

# Sistema dopaminérgico y muerte neuronal

M.R. Luquin, L. Saldise

Neurología Experimental. Departamento de Neurología y Neurocirugía. Clínica Universitaria de Navarra. Facultad de Medicina. Pamplona, España.

## Correspondencia

Dra. M<sup>a</sup> Rosario Luquin. Departamento de Neurología y Neurocirugía. Clínica Universitaria de Navarra. Avda. Pío XII, s/n. E-31008 Pamplona.

## RESUMEN

El mecanismo que induce a la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra es desconocido. Se ha postulado un incremento del estrés oxidativo, excitotoxicidad, alteraciones del funcionamiento mitocondrial y apoptosis, pero ninguno de ellos explica por sí mismo el desarrollo de la EP. En este artículo se revisan los hallazgos más importantes que sustentan cada una de las hipótesis.

## PALABRAS CLAVE

Alteraciones mitocondriales. Apoptosis. Estrés oxidativo. Excitotoxicidad. Muerte neuronal. Sistemas dopaminérgicos.

## SUMMARY

The mechanism involved in dopaminergic neuronal death remains unknown. Increased oxidative stress, inhibition of mitochondrial respiratory chain and apoptosis have been suggested as possible factors mediating cellular death. This article reviews the most important findings reported in parkinsonian brains related to nigral neuronal death.

## KEY WORDS

Apoptosis. Dopamine systems. Excitotoxicity. Mitochondrial dysfunction. Neuronal death. Oxidative stress.

## INTRODUCCIÓN

La principal característica bioquímica de la enfermedad de Parkinson (EP) es la degeneración de las neuronas dopaminérgicas nigroestriadas que se originan en la sustancia negra compacta y proyectan hacia el estriado (caudado y putamen) [1]. La causa que induce a la muerte neuronal es desconocida. Estudios en pacientes homocigóticos muestran un papel genético limitado, aunque existen casos en los que se ha podido comprobar una transmisión autosómica dominante [2]. Por otro lado, en la EP se han descrito alteraciones de la cadena transportadora de electrones [3], lo que sugiere la existencia de alteraciones del genoma mitocondrial. El descubrimiento de la neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina (MPTP), que reproduce en animales los hallazgos neuroquímicos e histológicos propios de la EP [4], ha llevado a hipotetizar que determinadas toxinas ambientales o de producción endógena, podrían estar relacionadas con la muerte neuronal dopaminérgica que ocurre en pacientes con EP. Diversos estudios llevados a cabo en cerebros de pacientes parkinsonianos, indican que la degeneración de las neuronas dopaminérgicas podría estar relacionada con fenómenos de hiperoxidación [5]. No es claro, sin embargo, si la hiperoxidación es el desencadenante o la consecuencia de la muerte neuronal.

La pérdida de neuronas dopaminérgicas induce secundariamente una disminución muy marcada de los niveles estriatales de dopamina. En general, el déficit de dopamina es mayor en el putamen que en el núcleo caudado y en ambos el déficit de dopamina muestra un gradiente rostrocaudal, lo que sugiere una vulnerabilidad diferente de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra a la neurodegeneración [6].

## ESTRÉS OXIDATIVO

En los últimos años se ha descrito de forma repetida un incremento en los niveles de peroxidación lipídica en la sustancia negra y no en otras áreas de inervación dopaminérgica, en cerebros de pacientes parkinsonianos [7]. Estos hallazgos indican que en la EP, la sustancia negra podría estar expuesta de forma continua a la acción de radicales libres derivados de sustancias exógenas o endógenas.

La hipótesis del estrés oxidativo hace referencia a un desbalance entre la formación de oxidantes celulares, como el radical superóxido ( $O_2^-$ ) y radical hidroxilo (OH), y los procesos antioxidantes. Estos derivados de oxígeno inducen daño celular y alteraciones de la permeabilidad de la membrana a través de reacciones en cadena de peroxidación lipídica [8].

Aunque no existe una prueba directa de que el estrés oxidativo produce la muerte de neuronas dopaminérgicas en la EP, hallazgos en humanos y animales de experimentación apoyan esta hipótesis. Por ejemplo, en cerebros de pacientes con EP la proporción  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  es 2/1, frente a un cociente 1/2 en cerebros de sujetos de edad similar [9]; la concentración de glutatión peroxidasa y catalasa está reducida, se ha descrito un incremento en la actividad de la superóxido dismutasa y finalmente una disminución en el contenido de glutatión reducido [10,11]. Además, diversos autores han descrito en la sustancia negra de pacientes parkinsonianos, un incremento de productos secundarios de peroxidación lipídica asociados a una disminución en los

niveles de ácidos grasos polinsaturados [12]. Estos resultados son apoyados por el hallazgo más reciente de un incremento de hidroperóxidos lipídicos en la sustancia negra de cerebros con EP [13].

En la sustancia negra de sujetos control los niveles de RNAm para superóxido dismutasa CuZn son muy elevados. Las células hibridadas positivamente contienen neuromelanina y se encuentran localizadas preferentemente en la sustancia negra, pars compacta y en menor grado en el área tegmental ventral. De este modo, parece que el gen y la proteína de superóxido dismutasa CuZn se expresan de forma preferente en aquellas neuronas más vulnerables al proceso patológico subyacente a la EP. Así, las neuronas que contienen neuromelanina requerían mayor cantidad de superóxido dismutasa CuZn para facilitar la eliminación de radicales superóxido. Por otro lado, una actividad elevada de superóxido dismutasa CuZn en estas células podría contribuir a una mayor vulnerabilidad de las mismas, al incrementar la producción de peróxido de hidrógeno [14].

La localización neuronal de superóxido dismutasa CuZn resulta interesante si tenemos en cuenta la localización celular de glutatión-peroxidasa, enzima encargada de eliminar el peróxido de hidrógeno del organismo. Estudios inmunohistológicos han demostrado que esta enzima se encuentra localizada exclusivamente en astrocitos [15]. Por tanto, el sistema de defensa de las neuronas dopaminérgicas frente a los radicales libres requiere un acoplamiento perfecto glía-neurona. En cerebros de sujetos control, la densidad de neuronas glutatión peroxidasa (+) es diferente en las distintas áreas dopaminérgicas. Por ejemplo, es muy elevada en áreas dopaminérgicas que no degeneran en la EP, como la sustancia gris central; está muy reducida en la sustancia negra compacta (área dopaminérgica donde existe la mayor depleción dopaminérgica en la EP), y es de valor intermedio en el área tegmental ventral y región peri y retrorubral caracterizadas por una pérdida moderada de neuronas dopaminérgicas [16]. Estos hallazgos indican que las neuronas dopaminérgicas rodeadas de una densidad baja de células gliales, estarían menos protegidas frente a la producción de peróxido de hidrógeno. Por el contrario, neuronas dopaminérgicas situadas en zonas donde la densidad glial es muy elevada, estarían más protegidas frente a la acción tóxica de los radicales libres.

En cerebros con EP se ha descrito un aumento del número de células gliales glutatión-peroxidasa (+) [17]. Este incremento está relacionado directamente con el grado de pérdida neuronal dopaminérgica y representaría un mecanismo de defensa de las neuronas todavía funcionantes, frente a la producción de radicales libres. Además, en homogeneizados de sustancia negra de pacientes parkinsonianos se han encontrado alteraciones en la actividad de enzimas y sustratos implicados en la formación de radicales libres, como aumento en la actividad superóxido-dismutasa, disminución de los niveles de glutatión y de la actividad de glutatión-peroxidasa, sin modificaciones en la actividad de glutatión-transferasa [18,19]. Estos resultados sugieren que los mecanismos de defensa frente a la producción de radicales libres están alterados en la sustancia negra de pacientes parkinsonianos.

Los metales pueden desempeñar un papel muy importante en diversas enfermedades degenerativas del SNC. Así, en la enfermedad de Wilson existe una alteración en el metabolismo del cobre [20], el aluminio se ha implicado como factor etiopatogénico en la enfermedad de Alzheimer [21] y el manganeso en algunas formas de parkinsonismo [22]. En el caso de la EP, el hierro podría participar en los mecanismos implicados en el

incremento de peroxidación lipídica ya que produce radicales libres por sí mismo [23] y se une selectivamente a la neuromelanina produciendo complejos  $\text{Fe}^{2+}$ /melanina que pueden producir estrés oxidativo. En homogeneizados de cerebros parkinsonianos, el contenido total de hierro está incrementado de forma específica en la sustancia negra, con valores normales en otros núcleos de los ganglios basales como caudado y putamen [25]. Este incremento de hierro podría interpretarse como un aumento en su transporte al interior de las células dopaminérgicas en forma de complejos Fe-ferritina a través de receptores de superficie específicos [26]. Sin embargo, no puede excluirse que el acúmulo de Fe en el interior de las células sea un producto inespecífico de la degradación celular. En cerebros de pacientes con parálisis supranuclear progresiva, en la que existe una degeneración dopaminérgica nigroestriada, los niveles cerebrales de Fe son normales, lo que sugiere que el acúmulo de Fe descrito en la sustancia negra de pacientes parkinsonianos no es meramente un marcador inespecífico de muerte celular [27,28].

