rata"

---

**Grado a obtener:**

Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:**

Juan Gabriel Navarrete Vázquez

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

**Observaciones (solo en caso de rechazo):**

---

---

---

  
Juan Gabriel Navarrete Vázquez  
Firma del miembro del jurado

29 Junio / 2018  
Fecha

**VOTO APROBATORIO**  
**PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA**  
**FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

**Nombre del alumno:** Gabriela Alejandra Pérez Barrón

---

**Título de la tesis:** "Efecto neuroprotector del hidroxitirosol, acetato de hidroxitirosol y nitrohidroxitirosol en el modelo de MPP<sup>+</sup> de la enfermedad de Parkinson en rata"

---

**Grado a obtener:**

Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:**

JOSE GUILLERMO AVILA ACEVEDO

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

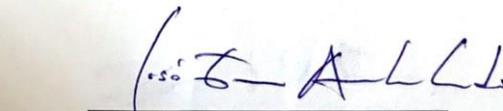
Si se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

**Observaciones (solo en caso de rechazo):**

---

---

---

  
Firma del miembro del jurado

30/Junio/2018  
Fecha

**VOTO APROBATORIO**  
**PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA**  
**FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

**Nombre del alumno:** Gabriela Alejandra Pérez  
Barrón

---

**Título de la tesis:** "Efecto neuroprotector del hidroxitirosol, acetato de hidroxitirosol y nitrohidroxitirosol en el modelo de MPP<sup>+</sup> de la enfermedad de Parkinson en rata"

---

**Grado a obtener:**

Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:**

Sergio Montes López

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

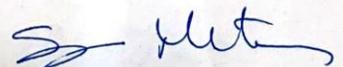
Si se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

**Observaciones (solo en caso de rechazo):**

---

---

---

  
Firma del miembro del jurado

30/Junio/2018  
Fecha

**VOTO APROBATORIO**  
**PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA**  
**FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

**Nombre del alumno:** Gabriela Alejandra Pérez Barrón

---

**Título de la tesis:** "Efecto neuroprotector del hidroxitirosol, acetato de hidroxitirosol y nitrohidroxitirosol en el modelo de MPP<sup>+</sup> de la enfermedad de Parkinson en rata"

---

**Grado a obtener:**

Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:**  
L. Camilo Rios Castañeda

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

**Observaciones (solo en caso de rechazo):**

---

---

---

L. Camilo Rios Castañeda  
Firma del miembro del jurado

30 / Junio / 2018  
Fecha

**VOTO APROBATORIO**  
**PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA**  
**FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

**Nombre del alumno:** Gabriela Alejandra Pérez Barrón

---

**Título de la tesis:** "Efecto neuroprotector del hidroxitirosol, acetato de hidroxitirosol y nitrohidroxitirosol en el modelo de MPP<sup>+</sup> de la enfermedad de Parkinson en rata"

---

**Grado a obtener:**

Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:**

German Bernal Fernández

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

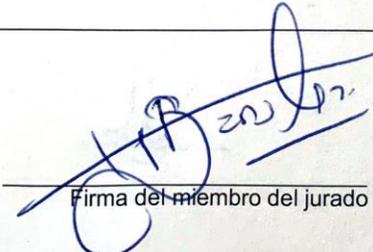
Si se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

**Observaciones (solo en caso de rechazo):**

---

---

---

  
Firma del miembro del jurado

28/06/2018  
Fecha

**VOTO APROBATORIO**  
**PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA**  
**FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

**Nombre del alumno:** Gabriela Alejandra Pérez Barrón

---

**Título de la tesis:** "Efecto neuroprotector del hidroxitirosol, acetato de hidroxitirosol y nitrohidroxitirosol en el modelo de MPP<sup>+</sup> de la enfermedad de Parkinson en rata"

---

**Grado a obtener:**

Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

**Miembro del jurado:**

Samuel Enoch Estrada Soto

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

**Observaciones (solo en caso de rechazo):**

---

---

---



Firma del miembro del jurado

19/06/2018

Fecha