



## **TRABAJO FIN DE MÁSTER DE NEUROCIENCIA**

# **Estudio de las propiedades inhibitoras MAO-A y MAO-B de nuevos derivados cumarínicos de interés para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson**

*Estudo das propiedades inhibitoras MAO-A e MAO-B de novos derivados cumarínicos de interese para o tratamento da enfermidade de Parkinson*

*Study on the MAO-A and MAO-B inhibitory properties of a series of new coumarin derivatives for the treatment of Parkinson's disease*

**Beatriz Aguiar Louzao**

**Curso 2015-2016**

**D. RAMÓN SOTO OTERO Y DÑA. ESTEFANÍA MARÍA SALOMÉ MÉNDEZ ÁLVAREZ, CATEDRÁTICOS DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA**

**HACEN CONSTAR QUE:**

**Doña Beatriz Aguiar Louzao** ha realizado bajo nuestra dirección el Trabajo Fin de Máster en Neurociencia, titulado **“Estudio de las propiedades inhibitoras MAO-A y MAO-B de nuevos derivados cumarínicos de interés para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson”**, y que dicho trabajo reúne todos los requisitos exigidos para ser presentado para su valoración por la comisión correspondiente.

En Santiago de Compostela, a 30 de mayo de 2016



**Ramón Soto Otero**

Catedrático de Bioquímica y Biología  
Molecular



**Estefanía M. S. Méndez Álvarez**

Catedrática de Bioquímica y Biología  
Molecular



**Beatriz Aguiar Louzao**

Alumna del Máster en Neurociencia

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	4
1.1. Enfermedades neurodegenerativas y enfermedad del Parkinson .....	4
1.2. Metabolismo de la dopamina .....	7
1.3. MAO y estrés oxidativo .....	9
1.4. Tratamientos de la enfermedad del Parkinson.....	13
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	17
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	18
3.1. Reactivos químicos.....	18
3.2. Derivados cumarínicos .....	18
3.3. Animales.....	18
3.4. Obtención de preparaciones mitocondriales de cerebro de rata .....	19
3.5. Determinación de la concentración de proteínas en preparaciones mitocondriales .....	20
3.6. Determinación de la actividad de la monoamino oxidasa .....	22
<b>4. RESULTADOS</b> .....	24
<b>5. DISCUSIÓN</b> .....	30
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	32
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	32

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Enfermedades neurodegenerativas y enfermedad del Parkinson

Las enfermedades neurodegenerativas son desórdenes ligados a enfermedades y anomalías cerebrales (Kim y cols., 2012). Tienen un componente crónico y experimentan procesos acumulativos de pérdida de función neuronal que conllevan la muerte del afectado (Jameel y cols., 2015). El aumento de la población se relaciona con una mayor esperanza de vida y mayor incidencia de enfermedades como la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson (PD). La Parkinson's Disease Foundation estima que actualmente hay 10 millones de personas afectadas por la enfermedad de Parkinson en el mundo ([http://www.pdf.org/en/parkinson\\_statistics](http://www.pdf.org/en/parkinson_statistics)).

La pérdida de neuronas en regiones específicas del cerebro resulta en diferentes enfermedades neurodegenerativas, comprendiendo la enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica (ALS) y enfermedad de Parkinson entre otras. Estas enfermedades son perniciosas y difíciles de detectar cuando comienzan, desarrollándose de forma progresiva y con un curso que no puede ser retardado (Jameel y cols., 2015).

La neurodegeneración se da como resultado de disfunción y muerte neuronal, debido a degeneración axonal/dendrítica y ruptura de las transmisiones sinápticas. Los síntomas más comunes de las enfermedades neurodegenerativas son la demencia, desórdenes del movimiento y enfermedades de las neuronas motoras (Skovronsky y cols., 2006).

La etiología molecular exacta de las enfermedades neurodegenerativas continúa siendo desconocida, a pesar de que se han propuesto múltiples hipótesis a lo largo del tiempo. Muchos de los rasgos patológicos compartidos entre estas enfermedades proporcionan una base robusta para la búsqueda de compuestos capaces de combatir la toxicidad inducida por glutamato, compuestos antiinflamatorios y neurotrópicos, así como inhibidores de las monoamino oxidasas.

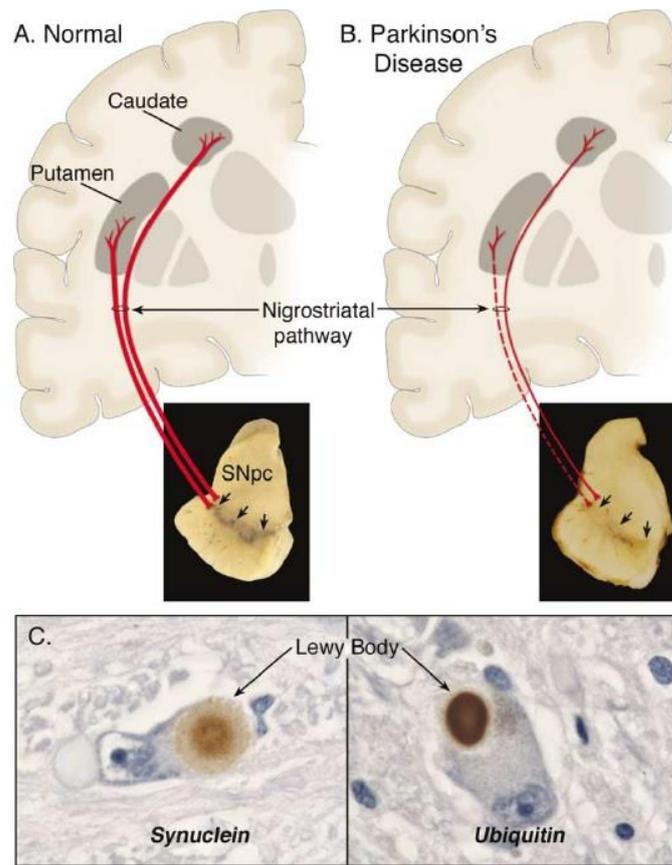
Hasta la fecha, una enorme cantidad de moléculas han sido relacionadas con alteraciones citoarquitectónicas de neuronas en enfermedades neurodegenerativas. El mecanismo elemental de muerte celular en desórdenes degenerativos se asocia a procesos biológicos como el estrés oxidativo, que contribuye a la disfunción de proteínas y su acumulación. Otros, están relacionados con determinantes endógenos como los radicales

libres -que originan estrés oxidativo- o el glutamato, que daña a las neuronas debido a su exotoxicidad. También debe a defectos mitocondriales, inactivación glutamatérgica e incluso mecanismos de inmunodeficiencia (Jameel y cols., 2016).

La enfermedad de Parkinson es una de las principales patologías de carácter neurodegenerativo, siendo descrita por primera vez en el año 1817 por el médico inglés James Parkinson (Parkinson, 1817). Describió la enfermedad como un “movimiento tembloroso involuntario, con pérdida de fuerza muscular en partes que no están en acción, e incluso cuando sirven de apoyo, tendencia a doblar el tronco hacia delante y dificultades para cambiar el paso de marcha a carrera; los sentidos y el intelecto no están afectados”. Posteriormente, Jean-Marie Charcot modificó la descripción de la sintomatología, destacando el temblor en reposo, la rigidez, alteraciones en el equilibrio y la lentificación en los movimientos, y la denominó “enfermedad de Parkinson” en honor a James Parkinson (Goetz, 2002).

La enfermedad de Parkinson constituye actualmente la segunda enfermedad neurodegenerativa más común, tras la enfermedad de Alzheimer (Fahn y Przedborski, 2000; Tanner y Aston, 2000). Se estima que afecta al 1-2% de la población por encima de los 65 años (Alves y cols., 2008). Muchas de las enfermedades neurodegenerativas, especialmente la enfermedad de Parkinson, son consecuencia de la formación de especies de oxígeno reactivo (ROS) y/o de disfunciones mitocondriales en el cerebro.

La característica fundamental de la enfermedad de Parkinson es el daño que se produce en el sistema dopaminérgico nigroestriatal (Fig. 1A,B) debido a la pérdida de cuerpos celulares de neuronas situadas en la sustancia negra *pars compacta* (Greenfield y Bosanquet, 1953). Como estas neuronas proyectan sus axones hacia el estriado (Corrodi, 1971), esta pérdida da lugar a una destacada disminución en el contenido de dopamina a nivel estriatal (Hornykiewicz, 1966; Marsden, 1982). La sintomatología del Parkinson incluye bradicinesia, temblor en reposo, rigidez muscular, marcha festinante y postura en flexión, puede acompañarse de síntomas no motores, que incluyen alteraciones autonómicas, sensitivas, del sueño, cognitivas y psiquiátricas. Por estos motivos, es considerada actualmente como un proceso neurodegenerativo multisistema (Zhou y cols., 2008). Otra de las características fundamentales de la enfermedad de Parkinson es la presencia de inclusiones citoplasmáticas proteínicas intraneuronales, denominadas cuerpos de Lewy (Fig. 1C).



**Figura 1.** Representación esquemática mostrando las características más destacadas de la neuropatología de la enfermedad de Parkinson. Imagen tomada de Dauer y Przedborski (2003).

El diagnóstico de la enfermedad de Parkinson se hace en base a datos clínicos, pero para un diagnóstico preciso será necesaria la identificación de dos hechos: una pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra *pars compacta* y la presencia de cuerpos de Lewy (Dauer y Przedborski, 2003). Sin embargo, los cuerpos de Lewy no son exclusivos de la enfermedad de Parkinson, ya que también están presentes en la enfermedad de Alzheimer (Gibb y Lees, 1988). Los cuerpos de Lewy son agregados esféricos de proteínas citoplasmáticas, compuestos por numerosos tipos de proteínas:  $\alpha$ -sinucleína, parkin, ubiquitina y neurofilamentos. Se encuentran presentes en todas las áreas cerebrales afectadas (Forno, 1996; Spillantini y cols., 1998).

Las neuronas del sistema nigroestriatal tienen su cuerpo celular localizado en la sustancia negra *pars compacta*, proyectando sus axones principalmente hacia el putamen. Dado que estas neuronas poseen un alto contenido de neuromelanina (Marsden, 1983), la pérdida de estas producida en la enfermedad de Parkinson, es la responsable de uno de los rasgos neuropatológicos de esta enfermedad; la despigmentación observada en la sustancia

negra *pars compacta* (Fig. 1A-B). Esta despigmentación va siempre acompañada de una disminución en la expresión de mRNA del transportador de dopamina (DAT) (Uhl y cols., 1994), llevando asociada una disminución en los niveles de dopamina en la región dorsolateral del putamen (Bernheimer y cols., 1973), lugar de proyección de estas neuronas. Al comienzo de la sintomatología de la enfermedad, la disminución en los niveles de dopamina en el putamen es de un 80%, habiéndose perdido un mínimo del 60% de estas neuronas.

Aunque la vía nigroestriatal es la más afectada en la enfermedad de Parkinson, todas las vías dopaminérgicas ascendentes degeneran aunque en distinta cuantía (Hornykiewicz y Kish, 1987). Así, las neuronas del sistema mesolímbico, cuyos cuerpos celulares se encuentran en el área tegmental ventral en contacto con la sustancia negra *pars compacta*, se ven menos afectadas. Como consecuencia de ello, hay una disminución menor en los niveles de dopamina en núcleo caudado (Price y cols. 1978), lugar de proyección para dichas neuronas (Fig. 1A-B).

## **1.2. Metabolismo de la dopamina**

La dopamina es un neurotransmisor catecolaminérgico que se genera, al igual que la adrenalina y la noradrenalina, a partir de su precursor, la tirosina. Aunque la dopamina (DA) es un neurotransmisor esencial para el correcto funcionamiento del cerebro, una parte sustancial de esta se produce fuera del cerebro en órganos mesentéricos (Eisenhofer y cols., 1997). La síntesis de DA se da en una reacción de dos pasos en el citosol de neuronas catecolaminérgicas. Empieza con la hidroxilación de L-tirosina por medio de la tirosina hidroxilasa (TH) para formar L-DOPA (Figs. 2 y 3). Esta oxidación está fuertemente regulada y depende de la tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>) como cofactor, sintetizada a partir de guanosina trifosfato (GTP) (Meiser y cols., 2013). La descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (AADC) ejerce sobre DOPA una descarboxilación para convertirlo en DA.

Hay una ruta alternativa (Fig. 3) de biosíntesis para la DA, que se ha demostrado en rata. Está mediada por el citocromo P-450, y en ella la descarboxilación precede a la hidroxilación. De este modo, la tirosina se descarboxila a tiramina y luego esta se hidroxila a DA (Hiroi y cols., 1998; Bromek y cols., 2011).