Modelos animales de EP apoyan también la hipótesis de que el estrés oxidativo puede desempeñar un papel muy importante en los mecanismos de muerte neuronal. Por ejemplo, el quelante del hierro desferoxamina y la vitamina E protegen a las neuronas dopaminérgicas de la neurodegeneración inducida por 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) [29]. Además, en este mismo modelo, nuestro grupo de trabajo ha demostrado que la N-acetil-cisteína (NAC), precursor de glutatión, bloquea la neurotoxicidad dopaminérgica inducida por 6-OHDA y la conducta rotatoria contralateral en respuesta a agonistas dopaminérgicos [30] (Figs. 1-4).

El mecanismo de neurotoxicidad de la 6-OHDA está ligado a un incremento en la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y radicales OH [32]. De este modo, el incremento de los niveles cerebrales de glutatión inducida por la NAC, bloquearía la producción de radicales OH secundaria a la administración de 6-OHDA, ya que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  formado en exceso se transformaría en  $\text{H}_2\text{O}$  a través de la vía del glutatión. Estos resultados resultan interesantes si tenemos en cuenta, como se ha comentado anteriormente, que en cerebros de pacientes parkinsonianos se ha descrito una disminución de los niveles de glutatión a nivel de la sustancia negra. Por tanto, sustancias como la NAC que incrementen los niveles cerebrales de glutatión podrían ser potencialmente eficaces como tratamiento neuroprotector en la enfermedad de Parkinson.

Aunque la muerte neuronal inducida por 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina (MPTP) parece estar ligada a una inhibición directa del complejo I mitocondrial por su metabolito tóxico  $\text{MPP}^+$  [32], algunos autores han demostrado que la neurotoxicidad producida por MPTP puede deberse en parte a un incremento del estrés oxidativo. Chiueh et al [33] han demostrado que el efecto tóxico inducido por MPTP está relacionado con un exceso de producción de radicales libres secundario a la liberación de dopamina inducida por la administración del tóxico. Por otro lado, Adams et al [34] han descrito que la interacción de  $\text{MPP}^+$  con NADH dehidrogenasa mitocondrial induce un incremento de peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo. Recientemente, nuestro grupo de trabajo [35] ha estudiado el efecto neuroprotector de la desferoxamina frente a la toxicidad dopaminérgica inducida por inyección intraestriatal de  $\text{MPP}^+$  en rata. En este modelo, el pretratamiento con desferoxamina no indujo cambios significativos en el número de neuronas TH (+) de la sustancia negra homolateral a la inyección estriatal, en relación al grupo de animales que recibió salino (Figs. 5-7). Estos resultados sugieren que la producción de radicales libres no es el principal mecanismo de toxicidad

neuronal ligado a MPTP. Sin embargo, no podemos excluir la posibilidad de que en el paso metabólico de MPTP a MPP<sup>+</sup> puedan formarse radicales libres con acción neurotóxica.

La importancia del estrés oxidativo en la muerte neuronal dopaminérgica cobra una relevancia capital al analizar el posible efecto tóxico que el tratamiento farmacológico con L-dopa puede tener sobre las neuronas dopaminérgicas. La dopamina, y en general las aminas, son la fuente más importante de radicales libres del organismo [36]. Por tanto, en la EP, en la que existe un aumento del *turnover* de dopamina, el tratamiento adicional con L-dopa aumentaría la producción de radicales libres hipotéticamente tóxicos. En cultivos de células dopaminérgicas la L-dopa ha demostrado ejercer una acción neurotóxica [37]. Sin embargo, los resultados *in vivo* sobre su posible acción neurotóxica son contradictorios [38,39]. Nuestro grupo ha demostrado que en un modelo animal de EP presintomática (lesión parcial nigroestriada) la administración de 150 mg/kg de L-dopa durante 8 semanas reduce de forma significativa el número de neuronas TH (+) en la sustancia negra [40]. Estos resultados no demuestran que el estrés oxidativo sea la causa de la muerte neuronal dopaminérgica, pero sugieren que en la EP las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra pueden experimentar un daño adicional en presencia de un exceso de formación de radicales libres. Además, obligan a replantear el tratamiento farmacológico de los pacientes parkinsonianos.

## **ESTRÉS OXIDATIVO Y MUERTE CELULAR MEDIADA POR REACCIONES INMUNES**

Las células gliales y los macrófagos pueden inducir estrés oxidativo y ser neurotóxicas para las neuronas. El mecanismo por el cual los macrófagos y la microglía producen una inhibición metabólica y finalmente la muerte neuronal no es conocido, pero parece que está relacionado con la liberación de sustancias endógenas, como citocinas y ácido araquidónico [41,42]. Recientemente, se ha postulado que la síntesis de óxido nítrico (NO) por parte de estas células puede contribuir e iniciar los efectos neurotóxicos e incluso la muerte neuronal [43]. La síntesis de NO se produce a través de la oxidación de L-arginina por NADH, catalizada por una monooxigenasa denominada óxido nítrico sintasa (NOS) [44]. La NOS no está localizada exclusivamente en los macrófagos y células de la microglía, sino que existe una gran variedad de células, incluyendo neuronas que contienen NOS [45]. En rata y primates no humanos, las técnicas de inmunocitoquímica han localizado neuronas NOS (+) en poblaciones neuronales específicas, tales como células granulares del cerebelo, neuronas del núcleo pedúnculo-pontino, neuronas espinosas grandes y medianas del estriado y córtex cerebral. A nivel de la sustancia negra, la densidad de neuronas NOS (+) es muy baja [46].

El mecanismo de toxicidad ligado al NO no está aclarado. Por un lado, la acción neurotóxica puede estar ligada al propio NO, ya que en cultivos celulares se ha demostrado que el NO inhibe directamente varios enzimas que contienen un complejo catalítico activo hierro-sulfuro e incluyen los complejos I, II y IV de la cadena transportadora de electrones, la enzima del ciclo del ácido cítrico-aconitasa y la enzima limitante de la replicación de DNA, ribonucleótido reductasa [47-49]. La capacidad de los macrófagos activados de inhibir los complejos hierro-sulfuro de estas enzimas así

como de sintetizar NO y la formación de complejos hierro-nitrosil en macrófagos citotóxicos activados, ha llevado a Lancaster et al a sugerir una interacción directa entre hierro y NO en los procesos de toxicidad ligados al NO [50].

Por otro lado, el NO como radical libre 'per se', es una molécula altamente reactiva que reacciona con oxígeno molecular y el anión superóxido [51]. Esta última reacción induce la formación del anión peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), molécula extremadamente reactiva con propiedades oxidantes potentes. El anión peroxinitrito se descompone a su vez en radical hidroxilo y dióxido de nitrógeno, los cuales son potentes activadores de la peroxidación lipídica [52]. Sin embargo, recientes observaciones en leucocitos humanos indican que el NO puede actuar neutralizando el radical superóxido y creando de esta manera una barrera química a los radicales libres citotóxicos [53]. Asimismo, experimentos en ratones transgénicos con expresión elevada de SOD han llevado a la conclusión de que SOD aumenta la toxicidad del oxígeno en el SNC al inhibir la inactivación del NO mediada por el anión superóxido.

## **EXCITOTOXICIDAD**

El concepto de muerte neuronal por excitotoxicidad fue acuñado por Olney [54] e implica dos formas paradójicas de acción de los aminoácidos excitatorios en el SNC. Por un lado, actúan como neurotransmisores excitatorios en un número importante de sinapsis y al mismo tiempo pueden ejercer una acción neurotóxica.

El término excitotoxicidad apunta la posibilidad de que neurotransmisores endógenos, como el glutamato, o neurotoxinas exógenas como β-N-oxalilamino-L-alanina (BOAA) puedan inducir un daño neuronal. Los dos tipos de receptores de aminoácidos excitatorios implicados en el proceso de toxicidad son los NMDA y AMPA. La estimulación excesiva de receptores NMDA por glutamato o agonistas NMDA, induce una entrada masiva de Ca<sup>2+</sup> al interior de la célula y la activación de enzimas específicos dependientes de calcio que producen la muerte celular. Por ejemplo, la activación de calpaína I y II induce alteraciones del citoesqueleto; la activación de proteínacina C y NOS conlleva la formación de radicales libres tóxicos y la activación de fosfolipasa A<sub>2</sub> produce la ruptura de los fosfolípidos de membrana. Los ácidos grasos liberados en este proceso, como el ácido araquidónico, alcanzan el espacio extracelular y son transformados a su vez en radicales libres, manteniéndose de esta manera un círculo vicioso de daño celular [57,58]. Por último, en un artículo reciente, White et al [59] han demostrado en cultivos celulares de hipocampo que la disfunción mitocondrial es el primer paso en el mecanismo de excitotoxicidad.

La activación de los receptores NMDA facilita además la entrada de iones Na<sup>+</sup> al interior de la célula; los cuales inducen una despolarización de la membrana celular que favorece la abertura de canales de calcio voltaje-dependientes de tipo L, aumentando de este modo el flujo de calcio al interior de la célula [60]. La excitotoxicidad se ha implicado como uno de los mecanismos responsables de la muerte neuronal en diferentes enfermedades degenerativas del SNC como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington y enfermedad de Parkinson [5]. La implicación de los aminoácidos excitatorios en la muerte neuronal dopaminérgica es aportada fundamentalmente por los hallazgos obtenidos en modelos experimentales de EP.

En 1989 Heikkila et al [61] describieron que el MK-801, antagonista no competitivo NMDA, bloqueaba la neurotoxicidad inducida por metanfetamina pero no protegía a las neuronas dopaminérgicas de la neurotoxicidad por MPTP. Posteriormente, diversos autores demostraron que los antagonistas NMDA podían prevenir la muerte neuronal dopaminérgica inducida por la administración de MPP<sup>+</sup> directamente en la sustancia negra [62]. Sin embargo, otros autores no han podido replicar estos resultados administrando MPTP por vía sistémica o al inyectar MPP<sup>+</sup> directamente en el estriado [63]. Aunque los resultados obtenidos en roedores son contradictorios, los hallazgos publicados en primates sugieren una participación directa de los aminoácidos excitatorios en la toxicidad dopaminérgica inducida por MPTP. Fornai et al [64] han demostrado recientemente en primates cinomolgus, que MK-801 y el antagonista competitivo ácido NMDA 3-[(+)-2-carboxipiperazin-4-il-propil]-fosfónico (CPP), reducen la depleción dopaminérgica estriatal inducida por MPTP, disminuyen la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra y el desarrollo de síntomas parkinsonianos. Por otro lado, se ha postulado que en la EP la hiperactividad del núcleo subtalámico (NST) podría ejercer una acción excitotóxica en los núcleos a los que proyecta, ya que utiliza como neurotransmisor ácido glutámico. Los principales núcleos de proyección del NST son el globus pallidus, en su porción lateral y medial, el núcleo pedúnculo-pontino y la sustancia negra pars reticulata. De este modo, la hiperfunción del NST podría hipotéticamente inducir un daño por excitotoxicidad en la sustancia negra. Recientemente, Pierrat et al [65] han demostrado, en roedores, que la lesión del NST previene la degeneración neuronal dopaminérgica inducida por inyección estriatal de 6-OHDA. Sin embargo, en nuestro laboratorio no hemos podido confirmar estos resultados en primates con subtalantomía previa a la administración de MPTP [66]. En este grupo de animales, la densidad de neuronas TH (+) en la sustancia negra homolateral a la lesión del NST no mostró diferencias significativas al compararla con el lado contralateral, aunque los animales desarrollaron un parkinsonismo asimétrico, con menor sintomatología parkinsoniana en el lado homolateral a la subtalantomía.

## **ALTERACIONES MITOCONDRIALES**

La cadena transportadora de electrones es esencial para la producción de ATP. Es un hecho conocido que el MPTP inhibe la NADH-ubiquinona reductasa (complejo I) de la cadena transportadora de electrones mitocondrial [67]. Diversos trabajos han descrito alteraciones similares del complejo I mitocondrial en la sustancia negra y plaquetas de pacientes parkinsonianos [68,69]. Aunque esta alteración no es específica de la EP, algunos autores han postulado que puede ser un marcador para individuos con alto riesgo de padecer la enfermedad [70].

Una deficiencia en el complejo I comprometería la síntesis de ATP y disminuiría las fuentes de energía celular para diversos procesos metabólicos como la síntesis de glutatión. Este mismo déficit se ha descrito en la EP y en animales intoxicados con MPTP, sugiriendo la posibilidad de que la deficiencia en el complejo I sea la causa común subyacente a la neurodegeneración en la EP. Por otro lado, estos hallazgos oscurecen el posible origen genético de esta enfermedad. El complejo I mitocondrial está compuesto por 25 polipéptidos de los cuales 7 están codificados por el DNA mitocondrial. El DNA mitocondrial es heredado por vía materna y no sigue un patrón de herencia mendeliano, sino que es distribuido de forma randomizada en el momento de la división celular. De este modo, un número desproporcionado de DNA mitocondrial

'enfermo' podría ser asignado de forma individual a las células en el momento de su división. Por otro lado, el DNA mitocondrial experimenta un número de mutaciones 10 veces superior a las del DNA nuclear y es particularmente vulnerable a toxinas exógenas o de producción endógena. Todo ello apunta la posibilidad de que el daño mitocondrial con posterior alteración de la síntesis de ATP, pueda ser el mecanismo común que conduzca a la muerte neuronal en la enfermedad de Parkinson a través de diferentes procesos: producción de radicales libres, toxinas exógenas o de producción endógena o factores genéticos [70,71].

## **APOPTOSIS**

La apoptosis (muerte celular programada) es un proceso activo genéticamente controlado, de suicidio o autodestrucción celular. Cuando este sistema se activa, se producen una serie de eventos característicos que incluyen: retracción celular y pérdida de contacto con células vecinas, condensación y fragmentación de la cromatina y abombamiento de la membrana celular [72]. Posteriormente, las células son degradadas a unas partículas rodeadas de membrana (cuerpos apoptóticos) que contienen fragmentos nucleares, orgánulos citoplasmáticos y citoplasma residual. Los cuerpos apoptóticos son rápidamente fagocitados por los macrófagos, evitando así una reacción inflamatoria [73].

Este modelo de muerte celular fue descrito por primera vez por Wyllie en timocitos y posteriormente se ha observado en otros tipos celulares incluyendo neuronas [74]. La apoptosis desempeña un papel muy importante en el desarrollo del sistema nervioso central. Sin embargo, es posible, teóricamente, que una activación anormal de este programa de muerte celular pueda estar implicado en la patogénesis de diferentes enfermedades degenerativas de inicio en la edad adulta como la EP.

Wick et al [75] demostraron que la L-dopa y dopamina tienen una acción anticancerosa y tóxica sobre células de melanoma in vitro e in vivo. Este efecto fue atribuido a una acción genotóxica. De este modo, la DA probablemente a través de metabolitos oxidativos produce un daño sustancial en el DNA que se manifiesta por ruptura de sus cadenas y modificaciones de sus bases. Además, su genotoxicidad está incrementada por la actividad inhibitoria sobre otras vías enzimáticas responsables de los procesos de reparación de DNA, como DNA polimerasa, ribonucleótido reductasa y timidilato sintasa. De esta forma, la L-dopa puede producir directamente daño en el DNA e interferir en los procesos de reparación.

La aparición de fragmentación apoptótica de DNA en la muerte neuronal inducida por diversos agentes apunta la posibilidad de que ésta sea meramente una consecuencia de los mecanismos anteriores que inducen a las células a morir o, por el contrario, que sea la causa directa de la muerte celular. Aunque este punto no ha sido resuelto, existe evidencia que implica a la apoptosis como causa primaria de muerte neuronal. En primer lugar, se ha detectado fragmentación intranucleosomal de DNA en cultivos de células PC12 y neuronas simpáticas [76]. Por otro lado, el ácido aurintricarboxílico, inhibidor de la endonucleasa, previene la fragmentación apoptótica de DNA e inhibe la muerte celular inducida por la deprivación de NGF en células PC12 y la producida por glutamato en células corticales [77].