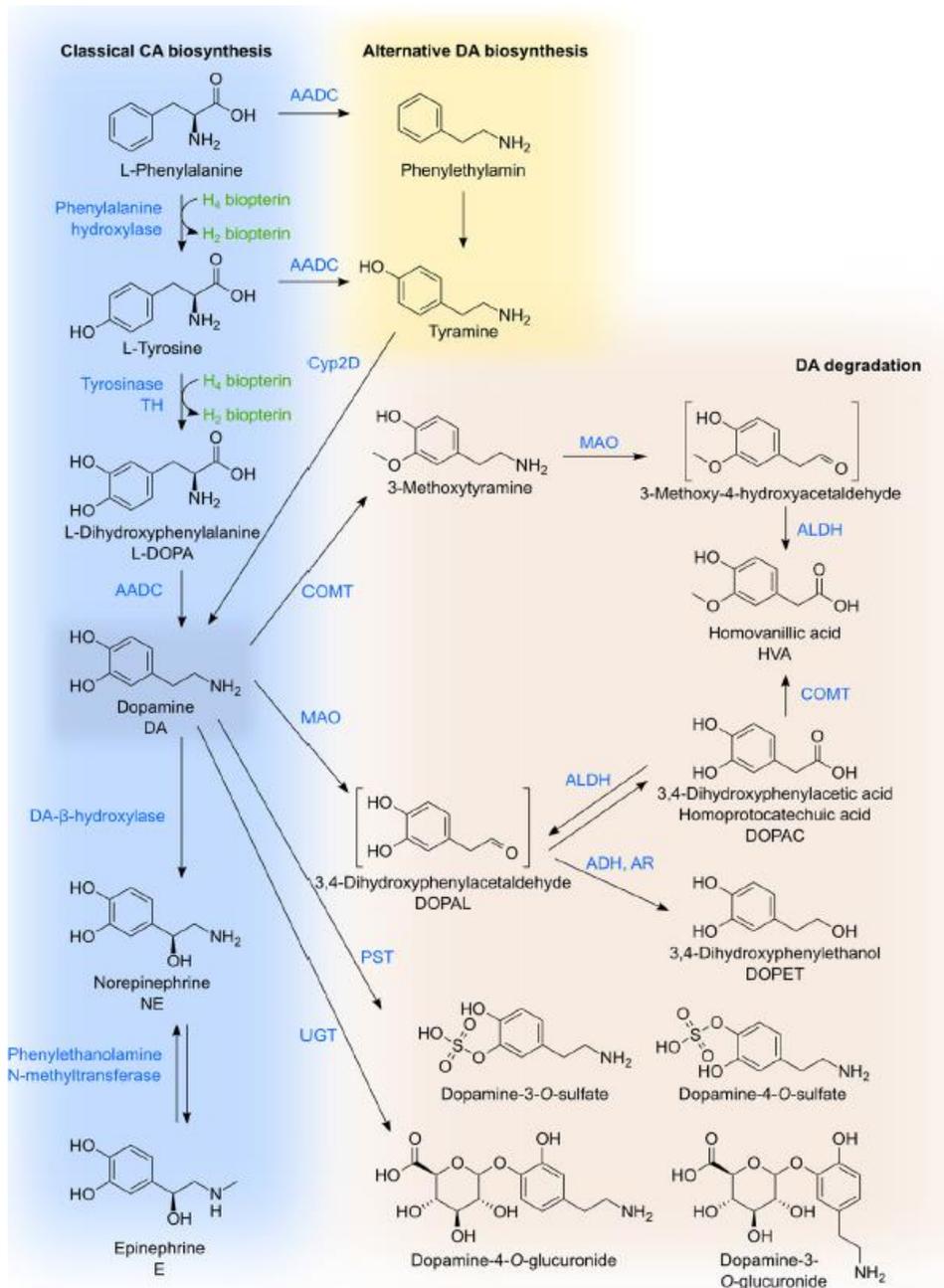
peróxidos de hidrógeno y la especie reactiva DOPAL, pudiendo ser inactivada mediante su reducción a alcohol DOPET o por su oxidación a DOPAC, gracias a la alcohol deshidrogenasa (ADH) o a la aldehído deshidrogenasa (ALDH). En condiciones normales, DOPAL se oxida a DOPAC, mientras que la conversión a DOPET tiene una ocurrencia mucho menor (Eisenhofer *et cols.*, 2004).

Las células gliales también se encargan de absorber la DA del espacio sináptico y la degradan vía MAO e incluso COMT. La 3-O-metilación por COMT produce ácido homovalínico (HVA), uno de los principales productos de degradación de DA. COMT opera en las células gliales, pero no hay actividad de esta enzima en las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales (Myöhänen *et cols.*, 2010).

Los principales productos de degradación de DA son DOPAC y HVA. DA y DOPA pueden sufrir una oxidación para dar quinonas reactivas (Q) y especies reactivas de oxígeno (ROS), formando así toda una serie de compuestos neurotóxicos, con un gran potencial neurodegenerativo (Meiser *et cols.*, 2013).

### **1.3. MAO y estrés oxidativo**

En 1928, Mary Hare-Bernheim describió una enzima que catalizaba la desaminación oxidativa de la tiramina, a la cual denominó tiramina oxidasa. Unos pocos años después, Hugh Blaschko descubrió que tanto la tiramina oxidasa como la noradrenalina oxidasa y amina oxidasa alifática eran en realidad la misma enzima, responsable de metabolizar aminas primarias, secundarias y terciarias. Sin embargo, esta enzima no era capaz de metabolizar diaminas (como la histamina). Fue Zeller quien empezó a llamarla Monoamina Oxidasa (MAO; EC 1.4.3.4) (Youdim *et cols.*, 1988; 2005). En la década de 1930, Blaschko, que estaba estudiando la síntesis de catecolaminas, fue consciente de la importancia de esta enzima en la inactivación de sustratos tales como la noradrenalina, adrenalina, tiramina y dopamina.

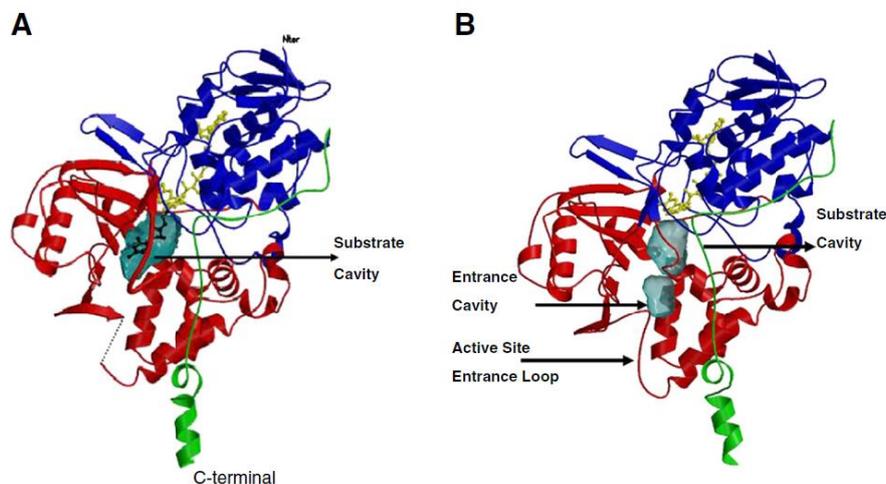


**Figura 3.** Biosíntesis y degradación de DA. Imagen de Meiser y cols. (2013).

A finales de los sesenta se descubrió que la MAO no era una única enzima, sino que podrían existir al menos dos formas que tenían un pH óptimo diferente y una sensibilidad diferente para su inactivación por calor (Fig. 4). Estas dos formas diferían también a nivel farmacológico, especificidad de sustrato e inhibidores, además están codificadas por dos genes separados, que se encuentran localizados en el cromosoma X (Xp11.13) (Finberg, 2014). La MAO A era inhibida por la clorgilina y metabolizaba preferentemente noradrenalina, mientras que la MAO B era resistente a la clorgilina y poseía mayor afinidad por bencilaminas como

sustratos (Johnston, 1968). Tanto la tiramina como la dopamina son igualmente metabolizadas por ambas formas isoenzimáticas (Youdim y cols., 2005). Pronto se descubrió que ambas isoformas estaban distribuidas desigualmente en el cerebro de mamíferos, habiendo una mayor cantidad de MAO B en los ganglios basales. Estos descubrimientos sugieren que el mapeo de la distribución de ambas isoformas, combinado con el uso de inhibidores selectivos, podría ser la base para tratamientos de Parkinson, depresión y otras enfermedades neuropsiquiátricas, sin los efectos secundarios tan peligrosos de la inhibición no selectiva (Youdim y cols., 1972).

La MAO es una enzima mitocondrial que realiza la desaminación oxidativa de varias monoaminas, entre las que se encuentran la serotonina, catecolaminas, DA, noradrenalina y adrenalina. Esto es importante para mantener el estado mental normal (Sullivan y cols., 2004). La gran afinidad de MAO B por bencilaminas y feniletilaminas (Ma y cols 2004) remarca su importancia en la destrucción de monoaminas para dar lugar a la desactivación de neurotransmisores. De este modo, la regulación de MAO B es responsable del enraizado interés de fármacos MAO en el campo de las enfermedades neurodegenerativas y en especial en Parkinson (Riederer y cols., 2004; Guay, 2006).

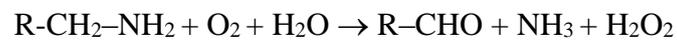


**Figura 4.** Estructuras moleculares de MAO A y MAO B y los lugares de unión a aminos. (A) Diagrama de las unidades monoméricas de MAO A humana y MAO B (B). En verde; dominio de membrana. Azul; dominio de unión a la flavina. Rojo; Dominio de unión al sustrato. Amarillo; Mitad covalente de la flavina. Imagen tomada de Finberg (2014).

La distribución de la MAO por tejidos periféricos, tales como intestino, hígado, pulmones y placenta, hace pensar que protege al cuerpo contra las aminos oxidantes de la sangre, evitando que entren en la circulación (Youdim y cols., 2006). Se ha propuesto que ambas formas de MAO, tanto en el sistema nervioso central (SNC) como periférico (SNP)

protegen a las neuronas de las aminos exógenas, terminan la señalización sináptica de monoaminas neurotransmisoras y regula la cantidad de aminos almacenadas intracelularmente.

La MAO es una flavoproteína que generalmente se encuentra en la membrana externa de las mitocondrias de células gliales y neuronas (Tipton, 1986; Novaroli y cols., 2006; Binda y cols., 2007). Está presente en la mayor parte de los tejidos de mamíferos bajo dos isoformas (MAO A y MAO B), siendo más abundante en terminales nerviosas noradrenérgicas. Las dos isoenzimas son capaces de oxidar la dopamina, aunque la MAO B es la más abundante en el cerebro humano (Youdim y cols., 2006; Meiser, 2013). La oxidación del sustrato puede resumirse como:



Los productos de la reacción inicial incluyen aldehídos y  $\text{H}_2\text{O}_2$ , que tienen un potencial tóxico alto. En el caso de aminos primarias, se produce amonio y en el de aminos secundarias y terciarias da lugar a productos nitrogenados. Los productos aldehídos son rápidamente metabolizados por enzimas y los radicales libres que se producen son neutralizados por superóxido dismutasa (SOD), catalasas o anti-oxidantes endógenos como el glutatión (Finberg, 2014). La posibilidad de que enzimas que normalmente neutralizan estos productos tóxicos puedan de por sí ser disfuncionales bajo condiciones patológicas del Parkinson ha llevado a pensar que una actividad excesiva o incluso normal de MAO puede ser causa potencial de estrés oxidativo (Jenner, 2003).

El estrés oxidativo (daño oxidativo) procede de la oxidación de lípidos, DNA y proteínas con ROS y radicales libres (cualquier especie química que contiene electrones desapareados y por consiguiente es altamente reactiva) tales como radicales hidroxilo, radicales peróxidos y óxidos nítricos. Los ROS son considerados como los principales responsables de la pérdida neuronal en PD (Migliore y Coppede, 2009)

Las ROS puede reaccionar con componentes celulares esenciales que se hallen próximos, tales como fosfolípidos de membrana, proteínas y ADN, oxidándolos, y de este modo dando lugar a una variada gama de efectos perjudiciales. En el caso de las proteínas, las ROS pueden oxidar directamente restos de aminoácidos, lo que conduce a la pérdida de su función proteica. Dentro de las neuronas, interfieren en la transducción de señales, así como en la expresión de genes, afectando a la supervivencia celular. El daño oxidativo es algo que ocurre continuamente en todos los tejidos, existiendo un nivel basal de daño al ADN,

fosfolípidos de membrana y proteínas (Halliwell, 2006). Sin embargo, bajo condiciones fisiológicas normales, las ROS son rápidamente eliminadas por los sistemas antioxidantes de que disponen los organismos vivos. Bajo determinadas circunstancias, la producción de ROS puede superar la capacidad de los sistemas de defensa antioxidante, provocando estrés oxidativo –desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes, que conduce a una alteración en la señalización redox y en el control del daño molecular– (Sies y Jones, 2007).