Si consideramos la posibilidad de que la fragmentación apoptótica de DNA por la endonucleasa es la causa primaria de la muerte celular, resulta de gran interés conocer los mecanismos de regulación de la actividad de la endonucleasa en diferentes condiciones que conducen a la muerte neuronal. A este respecto se han sugerido varias hipótesis. En primer lugar es posible que las diferentes condiciones que provocan la muerte celular induzcan la síntesis de endonucleasas, las cuales al expresarse darían lugar a la fragmentación de DNA y posterior muerte celular [78]. Otra posibilidad es que las endonucleasas se expresen de forma constitutiva en las células pero que éstas se activen únicamente en condiciones permisivas [79]. Por ejemplo, determinadas endonucleasas son activadas por calcio [80], por tanto situaciones que comprometan el normal funcionamiento mitocondrial, como el estrés oxidativo o mecanismos de excitotoxicidad que producen un incremento de la concentración intracelular de calcio, podrían inducir una activación de endonucleasas y en consecuencia una muerte celular por apoptosis. Por último, es posible que los mecanismos de regulación de muerte celular apoptótica no sean dependientes de la activación de endonucleasas, sino que el DNA de determinadas células tenga una mayor susceptibilidad a la fragmentación por las mismas [81].

Aunque en cultivos celulares existe amplia evidencia de que determinadas toxinas o agresiones externas pueden inducir una muerte celular apoptótica, no significa necesariamente que este sea el único mecanismo implicado en la degeneración neuronal que ocurre en enfermedades como la EP [82] o la enfermedad de Alzheimer [83]. Sin embargo, podría hipotetizarse que en determinadas circunstancias la exposición temprana a una determinada toxina o alteraciones del funcionamiento mitocondrial, como las descritas en la EP, activen el programa de muerte celular apoptótica y contribuyan de esta manera a la progresión de la enfermedad [84,85].

### **Addendum**

La importancia del NO como factor ligado a la degeneración de las neuronas dopaminérgicas ha sido demostrada recientemente. Por un lado, Hunot et al [86] han descrito un incremento en la expresión de NOS inducible en las células gliales de la sustancia negra de pacientes parkinsonianos y el inhibidor selectivo de la NOS neuronal 7-Nitroindazole (7-NI) reduce de forma significativa la neurotoxicidad inducida por MPTP en roedores y primates [87,88]

### **BIBLIOGRAFÍA**

1. Agid Y, Javoy-Agid F, Ruberg M. Biochemistry of neurotransmitters in Parkinson's disease. In Marsden CE, Fahn S, eds Movement Disorders. London: Butterworth and Co. Publishers; 1987. p. 166-230.
2. Duvoisin RC. Etiology of Parkinson's disease: current concepts. Clin Neuropharmacol 1986; 9 (Suppl 1): S3-S11.
3. Parker WD, Boyson SJ, Parks JK. Abnormalities of the electron transport chain in idiopathic Parkinson's disease. Ann Neurol 1989; 26: 719-23.

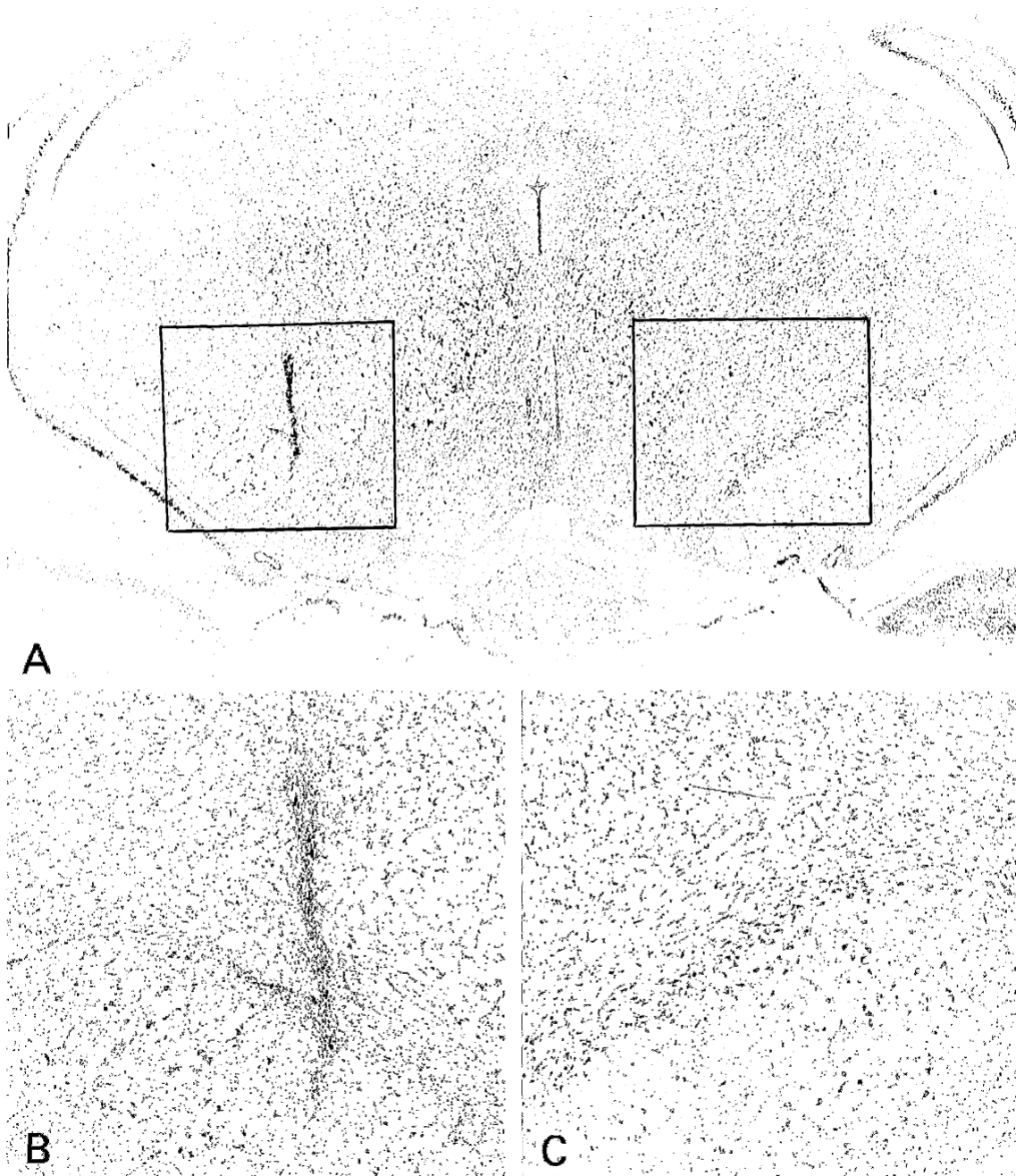
4. Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin Y. Chronic parkinsonism in humans due to a product of meperidine analog synthesis. *Science* 1983; 219: 979-80.
5. Olanow WC. A radical hypothesis for neurodegeneration. *TINS* 1993; 16: 439-44.
6. Kish SJ, Shajnak K, Hornykiewicz O. Uneven pattern of dopamine loss in the striatum of the patients with Parkinson's disease. *N Eng J Med* 1988; 318: 876-80.
7. Dexter DT, Carter CJ, Wells FR, et al. Basal lipid peroxidation in substantia nigra is increased in Parkinson's disease. *J Neurochem* 1989; 52: 381-9.
8. Götz ME, König G, Riederer P, Youdim MBH. Oxidative stress: free radical production in neural degeneration. *Pharmac Ther* 1994; 63: 37-122.
9. Sofic E, Riederer P, Heinsen H, et al. Increased iron (III) and total iron content in post mortem substantia nigra of parkinsonian brain. *J Neural Transm* 1988; 74: 199-205.
10. Fahn S, Cohen G. The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease. Evidence supporting it. *Ann Neurol* 1992; 32: 804-12.
11. Lange KW, Youdim MBH, Riederer P. Neurotoxicity and neuro-protection in Parkinson's disease. *J Neural Transm* 1992; 38 (Suppl): 27-44.
12. Jenner P. Oxidative stress as a cause of Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand* 1991; 136 (Suppl 1): 6-15.
13. Ceballos I, Lafon M, Javoy-Agid F, et al. Superoxide dismutase and Parkinson's disease. *Lancet* 1990: 1035-36.
14. Javoy-Agid F. Factors associated to dopaminergic cell death in Parkinson's disease. In Fuxe K, Agnati LF, Bjelke B, Ottoson D, eds. *Trophic regulation of the basal ganglia. Focus on dopamine neurons*. Pergamon; 1996. p. 89-100.
15. Damier P, Hirsch E, Javoy-Agid F. Glutathion peroxidase, glial cells and Parkinson's disease. *Neuroscience* 1993; 32: 1-6.
16. Marttila RJ, Lorentz H, Rinne UK. Oxygen toxicity protecting enzymes in Parkinson's disease. *J Neuro Sci* 1988; 86: 321-33.
17. Perry TL, Yong WW. Idiopathic Parkinson's disease progressive supranuclear palsy and glutathion metabolism in the substantia nigra of patients. *Neurosci Lett* 1986; 67: 269-74.
18. Saggiu H, Cooksey J, Dexter D, et al. A selective increase in particulate superoxide dismutase activity in parkinsonian substantia nigra. *J Neurochem* 1989; 53: 692-97.
19. Ambani LM, van Voert MH, Murphy S. Brain peroxidase and catalase in Parkinson's disease. *Arch Neurol* 1975; 32: 114-18.
20. Scheinberg IH, Sternlieb Y. *Wilson's disease*. Philadelphia: Saunders; 1984.
21. Birchall J, Chappel I JS. Aluminium, chemical physiology and Alzheimer's disease. *Lancet* 1988; II: 1008-10.
22. Barbeau A. Manganese and extrapyramidal disorders. (A critical review and tribute to Dr. Georges C. Cotzias). *Neurotoxicology* 1984; 5: 13-36.
23. Horovitz CT, Bondy SC. The effect of ions on free radical formation in lung and brain of rats. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis* 1994; 8: 167-71.
24. Korytowsky W, Sarna T, Zarba M. Antioxidant action of neuromelanin: the mechanism of inhibitory effect on lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 1995; 319: 142-8.
25. Dexter DT, Carayon A, Yavoy-Agid F, et al. Alterations in the levels of iron, ferritine and other trace metals in Parkinson's disease and other

- neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia. *Brain* 1991; 114: 1953-75.
26. Bomford AB, Munro HN. Transferrin and its receptors: their roles in cell function. *Hepatology* 1985; 5: 870-5.
  27. Hirsch EC, Brandel JP, Galleg P, et al. Iron and aluminium increase in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease: an X-ray microanalysis. *J Neurochem* 1991; 56: 446-51.
  28. Halliwell B, Gutteridge JMC. Iron and free radical reactions: two aspects of antioxidant protection. *Trends Biol Sci* 1986; 11: 1372-75.
  29. Ben-Chachar D, Eshel G, Finberg JPM, Youdim MBH. The iron chelator desferoxamine (desferal) retards 6-hydroxydopamine-induced degeneration of nigrostriatal neurons. *J Neurochem* 1991; 56: 1441-44.
  30. Luquin MR, Domínguez J, del Río L, et al. N-acetyl-cysteine reduces dopaminergic neuronal death induced by 6-OHDA. *Mov Disord* 1996; 11 (Suppl D): 144.
  31. Heikkila RE, Cohen G. Further studies on generation of hydrogen peroxide by 6-hydroxydopamine: potentiation by ascorbic acid. *Mol Pharmacol* 1978; 8: 241-48.
  32. Gerlach M, Riederer P, Przuntek H, Youdim MBH. MPTP mechanisms of neurotoxicity and their implications for Parkinson's disease. *Eur J Pharmacol* 1991; 208: 273-86.
  33. Chiueh CC, Mikaye H, Peng MT. Role of dopamine autoxidation, hydroxyl radical generation and calcium overload in underlying mechanism involved in MPTP-induced parkinsonism. In Narabayashi H, Nagatsu T, Yanagisawa N, Mizuno Y, eds. *Advances in Neurology. Parkinson's disease: from Basic Research to Treatment*. New York: Raven Press; 1993. p. 251-58.
  34. Adams JD, Klaidman LK, Leung AC. MPP<sup>+</sup> and MPDP<sup>+</sup> induced oxygen radical formation with mitochondrial enzymes. *Free Rad Biol Med* 1993; 15: 181-86.
  35. Luquin MR, Zbarsky V, del Río L, et al. Desferoxamine does not protect against MPP<sup>+</sup>-induced toxicity in rats. *Mov Disord* 1996; 11 (Suppl 1): 144.
  36. Spencer TS, Parker WD, Bennet J. L-dopa increases nigral production of hydroxyl radicals in vivo: potential L-dopa toxicity? *Neuroreport* 1994; 5: 1009-11.
  37. Pardo B, Mena MA, Fahn S, García de Yébenes J. Ascorbic acid protects against levodopa-induced neurotoxicity on a catecholamine rich human neuroblastoma cells. *Mov Disord* 1993; 8: 278-84.
  38. Blunt SB, Jenner P, Marden CD. Suppressive effect of L-dopa on dopamine cells remaining in the ventral tegmental area of rats previously exposed to the neurotoxin 6-Hydroxydopamine. *Mov Disord* 1993; 8: 129-33.
  39. Perry TL, Yong VW, Ito M, et al. Nigrostriatal dopaminergic neurons remain undamaged in rats given high doses of levodopa+carbidopa chronically. *J Neurochem* 1984; 43: 990-3.
  40. Del Río L, Huici M, Saldise L, et al. Evidence for neurotoxicity of L-dopa in vivo. XIIth International Symposium on Parkinson's disease. London, 1997.
  41. Giulian ME, Vaca K, Noonan CA. Secretion of neurotoxins by mono-nuclear phagocytes infected with HIV-1. *Science* 1990; 250: 1593-6.
  42. Thery C, Chamak B, Mallat M. Cytotoxic effect of brain macrophages on developing neurons. *Eur J Neurosci* 1991; 3: 1155-64.
  43. Dawson TM, Dawson VL, Snyder SH. A novel neuronal messenger molecule in brain: the free radical, nitric oxide. *Ann Neurol* 1992; 32: 297-311.