Debido a la alta actividad metabólica y a la baja defensa celular, en relación con otros órganos, se considera que el cerebro es especialmente vulnerable a los efectos dañinos ocasionados por las ROS. En un adulto, el cerebro consume el 20% del oxígeno basal, esto es muy alto para un órgano de tan bajo peso. Este alto consumo de oxígeno es debido a las necesidades que tiene el cerebro de ATP para mantener la homeostasis iónica intraneuronal, con la continua apertura y cierre de los canales iónicos necesarios para generar y propagar potenciales de acción. Para producir ATP, las mitocondrias cerebrales consumen un 80% del oxígeno del cerebro. En este proceso, un cierto número de electrones se fugan la cadena de transporte electrónico mitocondrial y van a parar al oxígeno, con lo que se forma el anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), que por acción de la superóxido dismutasa (SOD) genera  $H_2O_2$ . Por medio de la reacción de Fenton, que tiene lugar en presencia de  $Fe^{2+}$ , el  $H_2O_2$  formado generará el radical  $\bullet OH$ , que como es sabido constituye el radical libre más dañino para los sistemas biológicos. Es por este motivo por el que se considera que la cadena de transporte electrónico mitocondrial constituye la principal fuente natural de ROS.

La dopamina puede reaccionar con el oxígeno molecular, dando lugar a la formación de  $O_2^{\bullet-}$  y la correspondiente *p*-quinona. Tal como se indicó anteriormente, el  $O_2^{\bullet-}$  formado producirá también  $H_2O_2$  y  $\bullet OH$ , contribuyendo a aumentar el estrés oxidativo. A partir de la *p*-quinona tendrán lugar una serie de reacciones de ciclación y polimerización, que acabarán formando un pigmento oscuro denominado neuromelanina, que será la que pigmenta a las neuronas dopaminérgicas.

#### **1.4. Tratamientos de la enfermedad del Parkinson**

El equipo de Carlsson identificó la falta de dopamina estriatal como la causa principal de los síntomas motores parkinsonianos (Carlsson y cols., 1957; Carlsson y cols., 1958; Bertler y Tosergrén, 1959). Desde entonces, los tratamientos de PD se han centrado en “corregir” el

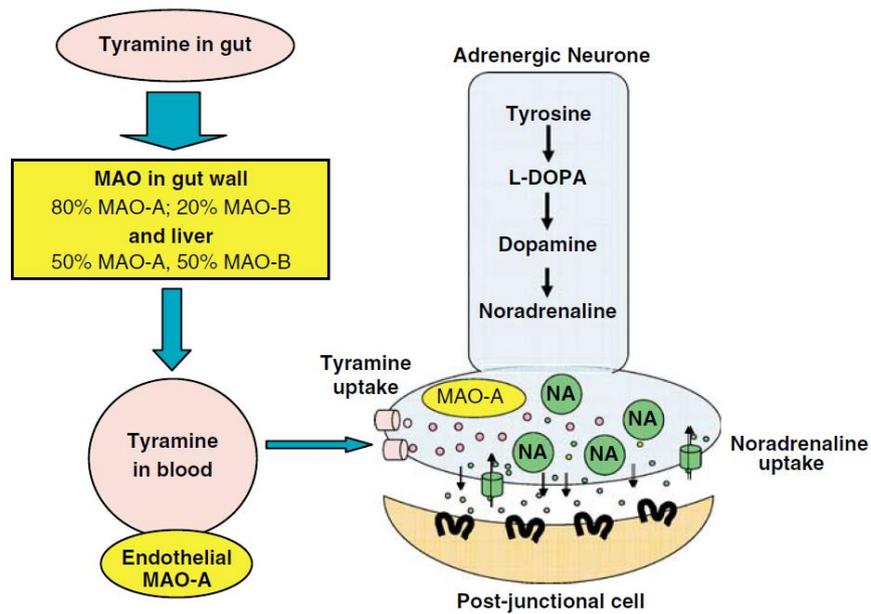
déficit dopaminérgico, aliviando de este modo los síntomas motores de la enfermedad. El tratamiento con levodopa –precursor dopaminérgico– se introdujo poco después del descubrimiento de la pérdida nigroestriatal dopaminérgica en la enfermedad del Parkinson, revolucionando su tratamiento (Birkmayer y Hornykiewicz, 1961; Barbeau y cols., 1962).

Poco después de la introducción de la levodopa como tratamiento, se hizo evidente que aplicada sola, tenía grandes limitaciones debido a la escasa biodisponibilidad, la necesidad de un período de ajuste muy lento hasta alcanzar efectos sintomáticos significativos y la ocurrencia de efectos secundarios. El hecho de que la levodopa sufre una conversión metabólica a dopamina DA a nivel periférico, es la mayor de las limitaciones (Hauser, 2009; Nagatsu y cols., 2009). Esto hace que tenga una biodisponibilidad muy limitada y una escasa tolerabilidad. Por ello se desarrollaron fármacos capaces de inhibir la actividad de la enzima dopa descarboxilasa (DDC) a nivel periférico, aumentando de este modo la cantidad capaz de alcanzar el cerebro, mejorando la seguridad y tolerabilidad del tratamiento (Hauser, 2009; Nagatsu y cols., 2009). Desde entonces, la L-dopa se administra siempre con un inhibidor de DDC (DDCIs).

Sin embargo, el uso de levodopa trajo consigo nuevos retos en el tratamiento de PD, debido al desarrollo de complicaciones motoras a largo plazo; movimientos involuntarios –disquinesias– (Cotzias y cols., 1969). La aparición de complicaciones, condujo al uso de agonistas de receptores de dopamina en el curso temprano de la enfermedad porque tenían efectos antiparkinsonianos con un riesgo más bajo de efectos secundarios (Corrodi y cols., 1973; Calne y cols., 1974a, b). Esto fue confirmado más tarde en ensayos a gran escala aunque quedó claro que el uso de agonistas de receptores de dopamina no está libre de efectos indeseados. A veces dan lugar a un mayor número de complicaciones no motoras en comparación con las que se observan en los tratamientos de levodopa; desórdenes psiquiátricos, náuseas, psicosis, somnolencia y fatiga (Nisipeanu y Korczyn, 2008).

De forma casi paralela al desarrollo de DDCIs, se trató de potenciar el efecto a nivel central de la L-dopa, previniendo la degradación de la dopamina por parte de la enzima monoamino oxidasa (MAO) junto con el uso de inhibidores no selectivos de la enzima catalizadora de dopamina a ácido dihidroxifenilacético (DOPAC). Se vieron efectos secundarios asociados al uso de estos inhibidores no selectivos (MAO A y MAO B), produciendo el conocido “*efecto queso*” (Fig. 5). El llamado efecto queso se produce cuando personas que toman inhibidores no selectivos de MAO (IMAO), mezclan estos medicamentos con alimentos ricos en tiramina (queso azul, ahumados, vino tinto o alimentos escabechados),

provocando una reacción hipertensiva por la ingestión de tiramina. Estas crisis pueden incluir hipertermia elevada, irritabilidad del SNC (sistema nervioso central), hiperreflexia, convulsiones, coma y muerte.



**Figura 5.** El “efecto queso”- potenciación de los efectos cardiovasculares de la tiramina mediante a inhibición irreversible de MAO. Normalmente, la tiramina procedente de la dieta sufre un primer paso de inactivación por medio de la actividad de MAO (ambas isoformas) tanto en el hígado como en el intestino. La tiramina que no se degrada, pasa a la circulación sistémica y ahí es atenuada por la MAO presente en el endotelio vascular y pulmonar (Bakhle, 1990). En la neurona adrenergica, la captación de tiramina inicia la liberación de noradrenalina, responsable de los efectos miméticos que ejerce la tiramina sobre el sistema simpático. La inhibición irreversible de MAO A, la forma periférica predominante, provoca que aumente enormemente la cantidad de tiramina y que entre en el sistema circulatorio y, desde ahí, a las neuronas adrenergicas que aumentan la liberación de noradrenalina y el efecto de esta. Los inhibidores reversibles de MAO A (RIMAs) son sustituidos por la tiramina en la enzima y de este modo, se puede metabolizar con normalidad, evitando que la tiramina circulatoria alcance niveles dañinos como ocurre con los irreversibles. Imagen tomada de Youdim y Bakhle (2006).

Con el desarrollo de inhibidores selectivos de MAO B, se empezó a usar en terapia en combinación con L-dopa, junto con DDCIs. Siendo la selegilina, y más recientemente la rasagilina, los fármacos más usados en el tratamiento de la enfermedad, ya sea combinados o solos (Youdim y cols., 2006).

Los pacientes sometidos a tratamientos de L-dopa y DDCIs, terminan por desarrollar tarde o temprano, fluctuaciones en la respuesta terapéutica. Lo más común es que se de un “wearing-off”, que se manifiesta por un acortamiento del efecto de la dosis de L-dopa. Se relaciona con una menor vida media del fármaco en sangre y la pérdida progresiva de la capacidad de tamponamiento del sistema, dando como resultado una mayor pérdida de células dopaminérgicas (Olanow y cols., 2006). Para prevenir el metabolismo periférico de L-dopa y

de esta forma, incrementar la duración de sus efectos terapéuticos, se empezaron a usar inhibidores de catecol-O-metiltransferasa (COMTIs) (Hauser, 2009; Nagatsu y Sawada, 2009) ya que el metabolismo de L-dopa a 3-O-metil-dopa (3OMD) es la segunda ruta de degradación principal (Nagatsu y Sawada, 2009). Dentro del grupo de COMTIs, la Tocalpona fue el primer fármaco que se usó en terapia, pero al producir toxicidad en el hígado, se restringió su uso en multitud de países (Nutt, 1998; Watkins, 2000). En paralelo se desarrollaron otros inhibidores de COMT, que se consideran exentos de toxicidad; entacapona (Nutt, 1998).

Un punto de inflexión en el tratamiento de PD avanzado fue el descubrimiento de la implicación del circuito de ganglios basales en el desarrollo de la enfermedad. Esto renovó el interés por el uso de cirugías como forma de terapia para PD (Bergman y cols., 1990; Laitinen y cols., 1992; Limousin y cols., 1995a, b). A pesar de que los cirujanos optaron primeramente por técnicas ablativas, el tratamiento quirúrgico más usado en pacientes con Parkinson avanzado es la estimulación cerebral profunda (Benabid y cols., 2009a, b). En los últimos años se han publicado una cantidad de efectos secundarios importantes como consecuencia de este procedimiento, siendo estos de origen no motor; depresión, psicosis, confusión y desórdenes de control, pudiendo ser debidos a la incorrecta colocación de los electrodos en el núcleo subtalámico (STN).

El trasplante de tejido dopaminérgico se consideró como una posible terapia (Brunding y cols., 2010). Sin embargo, parece que este tratamiento no tiene un futuro prometedor debido a la falta de efectividad y la aparición de efectos secundarios en ensayos clínicos a gran escala (Freed y cols., 2001; Olanow y cols., 2003). Hay un creciente interés en el uso de células madre como tratamiento para PD. De momento, el uso de este método en humanos está limitado debido a la regulación y control de seguridad al que están sometidas estas técnicas (Li y cols., 2008).

En los últimos años se están desarrollando nuevos tratamientos genéticos que incluyen el uso de vectores virales para reemplazar enzimas o aumentar los niveles de factores de crecimiento en regiones específicas del cerebro de pacientes de PD (Bjorklund y Kirik, 2009; Bjorklund y cols., 2010a, b; Bjorklund y Kordower, 2010; Rangasamy y cols., 2010).

Todos los procedimientos terapéuticos arriba citados, tienen como propósito el tratamiento de los síntomas motores y son el foco de atención del desarrollo de terapias. Está claro, sin embargo, que el Parkinson va mucho más allá del sistema dopaminérgico

nigroestriatal, habiendo síntomas no motores tales como discapacidades cognitivas, demencia, psicosis, disfunción autónoma incluso en estadios iniciales de la enfermedad que contribuyen a numerosos déficits (Chaudhuri *y cols.*, 2006, 2011; Chaudhuri y Schapira, 2009; Kasten *y cols.*, 2010; Lim y Lang, 2010; Poewe, 2010; Wood *y cols.*, 2010; Bassetti, 2011).