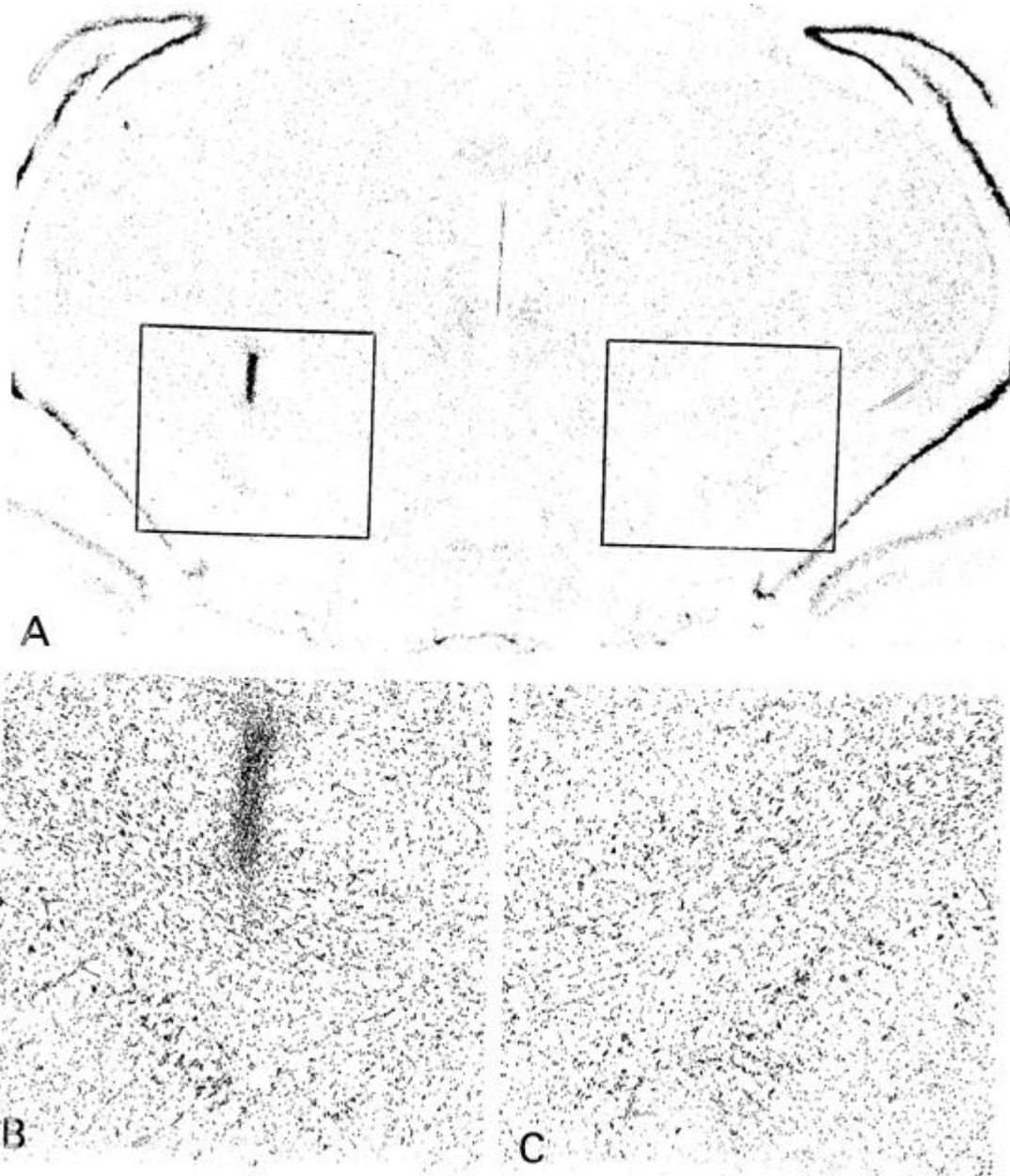
44. McCall T, Vallance P. Nitric oxide takes center stage with newly defined roles. *Trends Pharmacol Sci* 1991; 13: 1-6.
45. Brecht DS, Hwang PM, Snyder SH. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 1990; 347: 768-69.
46. Satoh K, Arai R, Ikemoto K, et al. Distribution of nitric oxide synthase in the central nervous system of *Macaca Fuscata*: subcortical regions. *Neuroscience* 1995; 66: 685-96.
47. Cleeter MWJ, Cooper JM, Darleyusmar VM, et al. Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide-implications for neurodegenerative diseases. *FEBS Lett* 1994; 345: 50-4.
48. Granger DL, Lehinger AL. Sites of inhibition of mitochondrial electron transport in macrophage-injured neoplastic cells. *J Cell Biol* 1982; 95: 527-35.
49. Drapier JC, Hibbs JB Jr. Differentiation of murine macrophages to express nonspecific cytotoxicity for tumor cells results in L-arginine-dependent inhibition of mitochondrial iron-sulfur enzymes in the macrophage effector cells. *J Immunol* 1988; 40: 2829-38.
50. Lancaster JR, Hibbs JB Jr. Demonstration of iron-nitrosyl complex by cytotoxic activated macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 1223-7.
51. Oury TD, Ho YS, Piantadosi CA, Crapo JD. Extracellular superoxide dismutase, nitric oxide and central nervous system O<sub>2</sub> toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 9715-9.
52. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, et al. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 1620-4.
53. Rubanyi GM, Ho EH, Cantor EH, et al. Cytoprotective function of nitric oxide: inactivation of superoxide radicals produced by human leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 181: 1392-7.
54. Olney JW. Neurotoxicity of excitatory amino acids. In McGeer EG, Olney JW, eds. *Kainic acid as a tool in neurobiology*. New York: Raven Press; 1978. p. 95-121.
55. Coyle JT, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. *Science* 1993; 262: 689-95.
56. Olney JW. Excitatory amino acids and neuropsychiatric disorders. *Biol Psychiatry* 1989; 26: 505-25.
57. Stella N, Tence M, Glowinski J, Premont D. Glutamate-evoked release of arachidonic acid from mouse brain astrocytes. *J Neurosci* 1994; 14: 568-75.
58. Luquin MR, Jiménez-Jiménez FJ, Martínez-Vila E, et al. Muerte neuronal: la cascada de procesos y sus interrelaciones. *Neurología* 1996; 11 (Supl 3): 71-8.
59. White RJ, Reynolds IJ. Mitochondrial depolarization in glutamate-stimulated neurons: an early signal specific to excitotoxin exposure. *J Neurosci* 1996; 16: 5688-97.
60. Mayer ML, Miller RJ. Excitatory amino acids receptors, second messengers and regulation of intracellular Ca<sup>2+</sup> in mammalian neurons. In Lodge D, Collingridge G, eds. *The Pharmacology of excitatory amino acids: A TIPS Special Report*. Cambridge: Elsevier; 1990. p. 36-42.
61. Sonsalla PK, Nicklas WJ, Heikkila RE. Role of excitatory amino acids in methamphetamine-induced nigrostriatal dopaminergic toxicity. *Science* 1989; 243: 398-400.

62. Turski L, Bressler K, Retting KJ, et al. Protection of substantia nigra from MPP<sup>+</sup> neurotoxicity by N-methyl-D-aspartate antagonists. *Nature* 1991; 349: 414-8.
63. Sonsalla PK, Zeevalk GD, Manzino L, et al. MK-801 fails to protect against the dopaminergic neuropathology produced by systemic 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mice or intranigral 1-methyl-4-phenylpyridinium in rats. *J Neurochem* 1992; 58: 1979-82.
64. Fornai F, Vaglini F, Maggio R, et al. Excitatory amino acids and MPTP toxicity. In Battistin L, Scarlato T, Caraceni T, Ruggeri S, eds. *Advances in Neurology*. New York: Raven Press; 1996. p. 167-73.
65. Piallat B, Benazzouz A, Benabid AL. Subthalamic nucleus lesion in rats prevents dopaminergic nigral neuron degeneration after striatal 6-OHDA injection: behavioural and immunohistochemical studies. *Eur J Neurosci* 1996; 8: 1408-14.
66. Saldise L, del Río L, Alegre M, et al. Subthalamic nucleus lesion does not prevent dopaminergic neuronal death induced by MPTP in primates. XIIth International Symposium on Parkinson's disease. Poster 31. Londres 23-26 marzo 1997. *Mov Disord* 1997; 12 (Suppl U): 9.
67. Nicklas WJ, Vyas Y, Heikkila RE. Inhibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *Lif Sci* 1985; 36: 2503-8.
68. Schapira AHV, Cooper JM, Dexter D, et al. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Lancet* (letter) i: 1269.
69. Parker WD, Boyson SJ, Parks JK. Abnormalities of the transport chain in idiopathic Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1989; 26: 719-23.
70. Olanow CW. Mechanisms of cell death in Parkinson's disease with special reference to free radicals. In Agid Y, ed. *Current trends in the treatment of Parkinson's disease*. John Libbey & Co. Ltd; 1991. p. 2936.
71. Richter C, Park JW, Ames BN. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988; 85: 6465-67.
72. Steller H. Mechanism and genes of cellular suicide. *Science* 1995; 267: 1445-48.
73. Raff MC, Barres BA, Burne FJ, et al. Programmed cell death and the control of cell survival: lesson from the nervous system. *Science* 1993; 262: 695-700.
74. Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 1980; 284: 555-57.
75. Wick MM. Levodopa/dopamine analogs as inhibitors of DNA synthesis in human melanoma cells. *J Invest Dermatol* 1989; 92: 329S-31S.
76. Edwards SN, Buckmaster AE, Tolkovsky AM. The death program in cultured sympathetic neurons can be suppressed at the level of posttranslational level by nerve growth factor, cyclic AMP and depolarization. *J Neurochem* 1991; 57: 2140-3.
77. Batistatou A, Greene LA. Aurintricarboxylic acid rescue PC12 cells and sympathetic neurons from cell death caused by nerve growth factor deprivation, correlation with suppression of endonuclease activity. *J Cell Biol* 1991; 115: 461-71.
78. Kure S, Tominaga T, Yoshimoto T, et al. Glutamate triggers inter-nucleosomal DNA cleavage in neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 179: 39-45.
79. Greene LA. Intracellular mechanisms underlying the causes and prevention of neuronal cell death. In Collins RC, eds. *Neurochemistry of Cell Death*. New York: American Academy of Neurology; 1993. p. 14679.

80. McConkey DJ, Harzell P, Nicotera P, Orrenius S. Calcium-activated DNA fragmentation kills immature thymocytes. *FASES J* 1989; 3: 1843-9.
81. Evan GI, Wyllie AH, Gilbert CS. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* 1992; 69: 119-28.
82. Loo TD, Copani A, Pike CJ, et al. Apoptosis is induced by  $\beta$ -amyloid in cultured central nervous system neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 7951-55.
83. Mochizuki H, Nakamura N, Nishi K, Mizuno Y. Apoptosis is induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 tetrahydropyridinium ion (MPP<sup>+</sup>) in ventral-mesencephalic-striatal co-culture in rat. *Neurosci Lett* 1994; 170: 191-94.
84. Walkinshaw G, Waters CM. Neurotoxin-induced cell death in neuronal PC12 cells is mediated by induction of apoptosis. *Neuroscience* 1994; 63: 975-87.
85. Hartley A, Stone JM, Heron C, et al. Complex I inhibitors induce dose-dependent apoptosis in PC12 cells: relevance for Parkinson's disease. *J Neurochem* 1994; 65: 1987-90.
86. Hunot S, Boissieri F, Faucheaux B, Brugg B, Mouatt-Prigent A, Hirsch EC. Nitric oxide synthase and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Neuroscience* 1996; 72: 355-63.
87. Przedborski S, Jackson-Lewis V, Yokoyama R, Shibata T, Dawson VL, Dawson TM. Role of neuronal nitric oxide in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 tetrahydropyridine (MPTP)-induced dopaminergic neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 7.
88. Hantraye P, Brouillet E, Ferrante R, Palfi S, Dotan R, Mattews RT, et al. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase prevents MPTP-induced parkinsonism in baboons. *Nat Med* 1996; 2: 965-6.