Debido a que muchos de estos síntomas no solo no responden sino que son exacerbados por las terapias tradicionales de reemplazo de dopamina, técnicas de estimulación cerebral o ablación del núcleo subtalámico, desarrollar farmacoterapia capaz de paliar estos síntomas a la vez que se reducen los síntomas motores, representa uno de los mayores retos en neurociencia.

Otro hecho importante sobre las terapias actuales de PD, es que no reducen la tasa de pérdida de neuronas dopaminérgicas y por lo tanto, no afectan al curso de la enfermedad. Hasta la fecha, los intentos por generar neuroprotección en humanos, han sido infructuosos.

## **2. OBJETIVOS**

Teniendo en cuenta las reconocidas limitaciones de los fármacos actualmente en uso para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, el objetivo principal de este TFM ha sido la búsqueda experimental de nuevos compuestos inhibidores selectivos MAO-B, que puedan ser propuestos como posibles fármacos para el tratamiento de la sintomatología de esta enfermedad. Posteriormente se tratará de dotar a estas sustancias de propiedades neuroprotectoras, para que corrijan los efectos secundarios de las terapias hasta ahora en uso. Para la consecución de este objetivo general, se establecerán los siguientes objetivos concretos:

- 1) Valoración de la actividad inhibidora MAO-B de una serie de compuestos cumarínicos de nueva síntesis, con el fin de identificar inhibidores MAO-B potentes, que garanticen una elevación significativa de los niveles cerebrales de dopamina por inhibición de su degradación. Es importante mantener dosis bajas de fármaco.
- 2) Valoración de la actividad inhibidora MAO-A, con el fin de comprobar que los compuestos elegidos (inhibidores MAO-B) tengan una baja capacidad inhibidora MAO-A. Garantizando así que sean inhibidores específicos MAO-B, y evitando de este modo los graves efectos secundarios atribuidos a los inhibidores inespecíficos MAO.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. Reactivos químicos

Los reactivos usados en este estudio fueron los indicados en la siguiente tabla:

Ácido clorhídrico (FlukaChemie AG, Buchs, Suiza)	Fosfato potásico monobásico, anhidro (Merck KGaA)
Ácido fosfórico (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania)	Fosfato sódico dibásico, dodecahidrato (Merck KGaA)
Albúmina sérica bovina, fracción V (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)	Hidróxido sódico (Merck KGaA)
Azida sódica (Sigma Chemical Co.) Desferol (Sigma Chemical Co.)	4-Hidroxiquinolina (Sigma Chemical Co.)
Carbonato sódico, anhidro (Merck KGaA)	Kinuramina, bromhidrato (Sigma Chemical Co.)
Catalasa (Sigma Chemical Co.)	Peróxido de hidrógeno (Sigma Chemical Co.)
Clorgilina (Research Biochemicals International, Natick, MA, USA)	Reactivo fenólico de Folin-Ciocalteu (Sigma Chemical Co.)
Cloruro potásico (Merck KGaA)	Sacarosa (Fluka Chemie AG)
Cloruro sódico (Merck KGaA)	Sulfato cúprico, pentahidrato (Fluka Chemie AG)
<i>n</i> -Dodecilsulfato sódico (Sigma Chemical Co.)	Tartrato de potasio y sodio, tetrahidrato (Fluka Chemie AG)
(-)-Deprenil (Research Biochemicals International)	

El agua empleada para la preparación de las disoluciones fue siempre de calidad ultrapura, obtenida mediante un equipo RiOs-60/Milli-Q Gradient A-10 (Millipore Corp., Bedford, MA, USA), provisto de dos prefiltros para la entrada de agua: uno de membrana y otro Polygard de 5 $\mu$ .

#### 3.2. Derivados cumarínicos

Los derivados cumarínicos utilizados en esta investigación fueron suministradas por el grupo de investigación colaborador (Prof. Angelo Carotti, Dipartimento di Farmacia-Scienze del Farmaco, Universidad de Bari, Italia). La pureza química de estos compuestos fue confirmada mediante técnicas de HPLC y microanálisis.

#### 3.3. Animales

Los animales utilizados en esta investigación fueron ratas macho Sprague-Dawley de 250 – 300 g de peso a su recepción. Estos animales fueron suministrados por el Animalario de la Universidad de Santiago de Compostela. Tras su recepción, los animales fueron distribuidos en cajas plásticas de policarbonato, manteniendo cuatro ratas por caja. Durante su estancia, estos animales fueron mantenidos a una temperatura constante de 22 °C y bajo un ciclo controlado de luz:oscuridad de 12:12 horas, recibiendo comida estándar para ratas y agua *ad libitum*.

Todos los animales empleados en este estudio se mantuvieron en el Animalario de la Facultad de Medicina durante dos días previos a su sacrificio, con el fin de garantizar su habituación al entorno ambiental y de este modo evitar estrés. Para mejorar el rendimiento de las preparaciones mitocondriales, los animales permanecieron en ayuno durante las 12 horas previas a su sacrificio. Los protocolos utilizados fueron aprobados por el Comité de Bioética de la USC y cumplen con la normativa vigente (*European Communities Council 86/609/EEC*).

### **3.4. Obtención de preparaciones mitocondriales de cerebro de rata**

Las mitocondrias de cerebro de rata se separaron mediante centrifugación diferencial de homogeneizados de cerebro de rata, utilizando para este fin un protocolo descrito en una publicación previa de este grupo de investigación (Soto-Otero *et al.*, 2001).

Las ratas empleadas fueron sacrificadas mediante decapitación con guillotina, previo adormecimiento con dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Tras el sacrificio de los animales, se procedió a la extracción inmediata de los cerebros y a su lavado por inmersión en un medio de separación consistente en una disolución tampón de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 13,2 mM y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 53,5 mM de pH 7,4, conteniendo sacarosa 133,6 mM para lograr su isotonicidad. Finalizada esta operación, se pesaron porciones de 4 g de tejido cerebral y se trocearon finamente sobre un vidrio de reloj con ayuda de unas tijeras de cirugía. A continuación, el tejido cerebral fue homogeneizado manualmente en cuatro volúmenes (v/p) del medio de separación citado anteriormente, utilizando un homogeneizador de vidrio (B. Braun, Melsungen, Alemania), provisto de un vaso de 30 ml y dos pistones: Uno con una luz de 0,075-0,150 mm (L) y otro con una luz de 0,025-0,075 mm (S). El homogeneizado se realizó efectuando tres emboladas con el pistón L, seguidas de tres emboladas con el pistón S. Tras combinar los homogeneizados obtenidos y distribuirlos en tubos de centrífuga de policarbonato de 30 ml (Beckman Instruments, Palo Alto, CA, USA), se procedió a la sedimentación de la fracción “nuclear”

mediante centrifugación a 1.000xg durante 5 minutos y a 4 °C. La centrifugación se llevó a cabo en una centrífuga Beckman de alta velocidad y refrigerada, modelo Avanti-25 (Beckman Instruments), provista de un rotor JA-20 para 8 tubos de 30 ml. Seguidamente, se separaron los sobrenadantes y se guardaron. Los sedimentos obtenidos se reconstituyeron con el medio de separación descrito y se volvieron a centrifugar en las mismas condiciones anteriores. Los sobrenadantes resultantes, se combinaron con los obtenidos en la operación anterior, y tras su distribución en tubos de centrífuga, se procedió a la sedimentación de mitocondrias mediante centrifugación a 12.500xg y a 4 °C durante 15 minutos. Tras esta operación, se eliminaron los sobrenadantes por decantación, y los sedimentos, constituidos por una fracción rica en mitocondrias, se reconstituyeron en un volumen igual del medio de separación descrito, volviendo a centrifugar en las mismas condiciones anteriores para su lavado. Una vez eliminados los sobrenadantes por decantación, se procedió a reconstituir los sedimentos así obtenidos en un volumen apropiado de una disolución tampón de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 13,2 mM/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 53,5 mM de pH 7,4 y KCl 72,6 mM (isotónica). La suspensión así obtenida, se homogeneizó mediante dos emboladas en un homogeneizador estándar de vidrio de 30 ml, y se procedió a su distribución en alícuotas de 0,5 ml, que fueron almacenadas en tubos Eppendorf a -40 °C. Todas las operaciones manuales descritas, así como el material empleado en las mismas (vasos de precipitados, homogeneizador, tubos de centrífuga, vidrios de reloj, etc.) se mantuvieron sobre hielo en todo momento.

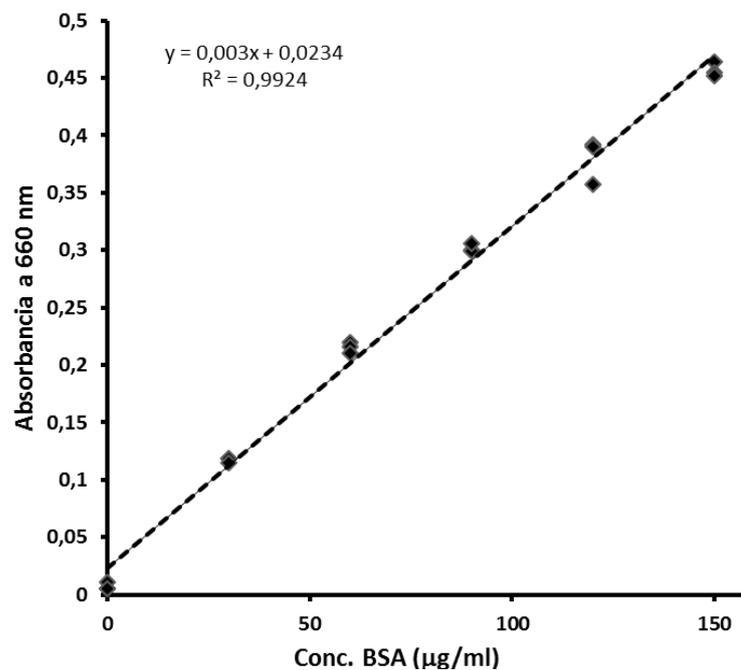
### 3.5. Determinación de la concentración de proteínas en preparaciones mitocondriales

Para la determinación del contenido de proteínas de las preparaciones mitocondriales se utilizó la metodología descrita por Markwell y cols. (1978). Para este fin, fue necesaria la preparación previa de las disoluciones indicadas en la siguiente tabla:

Reactivo A	Reactivo B	Reactivo C	Reactivo D
5.0 gr de Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	10.0 gr de CuSO <sub>4</sub> • 5H <sub>2</sub> O	100 ml de Reactivo A	5 ml de reactivo Folin-Ciocalteu
1.0 gr de NaOH			
0.4 gr de K-Na-tartrato • 4H <sub>2</sub> O	Disolviendo a agua Milli-Q y enrasando en un matraz	1 ml de Reactivo B	5 ml de H <sub>2</sub> O
2.5 gr de SDS			

Estas disoluciones son estables indefinidamente a temperatura ambiente.

Para la determinación del contenido de proteínas en las preparaciones mitocondriales, se utilizaron dos alícuotas de muestra: Una de 10  $\mu\text{l}$  y otra de 20  $\mu\text{l}$ . Estas alícuotas fueron diluidas con disolución tampón de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  13,2 mM/ $\text{KH}_2\text{PO}_4$  53,5 mM (pH 7,4) y KCl 72,6 mM (isotónica) hasta completar 1 ml de disolución. A la suspensión resultante, se le añadieron 3 ml del reactivo C, se agitó vigorosamente y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Esta disolución puede ser incubada hasta 60 minutos sin que se observen cambios en la absorbancia final. A la disolución así obtenida, se le añadieron 300  $\mu\text{l}$  del reactivo D, agitando de nuevo vigorosamente. A continuación, la disolución resultante se deja reposar a temperatura ambiente y en la oscuridad durante 45 minutos para que se forme el compuesto coloreado producto de la reacción.