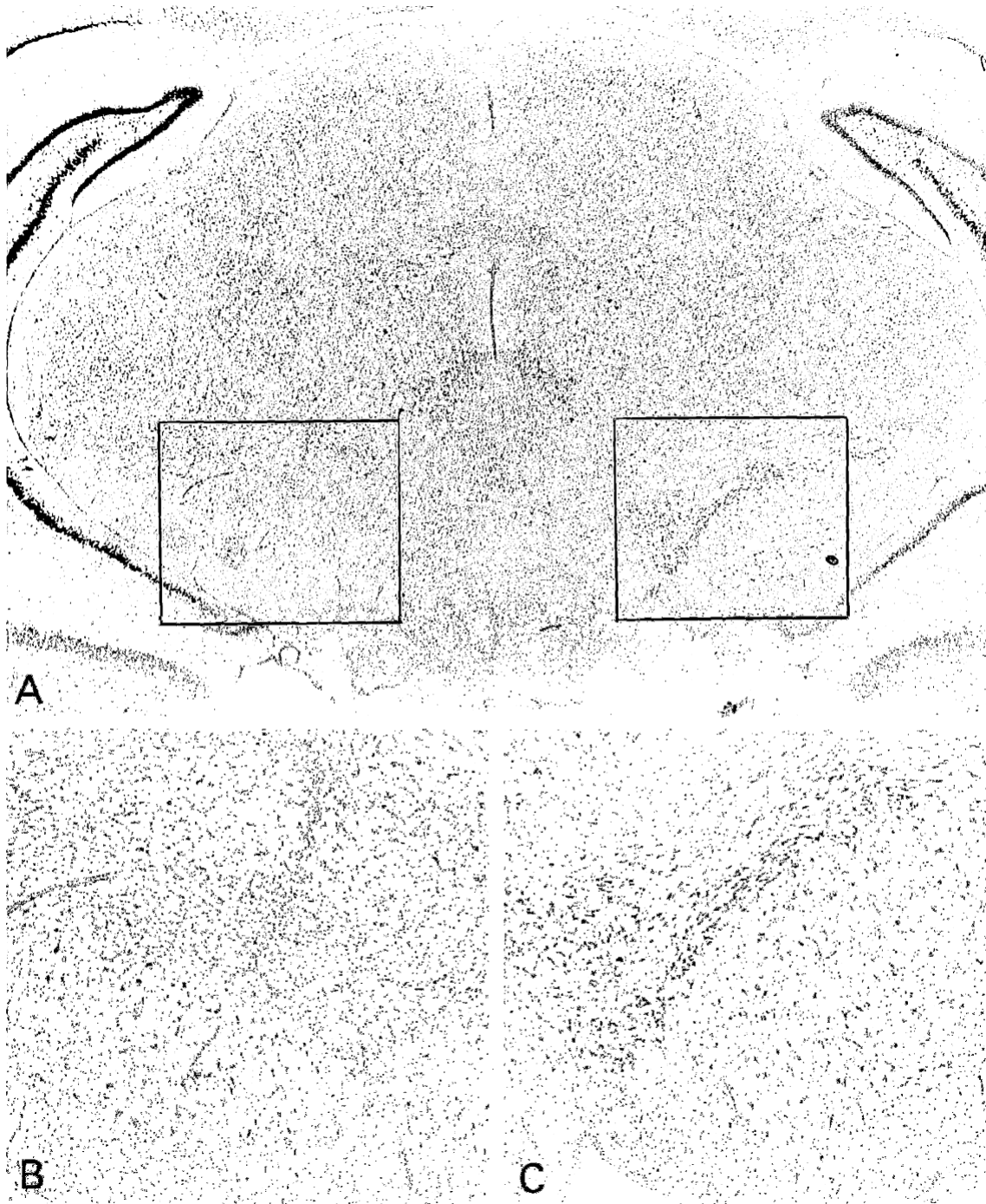


**Figura 1.** A. Sección del cerebro de una rata teñido con tionina en el que se observa la SN a nivel de la inyección de 6-OHDA en un animal tratado con salino. B. Detalle de la SN homolateral a la lesión. C. Detalle de la SN contralateral a la lesión.

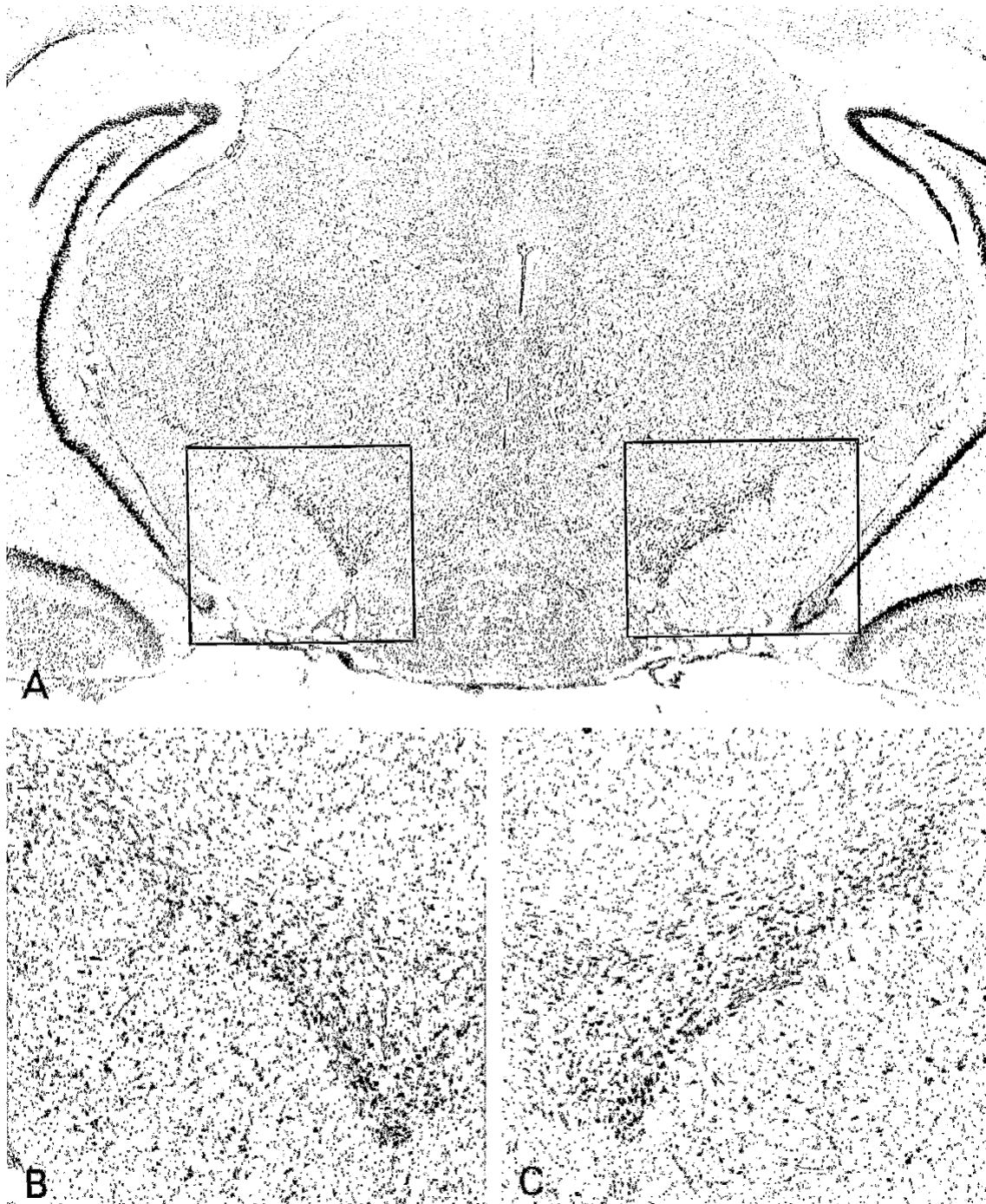


**Figura 2.** A. Sección del cerebro de una rata tratada con NAC teñido con tionina en el que se observa la SN a nivel de la inyección de 6-OHDA. B. SN homolateral. C. SN contralateral.