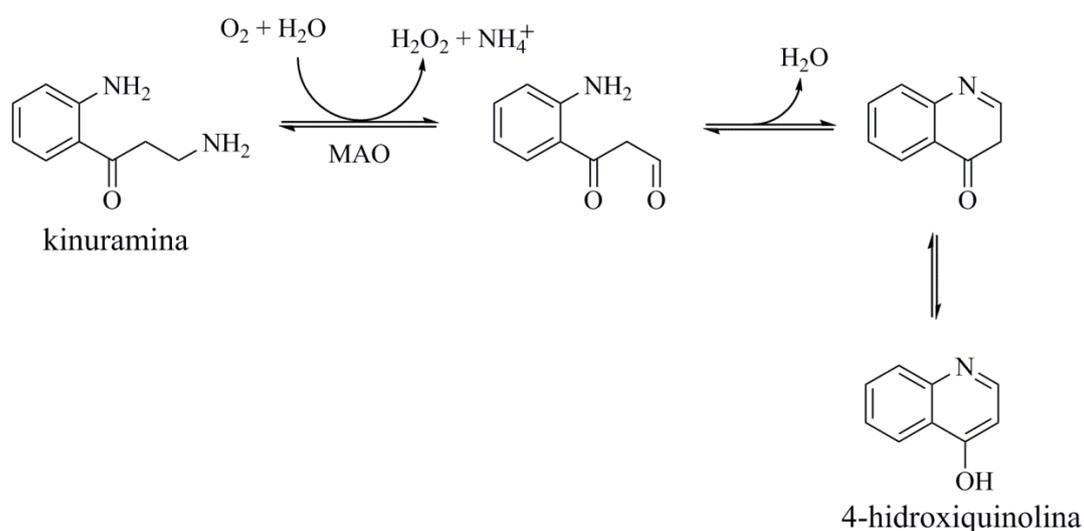
**Figura 6.** Recta de calibrado obtenida mediante análisis de regresión lineal (OriginPro8) para la determinación del contenido de proteínas en preparaciones mitocondriales de cerebro de rata, utilizando el método de Markwell y cols. (1978). Los datos representan los valores individuales obtenidos en cuatro medidas independientes ( $n= 4$ ).

Si fuese necesario, esta disolución se puede dejar reposar hasta 2,5 horas sin que se observen cambios en la absorbancia final. Por último, se midió la absorbancia a 660 nm, para lo que se utilizó un espectrofotómetro UV-VIS Ultrospec III (PharmaciaBiotech, Uppsala, Suecia). La cantidad de proteínas presente en la muestra se calculó a partir de la medida de la absorbancia y con la ayuda de la recta de calibrado (Fig. 6) que se preparó simultáneamente usando una serie de patrones preparados con albúmina sérica bovina (ASB).

### 3.6. Determinación de la actividad de la monoamino oxidasa

La actividad enzimática de la MAO se determinó en las preparaciones mitocondriales de cerebro de rata mediante espectrofotometría, utilizando para esto el método propuesto por Méndez-Álvarez y cols. (1997).

La metodología utilizada en esta técnica consistió en el uso de kinuramina como sustrato inespecífico para MAO-A y MAO-B. En este caso, la actividad de la MAO produce una desaminación oxidativa de la kinuramina que da lugar a una formación de un aldehído intermedio que, a continuación, se cicla espontáneamente y de forma rápida para dar 4-hidroxiquinolina (4-OHQ), como queda reflejado en la Fig. 7.

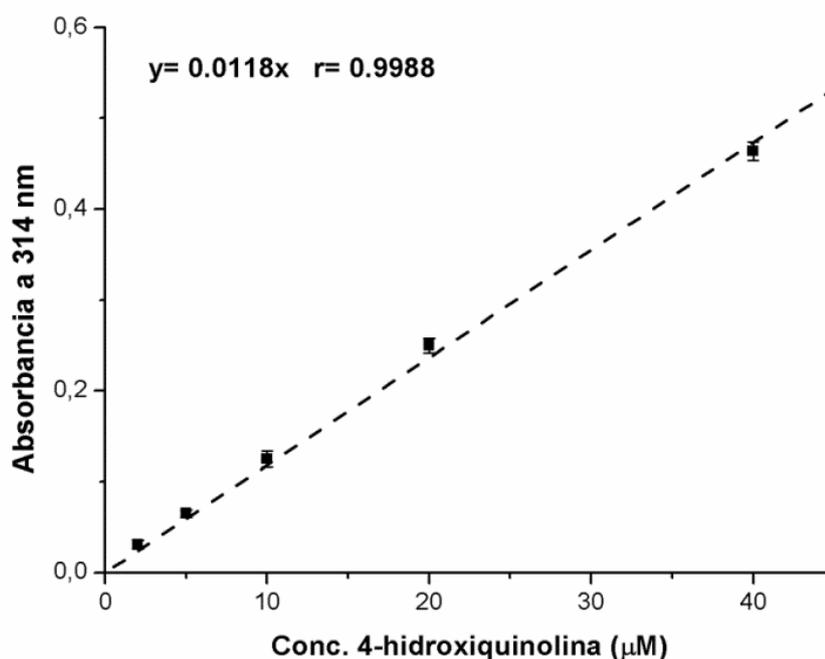


**Figura 7.** Reacción de la kinuramina catalizada por la MAO-A y la MAO-B.

En el presente estudio tratamos de identificar inhibidores selectivos de MAO B, por ello, debemos de obtener el porcentaje de inhibición para las dos isoformas de la enzima a fin de descartar una posible inhibición inespecífica de ambas formas. Para estimar la actividad específica de la MAO-A y MAO-B, se utilizaron respectivamente clorgilina y (-)-deprenil como inhibidores específicos e irreversibles.

El procedimiento consistió en la pre-incubación de 320 µl de una preparación de mitocondrias de cerebro de rata (1 mg proteínas/ml) con 40 µl de clorgilina en el caso de MAO B (250 nM) o (-)-deprenil en el de MAO A (250 nM) durante 5 minutos. A continuación, se añadieron 20 µl de DMSO (en el caso de controles) o el compuesto inhibidor sometido al estudio. Por último, se añaden otros 20 µl de kinuramina –sustrato para la actividad de MAO- para medir el porcentaje de inhibición de MAO A o MAO B en cada caso.

Inmediatamente, se procede a la monitorización de la actividad MAO, mediante seguimiento de la formación de 4-OHQ a 314 nm durante 5 minutos, con un lapsus inicial de 2 minutos para MAO-A y 1 minuto para MAO-B. Las medidas espectrofotométricas se realizaron usando un espectrofotómetro de doble haz Perkin-Elmer (Perkin-Elmer Inc., Norwalk, CT, USA), modelo Lambda 35, equipado con un porta cubetas termostatzado mediante el uso de un termostatzador-circulador Julabo (Julabo GmbH, Seelbach, Alemania) modelo 5A. Para poder expresar la actividad MAO como ng de 4-OHQ/mg de proteína/min, se realizó un calibrado con dicha sustancia.



**Figura 8.** Recta de calibrado para la transformación de los valores de absorbancia en concentraciones de 4-hidroxiquinolina. La ecuación correspondiente se obtuvo mediante análisis de regresión lineal, utilizando el programa OriginPro® v. 8. Los datos representados son medias±DS ( $n=4$ ).

La actividad inhibitoria se determinó usando una concentración de inhibidor 10 µM. Cuando la actividad inhibitoria fue superior al 50%, se procedió a la preparación de concentraciones decrecientes de inhibidor, que permitiesen una interpolación gráfica entorno al valor estimado del IC<sub>50</sub>. Con los datos obtenidos de porcentajes de inhibición se hizo una representación gráfica semilogarítmica frente a la concentración de inhibidor, ajustando la representación a una cinética sigmoideal. Estas últimas operaciones se realizaron utilizando el programa OriginPro® v. 8.

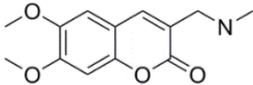
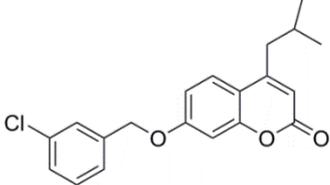
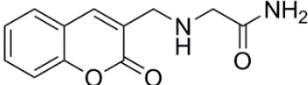
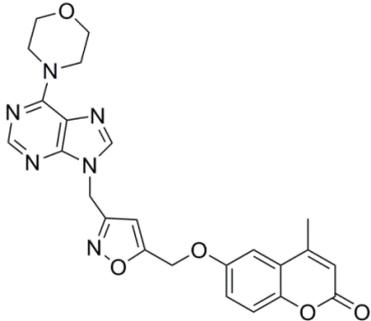
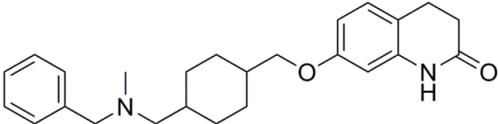
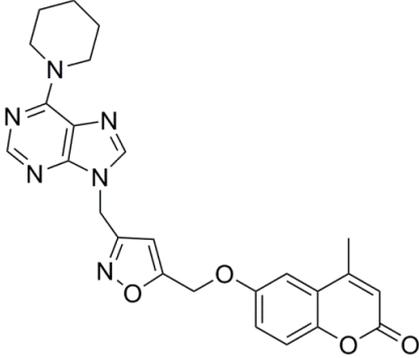
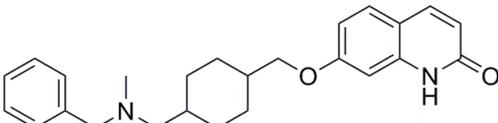
## 4. RESULTADOS

Esta investigación se ha llevado a cabo utilizando preparaciones mitocondriales de cerebro de rata. La actividad enzimática MAO-A y MAO-B se ha determinado espectrofotométricamente, midiendo la actividad en condiciones fisiológicas tanto de temperatura como pH. Se usó kinuramina como substrato inespecífico para ambas isoformas enzimáticas, clorgilina y deprenil como inhibidores específicos e irreversibles MAO-A y MAO-B respectivamente. La actividad enzimática obtenida para los controles de MAO-A ha sido de  $1,121 \pm 0,0492$  nmoles 4-hidroxiquinolina/mg proteína/min y para los controles de MAO-B de  $2,553 \pm 0,0571$  nmoles 4-hidroxiquinolina/mg proteína/min.

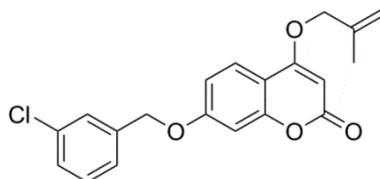
En esta investigación se han estudiado 14 derivados cumarínicos, cuyas estructuras químicas se muestran en la Tabla 1. Como puede observarse, dichos compuestos poseen el anillo cumarínico característico de este tipo de compuestos, diferenciándose en los sustituyentes que dichos compuestos llevan en las posiciones C-3, C-4, C-6 y C-7 del mencionado anillo.

Los resultados obtenidos fueron los que se muestran en la Tabla 2. Como puede verse en dicha Tabla 2, únicamente se ha determinado la actividad inhibidora MAO-A y MAO-B usando una concentración de derivado cumarínico de  $10 \mu\text{M}$ . La inhibición que pueda conseguirse con concentraciones superiores carece de interés farmacológico para este tipo de compuestos. Solo cuando en estas concentraciones se obtuvieron actividades inhibitoras superiores al 50% se procedió a ensayar otras concentraciones que permitieran estimar el valor de la correspondiente  $\text{IC}_{50}$ . La Tabla 2 recoge los resultados obtenidos para los 14 derivados cumarínicos seleccionados. Las Figs. 9-13 muestran las curvas semilogarítmicas de % de inhibición frente a concentración de inhibidor que permitieron estimar el valor de la  $\text{IC}_{50}$  mediante el ajuste a una curva sigmoideal.

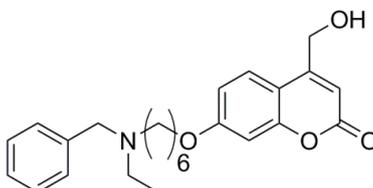
**Tabla 1.** Estructura química de los derivados cumarínicos objeto de estudio.