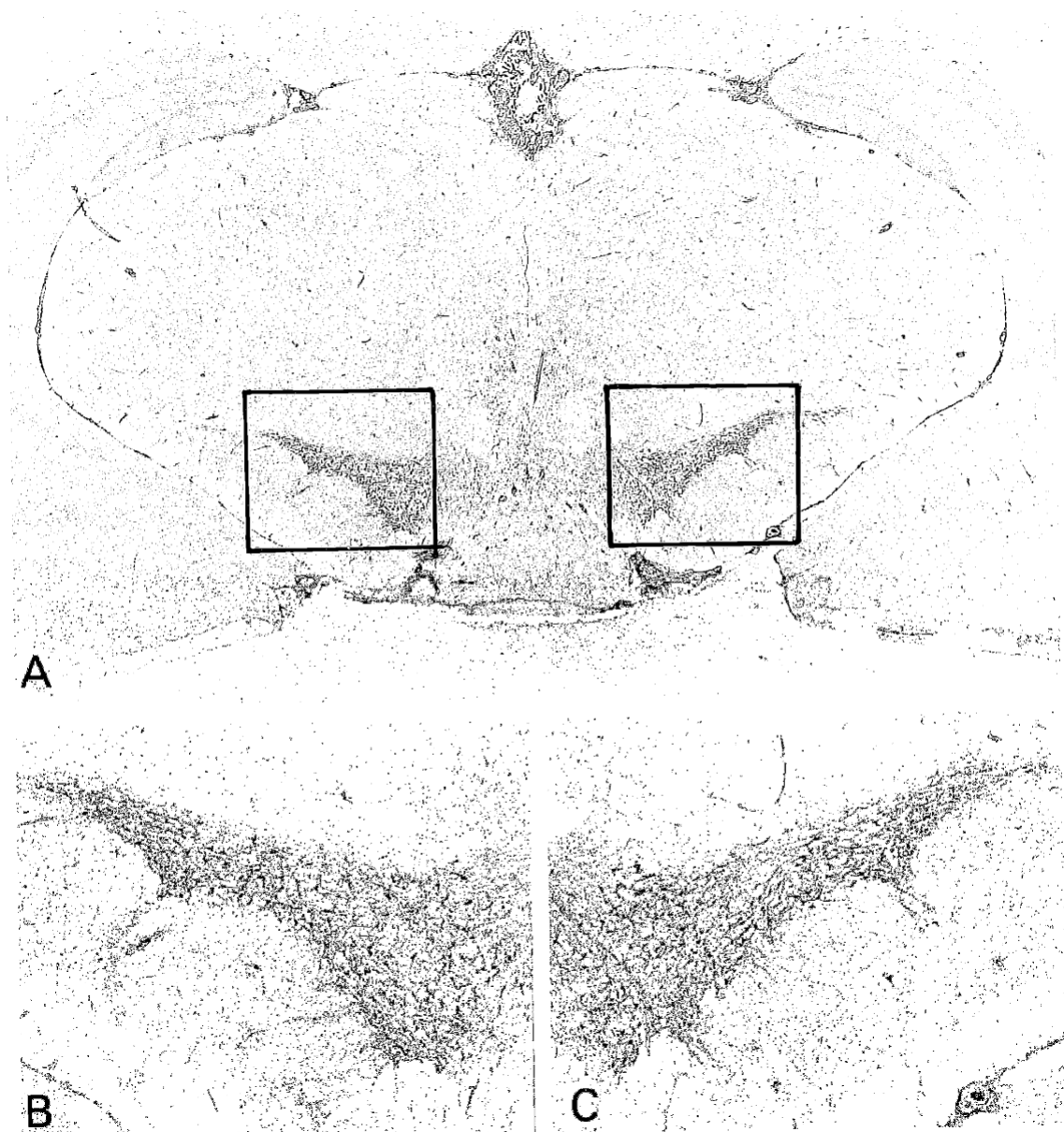




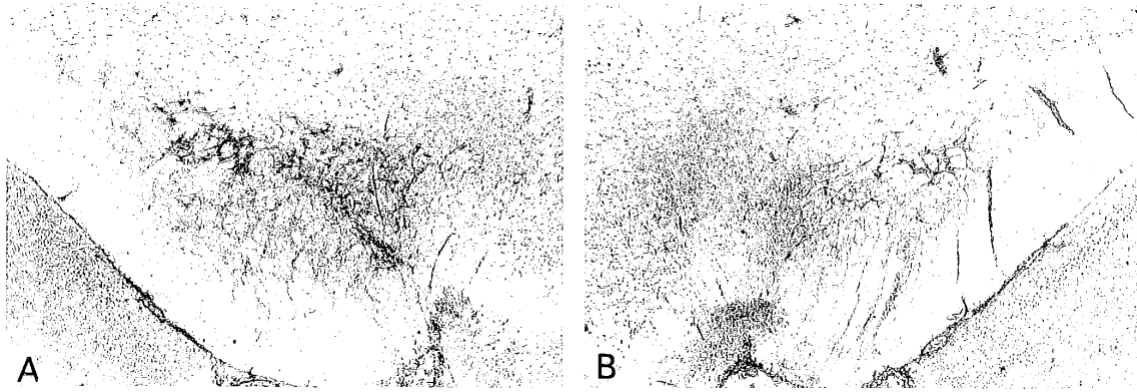
**Figura 3.** A. Sección paralela a la de la figura 1 teñido con tionina. Se observa una disminución de células en la SN homolateral a la lesión. B. Detalle de la SN homolateral. C. Detalle de la SN contralateral.



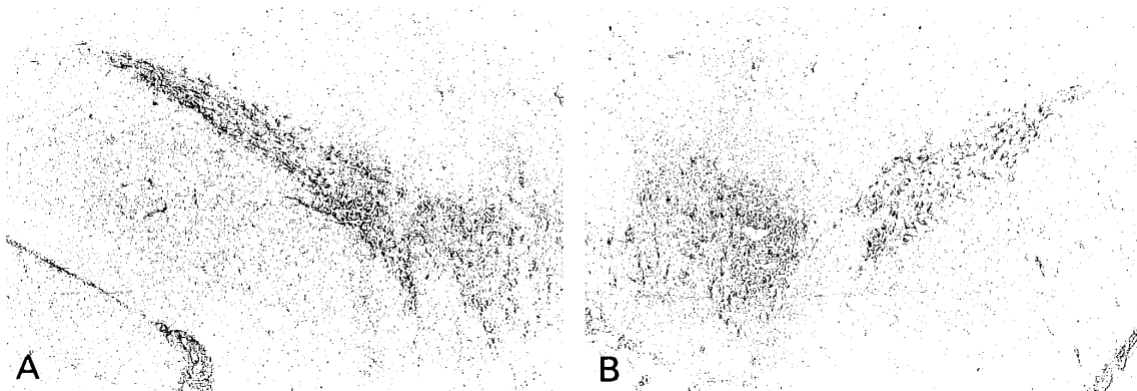
**Figura 4. A.** Sección paralela a la de la figura 2 teñido con tionina. No se observan diferencias entre la SN homolateral a la lesión (**B**) y contralateral (**C**).



**Figura 5.** A. Sección del cerebro de una rata control teñido inmunocitoquímicamente con un anticuerpo anti-TH. Se observan teñidas las neuronas DA de la SN. B. Detalle de la SN derecha. C. Detalle de la SN izquierda.



**Figura 6.** Sección del cerebro de una rata con lesión de SN inducida por inyección de  $MPP^+$  en estriado y tratada con salino. Las neuronas DA se han identificado mediante la tinción específica con un anticuerpo anti-TH. La SN contralateral al lado de la inyección (**A**) tiene un número de células similar a la control, mientras que en la homolateral (**B**) existe una disminución en el número de neuronas TH (+).



**Figura 7.** Sección del cerebro de una rata con lesión de SN inducida por inyección de  $MPP^+$  en estriado y tratada con desferrioxamina. La SN contralateral al lado de la inyección (**A**) muestra un número de neuronas TH (+) similar al control mientras que la SN homolateral (**B**) presenta una disminución significativa de neuronas TH (+) igual que la correspondiente a los animales tratados con salino.