Compuesto	Estructura química
Cmp-1	
Cmp-2	
Cmp-3	
Cmp-4	
Cmp-5	
Cmp-6	
Cmp-7	

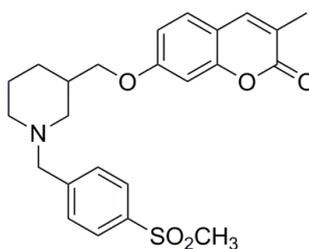
Cmp-8



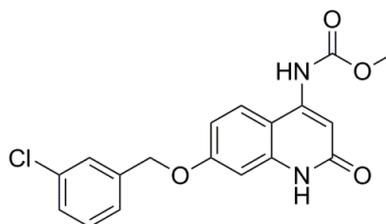
Cmp-9



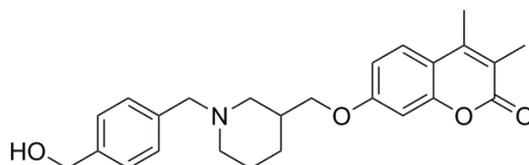
Cmp-10



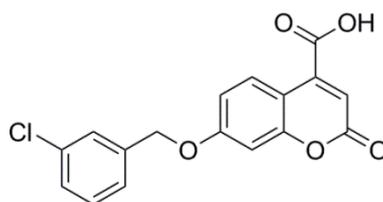
Cmp-11



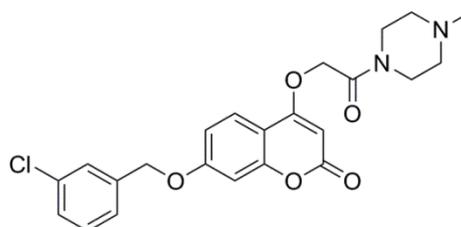
Cmp12



Cmp-13



Cmp-14

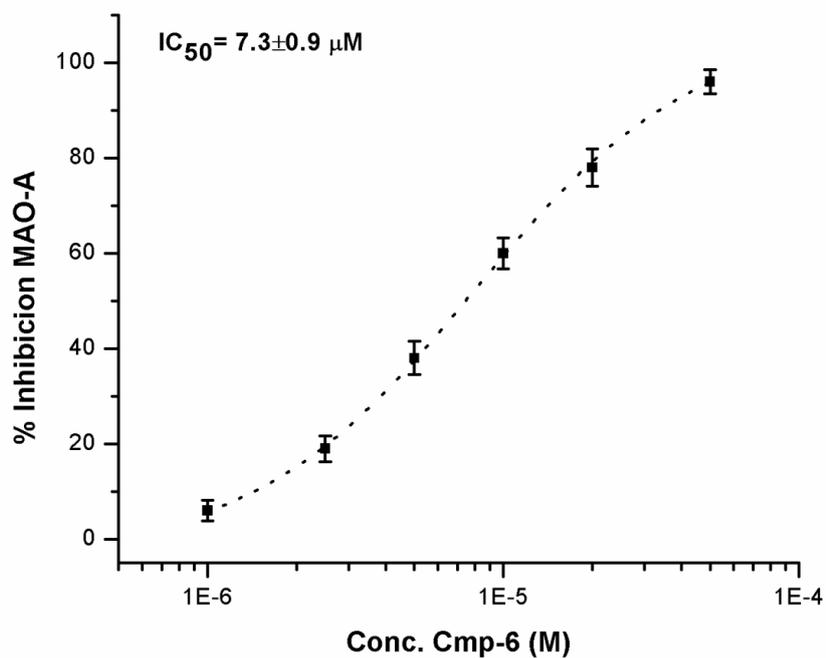


**Tabla 2.** Actividad inhibidora MAO-A y MAO-B de los derivados cumarínicos sintéticos objeto de estudio.

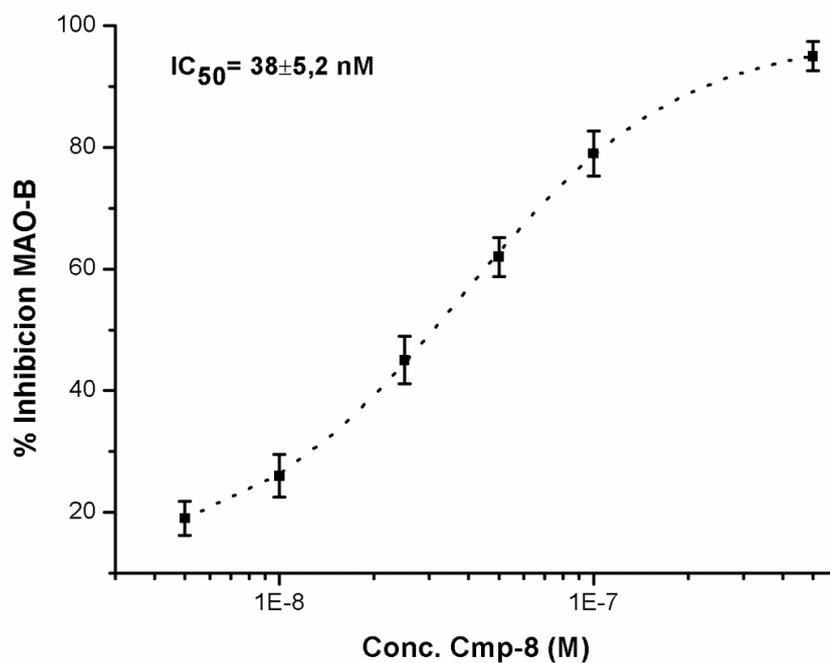
Compuesto	Actividad inhibidora MAO-A		Actividad inhibidora MAO-B	
	% Inhibición <sup>§</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>¶</sup>	% Inhibición <sup>§</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>¶</sup>
Cmp-1	n.i.		n.i.	
Cmp-2	10±1		13±2	
Cmp-3	n.i.		14±2	
Cmp-4	12±2		n.i.	
Cmp-5	27±2		11±1	
Cmp-6		7,3±0,9 µM	12±2	
Cmp-7	20±3		15±3	
Cmp-8	15±1			38±5,2 nM
Cmp-9	40±1		47±1	
Cmp-10	45±3		50±3	
Cmp-11	21±2			466±24 nM
Cmp-12		4,8±0,8 µM		1,8±0,5 µM
Cmp-13	n.i.		2±0,3	
Cmp-14	n.i.		27±2	

<sup>§</sup> Los datos de porcentaje de inhibición representan el valor medio±la desviación típica, obtenidos a partir de tres experimentos independientes. En todos los casos, la concentración de inhibidor utilizada fue de 10 µM. La abreviatura n.i. significa que no se detectó inhibición para dicho compuesto a la mencionada concentración.

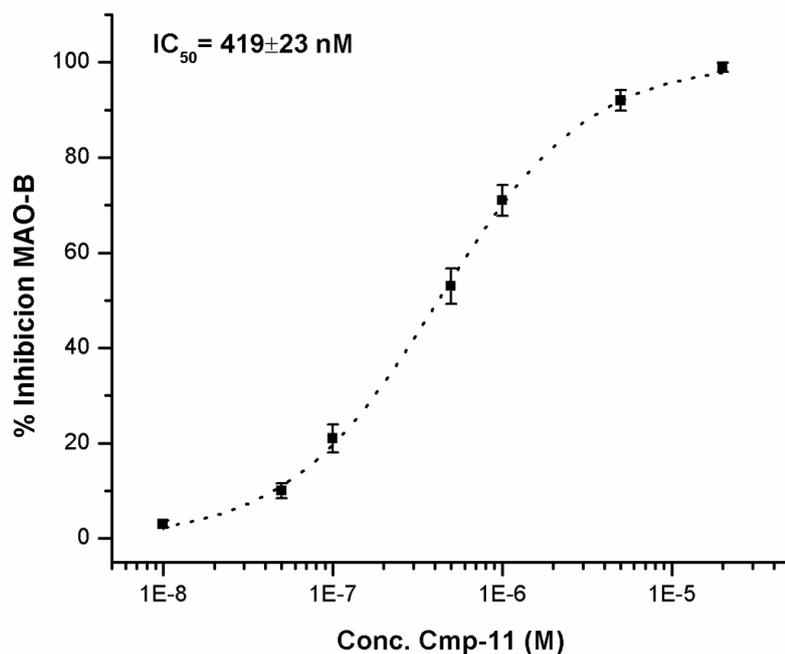
<sup>¶</sup> El valor de IC<sub>50</sub> se determinó a partir de la representación semilogarítmica de valores de % de inhibición frente a concentración de inhibidor, ajustando los valores a una curva sigmoideal mediante la utilización del programa OriginPro® v. 8.



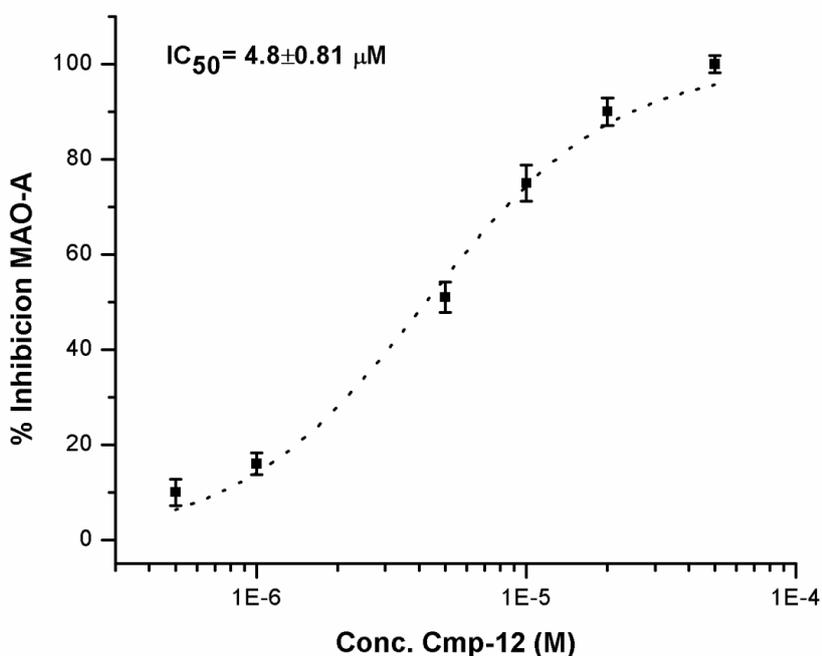
**Figura 9.** Curva de inhibición MAO-A para Cmp-6. Cada punto representa la media±desviación típica, obtenidas a partir de 3 experimentos independientes. La curva sigmoideal correspondiente a la representación del % de inhibición frente a la concentración de inhibidor se obtuvo utilizando el programa OriginPro® v. 8.



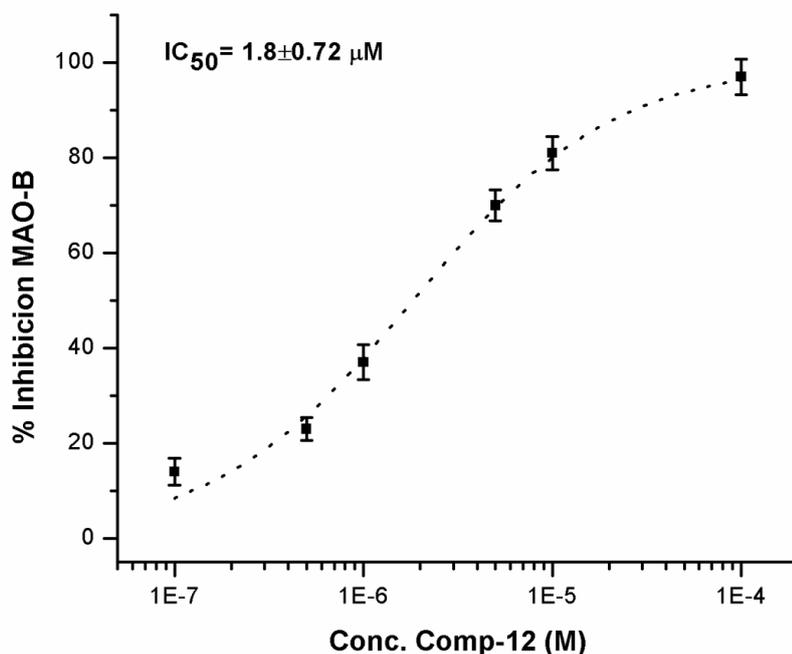
**Figura 10.** Curva de inhibición MAO-B para Cmp-8. Cada punto representa la media±desviación típica, obtenidas a partir de 3 experimentos independientes. La curva sigmoideal correspondiente a la representación del % de inhibición frente a la concentración de inhibidor se obtuvo utilizando el programa OriginPro® v. 8.



**Figura 11.** Curva de inhibición MAO-B para Cmp-11. Cada punto representa la media±desviación típica, obtenidas a partir de 3 experimentos independientes. La curva sigmoideal correspondiente a la representación del % de inhibición frente a la concentración de inhibidor se obtuvo utilizando el programa OriginPro® v. 8.



**Figura 12.** Curva de inhibición MAO-A para Cmp-12. Cada punto representa la media±desviación típica, obtenidas a partir de 3 experimentos independientes. La curva sigmoideal correspondiente a la representación del % de inhibición frente a la concentración de inhibidor se obtuvo utilizando el programa OriginPro® v. 8.



**Figura 13.** Curva de inhibición MAO-B para Cmp-12. Cada punto representa la media±desviación típica, obtenidas a partir de 3 experimentos independientes. La curva sigmoide correspondiente a la representación del % de inhibición frente a la concentración de inhibidor se obtuvo utilizando el programa OriginPro® v. 8.

Como puede apreciarse en la Tabla 2, solo los compuestos Cmp-8, Cmp-11 y Cmp-12 mostraron una adecuada capacidad inhibidora MAO-B. En cuanto a la capacidad inhibidora MAO-A, solo los compuestos Cmp-10 y Cmp-12 resultaron poseer una actividad inhibidora destacada. Estos resultados nos muestran que de los 14 compuestos estudiados, solo los compuestos Cmp-8 y Cmp-11 pueden considerarse como inhibidores específicos MAO-B, siendo el compuesto Cmp-8 el mejor inhibidor específico MAO-B.

## 5. DISCUSIÓN

Teniendo en cuenta las limitaciones de las terapias actualmente en uso para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson (Müller, 2012; Smith y cols., 2012) debido a los efectos secundarios, el objetivo de esta investigación ha sido la búsqueda de nuevos inhibidores específicos MAO-B que nos garanticen un aumento de los niveles cerebrales de dopamina con el fin de contrarrestar los síntomas de la enfermedad. Estos son debidos en su mayor parte al déficit de dopamina que se produce en el estriado de los enfermos de Parkinson (Bernheimer y cols., 1973). Esto mismo se consigue con el tratamiento con

levodopa, pero en este caso, la formación de dopamina en cerebro es más difusa, con lo que aumenta el daño cerebral por estrés oxidativo debido a la autooxidación de la dopamina -que no está protegida en las neuronas dopaminérgicas dentro de vesículas sinápticas- (Hermida-Ameijeiras y cols., 2004). Una de las pruebas en las que se basa nuestra hipótesis es que los efectos secundarios de los inhibidores específicos MAO-B (deprenil, rasagilina) son mucho menores que los observados con otro tipo de fármacos -incluida la levodopa- (Lecht y cols., 2007; Robottom, 2011). No obstante, resulta imprescindible conseguir inhibidores específicos MAO-B con un poder inhibitorio mucho más alto que el de los actualmente en uso.

Uno de los datos aportados en este trabajo pone claramente de manifiesto que la actividad MAO-B encontrada en mitocondrias de cerebro de rata es superior a la actividad MAO-A, lo que concuerda con datos previamente publicados (Saura y cols., 1997; Nicotra y cols., 2004). En este mismo sentido cabe destacar que la cuantía de actividad MAO-B respecto a la de MAO-A es algo que está relacionado con la edad, tanto en ratas (Benedetti y Keane, 1980) como en humanos (Sparks y cols., 1991). Este hecho es atribuido a que las células gliales contienen más MAO-B que MAO-A. Con la pérdida de material neuronal que se produce durante procesos de envejecimiento y sustitución de materia glial, la actividad MAO-B aumentará con el paso de los años, en detrimento de la actividad MAO-A.

Gracias a investigaciones previamente realizadas (Catto y cols., 2006; Pisani y cols., 2009; Pisani y cols., 2013) sabemos que modificando los sustituyentes del anillo cumarínico en determinadas posiciones, se pueden obtener inhibidores MAO con distinto poder inhibitorio y grado de selectividad para MAO-A y MAO-B. Los resultados de esta investigación nos han confirmado que es posible lograr inhibidores específicos MAO-B, con alto poder inhibitorio y alta especificidad para la isoforma B de la enzima. De esta forma, se ha cumplido el objetivo principal de esta investigación. Evidentemente, la investigación con estos compuestos deberá continuar porque es necesario modificar su estructura de forma que, conservando los efectos sobre la actividad MAO, puedan dotarse de propiedades antioxidantes y neuroprotectoras combatiendo el estrés oxidativo generado por la autooxidación de la dopamina y frenar el avance del proceso neurodegenerativo.

## 6. CONCLUSIONES

A partir los datos obtenidos en esta investigación, se pueden establecer las siguientes conclusiones:

1. Es posible obtener buenos inhibidores MAO-B utilizando derivados cumarínicos sintéticos, en los que se han introducido sustituyentes específicos en las posiciones C-3, C-4, C-6 y C-7 del anillo cumarínico.
2. Variando los sustituyentes en las posiciones C-3, C-4, C-6 y C-7 del anillo cumarínico es también posible obtener buenos inhibidores MAO-A.
3. Usando determinados sustituyentes específicos para las posiciones C-3, C-4, C-6 y C-7 del anillo cumarínico, es posible conseguir inhibidores específicos MAO-B, que puedan ser propuestos como posibles fármacos para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.
4. En este estudio se ha identificado un derivado con una alta capacidad inhibidora MAO-B, con un  $IC_{50}$  situado en el rango de concentraciones nanomolares. Está dotado de una baja actividad inhibidora MAO-A, lo que lo hace adecuado para el objetivo propuesto en esta investigación.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

Alves G, Forsaa EB, Pedersen KF, Dreetz Gjerstad M, Larsen JP (2008) Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neurol* 255: 18-32.

Bakhle YS (1990) Pharmacokinetic and metabolic properties of lung. *Br J Anaesth* 65: 79-93.

Barbeau A, Sourkes TL, Murphy CF (1962) Les catecholamines de la maladie de Parkinson. In: de Ajuriaguerra J (ed), *Monoamines et Systeme Nerveux Central*. Goerg & Cie SA, Geneva, Switzerland, pp 247-262.

Bassetti CL (2011) Nonmotor disturbances in Parkinson's disease. *Neurodegener Dis* 8: 95-108.

Benabid AL, Chabardes S, Mitrofanis J, Pollak P (2009a) Deep brain stimulation of the subthalamic nucleus for the treatment of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 8: 67-81.

Benabid AL, Chabardes S, Torres N, Piallat B, Krack P, Fraix V *et al.* (2009b) Functional neurosurgery for movement disorders: a historical perspective. *Prog Brain Res* 175: 379-391.

Benedetti MS, Keane PE (1980) Differential changes in monoamine oxidase A and B activity in the aging rat brain. *J Neurochem* 35: 1026-1032.

Bergman H, Wichmann T, DeLong MR (1990) Reversal of experimental parkinsonism by lesions of the subthalamic nucleus. *Science* 249: 1436-1438.

Bernheimer H, Birkmayer W, Hornykiewicz O, Jellinger K, Seitelberger F (1973) Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. *J Neurol Sci* 20: 415-455.

Bertler A, Rosengren E (1959) Occurrence and distribution of catecholamines in brain. *Acta Physiol Scand* 47: 350-361.

Binda C, Wang J, Pisani L, Caccia C, Carotti A, Salvati P, Edmondson DE, Mattevi A (2007) Structures of human monoamine oxidases A and B complexes with selective noncovalent inhibitors: safinamide and coumarin analogs. *J Med Chem* 50: 5848-5852.

Birkmayer W, Hornykiewicz O (1961) The L-3,4-dioxyphenylalanine (DOPA)-effect in Parkinson-akinesia. *Klin Wochenschr(Wien)* 73: 787-788.

Bjorklund T, Carlsson T, Cederfjall EA, Carta M, Kirik D (2010a) Optimized adenoassociated viral vector-mediated striatal DOPA delivery restores sensorimotor function and prevents dyskinesias in a model of advanced Parkinson's disease. *Prog Brain Res* 133: 496-511.

Bjorklund T, Cederfjall EA, Kirik D (2010b). Gene therapy for dopamine replacement. *Prog Brain Res* 184: 221-235.

Bjorklund T, Kirik D (2009) Scientific rationale for the development of gene therapy strategies for Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* 1792: 703-713.

Bjorklund T, Kordower JH (2010). Gene therapy for Parkinson's disease. *Mov Disord* 25: S161-S173.

Bromek E, Haduch A, Gołombiowska K, Daniel WA (2011) Cytochrome P-450 mediates dopamine formation in the brain in vivo. *J Neurochem* 118: 806-815.

Brundin P, Barker RA, Parmar M (2010) Neural grafting in Parkinson's disease problems and possibilities. *Prog Brain Res* 184: 265-294.

"Brundin P, Barker RA, Parmar M (2010) Neural grafting in Parkinson's disease problems and possibilities. *Prog Brain Res* 184: 265-294.

Calne DB, Teychenne PF, Claveria LE, Eastman R, Greenacre JK, Petrie A (1974a) Bromocriptine in Parkinsonism. *Br Med J* 4: 442-444.

Calne DB, Teychenne PF, Leigh PN, Bamji AN, Greenacre JK (1974b) Treatment of parkinsonism with bromocriptine. *Lancet* 2: 1355-1356.

Carlsson A, Lindqvist M, Magnusson T (1957) 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. First evidence that Parkinson's disease may be due to loss of striatal dopamine. *Nature* 180: 1200.

- Carlsson A, Lindqvist M, Magnusson T, Waldeck B (1958). On the presence of 3-hydroxytyramine in brain. *Science* 127: 471-472.
- Carradori S., Yanez M., Orallo F., Sanna M.L., Gallinella B., Cirilli R. (2010) Synthesis, stereochemical separation, and biological evaluation of selective inhibitors of human MAO-B: 1-(4-arylthiazol-2-yl)-2-(3-methylcyclohexylidene) hydrazines. *J Med Chem* 53: 6516-6520.
- Cartier EA, Parra LA, Baust TB, Quiroz M, Salazar G, Faundez V, Egaña L, Torres GE (2010) A biochemical and functional protein complex involving dopamine synthesis and transport into synaptic vesicles. *J Biol Chem* 285: 1957-1966.
- Catto M, Nicolotti O, Leonetti F, Carotti A, Favia AD, Soto-Otero R, Méndez-Alvarez E, Carotti A (2006) Structural insights into monoamine oxidase inhibitory potency and selectivity of 7-substituted coumarins from ligand- and target-based approaches. *J Med Chem* 49: 4912-4925.
- Charcot J-M (1879) *Lectures on Diseases of the Nervous System*. HC Lea, Philadelphia, USA.
- Chaudhry FA, Edwards RH, Fonnum F (2008) Vesicular neurotransmitter transporters as targets for endogenous and exogenous toxic substances. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 48: 277-301.
- Chaudhuri KR, Odin P, Antonini A, Martinez-Martin P (2011) Parkinson's disease: the non-motor issues. *Parkinsonism Relat Disord* 17: 717-723.
- Chaudhuri KR, Schapira AHV (2009) Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. *Lancet Neurol* 8: 464-474.
- Chaudhuri, KR, Healy DG, Schapira A H (2006) Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. *The Lancet Neurol* 5: 235-245.
- Corrodi H, Fuxe K, Hokfelt T, Lidbrink P, Ungerstedt U (1973) Effect of ergot drugs on central catecholamine neurons: evidence for a stimulation of central dopamine neurons. *J Pharm Pharmacol* 25: 409-412.
- Corrodi H, Fuxe K, Ungerstedt U (1971) Evidence for a new type of dopamine receptor stimulating agent. *J Pharm Pharmacol* 23: 989-991.
- Cotzias GC, Papavasiliou PS, Gellene R (1969) Modification of parkinsonism: chronic treatment with L-Dopa. *N Engl J Med* 280: 337-345.
- Dauer W y Przedborski S (2003) Parkinson's disease: Mechanisms and models. *Neuron* 39: 889-909.
- Eisenhofer G, Aneman A, Friberg P, Hooper D, Fändriks L, Lonroth H, Hunyady B, Mezey E (1997) Substantial production of dopamine in the human gastrointestinal tract. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 3864-3871.
- Eisenhofer G, Kopin IJ, Goldstein DS (2004) Catecholaminemetabolism: A contemporary view with implications for physiology and medicine. *Pharmacol Rev* 56: 331-349.

- Eriksen J, Jørgensen TN, Gether U (2010) Regulation of dopamine transporter function by protein-protein interactions: new discoveries and methodological challenges. *J Neurochem* 113: 27-41.
- Fahn S, Przedborski S (2000) Parkinsonism. In: *Merritt's Neurology*, Rowland LP (ed). Lippincott Williams & Wilkins, New York, USA, pp 679-693.
- Finberg J (2014) Update on the pharmacology of selective inhibitors of MAO-A and MAO-B: Focus on modulation of CNS monoamine neurotransmitter release. *Pharm Ther* 143: 133-152.
- Forno LS, DeLanney LE, Irwin I, Langston JW (1996) Electron microscopy of Lewy bodies in the amygdala-parahippocampal region. Comparison with inclusion bodies in the MPTP-treated squirrel monkey. *Adv Neurol* 69: 217-228.
- Freed CR, Greene PE, Breeze RE, Tsai WY, DuMouchel W, Kao R *et al.* (2001) Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med* 344: 710-719.
- Freed CR, Greene PE, Breeze RE, Tsai WY, DuMouchel W, Kao R *et al.* (2001) Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med* 344: 710-719.
- Gershanik OS (2015) Improving L-dopa therapy: the development of enzyme inhibitors. *Mov Disord* 30: 103-113.
- Gibb W, Lees AJ (1988) The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 51: 745-752.
- Goetz C (2002) Charcot and Parkinson's disease. In: *Parkinson's disease diagnosis and clinical management* Factor F, Weiner W(eds.). Demos Medical Publishing, New York, USA, pp 19-26.
- Greenfield J, Bosanquet FD (1953) The brain-stem lesions in Parkinsonism. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 16: 213-226.
- Guay D (2006) Rasgiline (TVP-1012): a new selective monoamine oxidase inhibitor for Parkinson's disease. *Am J Geriatr Pharmacother* 4: 330-346.
- Halliwell B (2006) Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem* 97: 1634-1658.
- Hauser RA (2009) Levodopa: past, present, and future. *Eur Neurol* 62: 1-8.
- Hermida-Ameijeiras A, Méndez-Alvarez E, Sánchez-Iglesias S, Sanmartín-Suárez C, Soto-Otero R (2004) Autoxidation and MAO-mediated metabolism of dopamine as a potential cause of oxidative stress: role of ferrous and ferric ions. *Neurochem Int* 45: 103-116.
- Hiroi T, Imaoka S, Funae Y (1998) Dopamine formation from tyramine by CYP2D6. *Biochem Biophys Res Commun* 249: 838-848.

Hornykiewicz O, Kish SJ (1987) Biochemical pathophysiology of Parkinson's disease. *Adv Neurol* 45: 19-34.

Hornykiewicz O (1966) Dopamine (3-hydroxytyramine) and brain function. *Pharmacol Rev* 18: 925-964.

Jameel E, Umar T, Kumar J, Hoda N (2016) Coumarin: a privileged scaffold for the design and development of antineurodegenerative agents. *Chem Biol Drug Des* 87: 21-38.

Jenner P (2003) Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 53, S26–S36 (discussion S36-38).

Johnston P (1968) Some observations upon a new inhibitor of monoamine oxidase in brain tissue. *Biochem Pharmacol* 17: 1285-1297.

Kasten M, Kertelge L, Bruggemann N, van der Veegt J, Schmidt A, Tadic V (2010) Nonmotor symptoms in genetic Parkinson's disease. *Arch Neurol* 67: 670-676.

Kim Y, Kim Y, Hwang O, Kim DJ (2012) Pathology of neurodegenerative diseases. In: Gonzalez-Quevedo DA(ed), *Brain Damage-Bridging Between Basic Research and Clinics*. Rijeka, Intech, pp 99-138.

Laitinen LV, Bergenheim AT, Hariz MI (1992) Ventroposterolateral pallidotomy can abolish all parkinsonian symptoms. *Stereotact Funct Neurosurg* 58: 14-21.

Lecht S, Haroutiunian S, Hoffman A, Lazarovici P (2007) Rasagiline - a novel MAO B inhibitor in Parkinson's disease therapy. *Ther Clin Risk Manag* 3: 467-474.

Li JY, Christophersen NS, Hall V, Soulet D, Brundin P (2008) Critical issues of clinical human embryonic stem cell therapy for brain repair. *Trends Neurosci* 31: 146-153.

Lim SY, Lang AE (2010) The nonmotor symptoms of Parkinson's disease: an overview. *Mov Disord* 25: S123-S130.

Limousin P, Pollak P, Benazzouz A, Hoffmann D, Broussolle E, Perret JE (1995a) Bilateral subthalamic nucleus stimulation for severe Parkinson's disease. *Mov Disord* 10: 672-674.

Limousin P, Pollak P, Benazzouz A, Hoffmann D, Le Bas JF, Broussolle E (1995b) Effect of parkinsonian signs and symptoms of bilateral subthalamic nucleus stimulation. *Lancet* 345: 91-99.

Ma J, Yoshimura M, Yamashita E, Nakagawa A, Ito A, Tsukihara T (2004) Structure of rat monoamine oxidase A and its specific recognitions for substrates and inhibitors. *J Mol Biol* 338: 103-114.

Markwell MA, Haas SM, Bieber LL, Tolbert NE (1978) A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* 87: 206-210

Marsden C (1983) Neuromelanin and Parkinson's disease. *J Neural Transm* 19: 121-141.

- Marsden C, (1982) Neurotransmitters and CNS disease. Basal ganglia disease. *Lancet* 2: 1141-1147
- Matthias L, Heinz R (2011) Controversies in Neurology: why monoamine oxidase B inhibitors could be a good choice for the initial treatment of Parkinson's disease. *Neurology* 11: 112.
- Meiser J, Weindl D, Hiller K (2013) Complexity of dopamine metabolism. *Cell Commun Signal* 2013 11:34.
- Méndez-Álvarez E, Soto-Otero R, Sánchez-Sellero I y López-Ribadulla Lamas M (1997) Inhibition of brain monoamine oxidase by adducts of 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline with components of cigarette smoke. *Life Science* 60: 1719-1727.
- Migliore L, Coppede F (2009) Environmental-induced oxidative stress in neurodegenerative disorders and aging. *Mutat Res* 674: 73-84.
- Müller T (2012) Drug therapy in patients with Parkinson's disease. *Transl Neurodegener* 1: 10.
- Myöhänen T, Schendzielorz N, Männistö PT (2010) Distribution of catechol-O-methyltransferase (COMT) proteins and enzymatic activities in wild-type and soluble COMT deficient mice. *J Neurochem* 113: 1632-1643.
- Nagatsu T, Sawada M (2009) L-dopa therapy for Parkinson's disease: past, present, and future. *Parkinsonism Relat Disord* 15: S3-S8.
- Nicotra A, Pierucci F, Parvez H, Senatori O (2004) Monoamine oxidase expression during development and aging. *Neurotoxicology* 25: 155-165.
- Nieoullon A (2011) Neurodegenerative diseases and neuroprotection: current views and prospects. *J Appl Biomed* 9: 173-183.
- Nisipeanu P, Korczyn A (2008) Dopamine agonists. In: Factor SA, Weiner WJ (eds), *Parkinson's Disease-Diagnostic and Clinical Management*. Demos: New York, USA, pp 515-532.
- Novaroli L, Daina A, Favre E, Bravo J, Carotti A, Leonetti F, Catto M, Carrupt P, Reist M (2006) Impact of species-dependent differences on screening, design, and development of MAO B inhibitors. *J Med Chem* 49: 6264-6272.
- Nutt JG (1998) Catechol-O-methyltransferase inhibitors for treatment of Parkinson's disease. *Lancet* 351: 1221-1222.
- Olanow C (2007) The pathogenesis of cell death in Parkinson's disease. *Mov Disord* 22: S335-S342.
- Olanow C, Goetz CG, Kordower JH, Stoessl AJ, Sossi V, Brin MF *et al.* (2003) A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 54: 403-414.

Olanow C, Goetz C, Kordower J, Stoessl AJ, Sossi V, Brin M (2003) A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 54: 403-414.

Olanow C, Obeso J, Stocchi F (2006) Continuous dopamine-receptor treatment of Parkinson's disease: scientific rationale and clinical implications. *Lancet Neurol* 5: 677-687.

Parkinson Disease's Foundation. Disponible en [http://www.pdf.org/en/parkinson\\_statistics](http://www.pdf.org/en/parkinson_statistics) [Consultada el 30 de Mayo de 2016]

Pisani L, Muncipinto G, Miscioscia TF, Nicolotti O, Leonetti F, Catto M, Caccia C, Salvati P, Soto-Otero R, Mendez-Alvarez E, Passetu C, Carotti A (2009) Discovery of a novel class of potent coumarin monoamine oxidase B inhibitors: development and biopharmacological profiling of 7-[(3-chlorobenzyl)oxy]-4-[(methylamino)methyl]-2H-chromen-2-one methane-sulfonate (NW-1772) as a highly potent, selective, reversible, and orally active monoamine oxidase B inhibitor. *J Med Chem* 52: 6685-6706.

Pisani L, Catto M, Nicolotti O, Grossi G, Di Braccio M, Soto-Otero R, Mendez-Alvarez E, Stefanachi A, Gadaleta D, Carotti A (2013) Fine molecular tuning at position 4 of 2H-chromen-2-one derivatives in the search of potent and selective monoamine oxidase B inhibitors. *Eur J Med Chem* 70: 723-739.

Poewe W (2010) Parkinson disease: treatment of the nonmotor symptoms of Parkinson's disease. *Nat Rev Neurol* 6: 417-418.

Price K, Farley I, Hornykiewicz O (1978) Neurochemistry of Parkinson's disease: relation between striatal and limbic dopamine. *Adv Biochem Psychopharmacol* 19: 293-300.

Rangasamy S, Soderstrom K, Bakay R, Kordower J (2010) Neurotrophic factor therapy for Parkinson's disease. *Prog Brain Res* 184: 237-264.

Riederer P, Danielczyk W, Grunblatt E (2004) Monoamine oxidase-B inhibition in Alzheimer's disease. *Neurotoxicology* 25: 271-277.

Robottom BJ (2011) Efficacy, safety, and patient preference of monoamine oxidase B inhibitors in the treatment of Parkinson's disease. *Patient Prefer Adherence* 5: 57-64.

Saura J, Andrés N, Andrade C, Ojuel J, Eriksson K, Mahy N (1997) Biphasic and region-specific MAO-B response to aging in normal human brain. *Neurobiol Aging* 18: 497-507.

Sayre L, Perry G, Smith M (2008) Oxidative stress and neurotoxicity. *Chem Res Toxicol* 21: 172-188.

Sies H, Jones D (2007) Oxidative Stress. In: *Encyclopedia of stress*, Fink G (ed), Elsevier, San Diego, USA, pp 45-48.

Skovronsky D, Lee V, Trojanowski J (2006) Neurodegenerative diseases: new concepts of pathogenesis and their therapeutic implications. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 1:51-70.

Sparks DL, Woeltz VM, Markesbery WR (1991) Alterations in brain monoamine oxidase activity in aging, Alzheimer's disease and Pick's disease. *Arch Neurol* 48: 718-721.

- Spillantini M, Crowther RA, Jakes R, Hasegawa M, Goedert M (1998). alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 6469-6473.
- Sullivan P, Dragicevic NB, Deng JH, Bai Y, Dimayuga E, Ding Q, Chen Q, Bruce-Keller AJ, Keller JN. (2004) Proteasome inhibition alters neural mitochondrial homeostasis and mitochondria turnover. *J Biol Chem* 279: 20699-20707.
- Tanner CM, Aston DA (2000) Epidemiology of Parkinson's disease and akinetic syndromes. *Neurology* 13: 427-430.
- Tipton, K (1986) Enzymology of monoamine oxidase. *Cell Biochem Funct* 4: 79-87.
- Uhl GR, Walther D, Mash D, Faucheux B, Javoy-Agid F (1994) Dopamine transporter messenger RNA in Parkinson's disease and control substantia nigra neurons. *Ann Neurol* 35: 494-498.
- Vaya J, Aluf Y, Finberg J (2012) Oxidative stress in Parkinson's disease. In: *Oxidative stress and free radical damage in neurology*, Springer-Verlag, New York, USA, pp 191-224.
- Vergo S, Johansen JL, Leist M, Lotharius J (2007) Vesicular monoamine transporter 2 regulates the sensitivity of rat dopaminergic neurons to disturbed cytosolic dopamine levels. *Brain Res* 1185: 18-32.
- Watkins P (2000) COMT inhibitors and liver toxicity. *Neurology* 55: S51-S52.
- Weiner WJ, Factor SA (2008) Timeline of Parkinson's Disease History since 1900. In: Factor S, Weiner W (eds.), *Parkinson's Disease: Diagnostic and Clinical Management*, 2nd ed, Demos Medical Publishing, New York, USA, pp 33-38.
- Wood L (2010) Clinical review and treatment of select adverse effects of dopamine receptor agonists in Parkinson's disease. *Drugs Aging* 27: 295-310.
- Wood L, Neumiller J, Setter S, Dobbins E (2010) Clinical review of treatment options for select nonmotor symptoms of Parkinson's disease. *Am J Geriatr Pharmacother* 8: 294-315.
- World Health Organization (2012) Dementia: A Public Health Priority. WHO Press, Geneva, Switzerland.
- Youdim MB y Bakhle YS (2006) Monoamine oxidase: isoforms and inhibitors in Parkinson's disease and depressive illness. *Br J Pharm* 147, S287-S296.
- Youdim M, Collins G, Sandler M, Bevan Jones A, Pare C, Nicholson W (1972) Human brain monoamine oxidase: multiple forms and selective inhibitors. *Nature* 236(5344): 225-228
- Youdim MB, Edmondson D, Tipton KF (2006) The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. *Nat Rev Neurosci* 7: 295-309.
- Youdim MB, Maruyama W, Naoi M (2005) Neuropharmacological, neuroprotective and amyloid precursor processing properties of selective MAO-B inhibitor antiParkinsonian drug, rasagiline. *Drugs Today* 41, 369-391.

Youdim MB, Finberg J, Tipton K (1988) Monoamine oxidase. In: *Advances in Experimental Pharmacology. Catecholamine*. Trendelenburg U, Weiner U (eds), Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp. 119-192.

Zhou C, Huang Y, y Przedborski S (2008) Oxidative stress in Parkinson's disease. A mechanism of pathogenic and therapeutic significance. *Ann NY Acad Sci* 1147: 93-104.