

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA**



TESIS DOCTORAL

**Nuevos sistemas de liberación controlada de tolcapona para el
tratamiento de la enfermedad de Parkinson**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Yaquelyn Casanova Segovia

Directores

**Emilia María Barcia Hernández
María Sofía Elisa Negro Álvarez**

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

**NUEVOS SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE
TOLCAPONA PARA EL TRATAMIENTO DE LA
ENFERMEDAD DE PARKINSON**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Yaquelyn Casanova Segovia

DIRECTORAS

Dra. Emilia María Barcia Hernández
Dra. María Sofía Elisa Negro Álvarez

MADRID, 2021

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

NUEVOS SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE TOLCAPONA PARA EL
TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Yaquelyn Casanova Segovia

DIRECTORAS

Dra. Emilia María Barcia Hernández
Dra. María Sofía Elisa Negro Álvarez

A mi hijo por ser mi gran motivación y fortaleza para nunca rendirme y poder llegar a ser un ejemplo para él. A mi madre por ser un pilar fundamental en mi vida, a mis hermanos y a mi esposo por todo el apoyo y cariño.

Agradecimientos

Primeramente quiero dar las gracias a Dios por permitirme vivir y disfrutar de cada día.

Quisiera agradecer a todas las personas que han contribuido a la realización de esta tesis doctoral.

En primer lugar, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a las directoras de este proyecto, las Dras. Emilia M^a Barcia Hernández y M^a Sofía Elisa Negro Álvarez, por la oportunidad de poder trabajar en su grupo de investigación. Muchas gracias por todo lo que me han enseñado, por su confianza, dedicación, por su infinita paciencia y por todo el inmenso apoyo que me han brindado todo este tiempo, les estare eternamente agradecida.

Hago extensivos estos agradecimientos a la Dra. Karla Slowing por su valiosa ayuda durante el periodo de experimentación con los animales. Al Dr. Luis García García por su gran colaboración y ayuda en dicho proceso. También agradecerle por toda la ayuda que recibí de su parte durante mi estancia en su grupo de investigación en la Unidad de Cartografía Cerebral del Instituto Pluridisciplinar, y como no dar las gracias a Rubén, María y a todos en el laboratorio, quienes siempre estuvieron dispuestos a echarme una mano durante todo ese tiempo. También quiero expresar mi enorme agradecimiento a la Dra. Ana M^a Fernández-Carballido por su gran ayuda en la experimentación con animales, por su amabilidad y apoyo.

Quisiera, también, agradecer a todos los profesores del departamento que me han apoyado de distintas formas a lo largo del camino. A la Dra. Paloma Ballesteros que siempre me dio ánimos y me ayudo a resolver muchas dudas durante todo este periodo. A la Dra. Paloma de la Torre por sus palabras de aliento, sus consejos y amistad que me brindó. No me puedo olvidar de la Dra. Ana I. Fraguas por echarme una mano cuando lo necesité. Al Dr. Santiago Torrado por su carisma y amabilidad al igual que al Dr. Juan José Torrado a quien acudí en algunas ocasiones cuando tenía dudas con algún equipo del laboratorio.

A mis compañeros y amigos del departamento. Nicola por su gran ayuda en los experimentos con animales a Mario siempre dando ánimos y alegrando un poco el día al igual que Mónica. A mi amigo Edison Pacheco por sus consejos y palabras de fortaleza

ante las situaciones difíciles y por echarme una mano cuando lo necesitaba. A mi amiga Hebbe por su apoyo, cariño y amistad. Para todos ellos solo tengo palabras de agradecimiento por todo el apoyo y ayuda que me han brindado durante todo este tiempo.

No puedo olvidarme de agradecer a Patricia, quien me ayudo cuando llegue a la Facultad, me enseñó muchas cosas y me tendió la mano en todo momento.

A mis vecinos de laboratorio: David y Sergio quienes me brindaron su ayuda muy amablemente, muchas gracias chicos.

Por ultimo, expresar el agradecimiento más profundo e infinito a mi familia. A mi hijo amado, que ha sido la fuerza y mi motor para seguir adelante en los momentos difíciles. A mi madre, por su ejemplo de lucha y honestidad; a cada uno de mis hermanos, aunque estamos separados por la distancia los llevo en mi corazón al igual que todos sus consejos, sus palabras de fortaleza y el apoyo incondicional que me brindan. A mi esposo por su apoyo en todo momento.

ABREVIATURAS

3-OMD	3- <i>O</i> -metildopa
6-OHDA	6-hidroxidopamina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AF	Autofluorescencia
AMS	Atrofia multisistémica
ANOVA	Análisis de la varianza
ATP	Adenosin trifosfato
BHE	Barrera hematoencefalica
BONT	Neurotoxina botulínica
CH₂CL₂	Diclorometano
C_{máx}	Concentración máxima en plasma.
COMT	Catecol- <i>O</i> -metiltransferasa
COX-2	Ciclo oxigenasa tipo-2.
CT	Células troncales
D1	Receptores tipo 1 de dopamina
D2	Receptores tipo 2 de dopamina
DS	Desviación estándar
DATSCAN	Técnica del 123I-ioflupano
DA	Dopamina
DCB	Degeneración cortico basal gangliónica
DCFH-DA	Acetato de diclorodihidrofluoresceina
DCM	Diclorometano
DDCI	Inhibidor de la dopamina descarboxilasa
DMSO	Dimetilsulfóxido
EA	Enfermedad de Alzheimer
ECP	Estimulación cerebral profunda
EE	Eficacia de encapsulación
EMA	European Medicines Agency
EP	Enfermedad de Parkinson
FDA	Food and Drug Administration
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GBA	Gen de la beta glucocerebrosidasa ácida
GFAP	Proteína ácida fibrilar de la glia.
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
HLA	Gen de los antígenos de leucocitos humanos
hfVM	Mesencefálico ventral fetal humano
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
Hsp70	Proteína de choque térmico 70
i.p.	Intraperitoneal
IFN-γ	Interferón gamma
IL	Interleuquina
IL-17	Interleuquina 17
IL-1b	Interleuquina 1b
IL-6	Interleuquina 6

iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
iPSC	Células troncales pluripotentes inducidas
ISRN	Inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina y noradrenalina
ISRN	Ihibidores selectivos de la recaptación de serotonina
LAMP2A	Proteína de membrana asociada a lisosoma de tipo 2A
LB	Cuerpos de Lewy
L-DOPA	Levodopa
LPS	Lipopolisacárido
LRKK2	Proteína quinasa con repeticiones ricas en leucina de tipo 2
LSS	Lauril sulfato sódico
MAO	Monoamino-oxidasa
MAO-B	Monoamino-oxidasa tipo B
MAPT	Microtubule-associated protein tau
MDS	Movement Disorder Society
MHC-1	Complejo de histocompatibilidad de clase 1
MCH-2	Complejo de histocompatibilidad de clase 2
MPP+	1-metil-4-fenilpiridinio
MP/MPs	Micropartícula/s
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
nDAS	Neuronas dopaminérgicas
NFκB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
NP/NPs	Nanopartícula/s
NSC	Células troncales neurales
PARK	Genes de la enfermedad de Parkinson
PARK1	Gen de la α -sinucleína
PARK2	Gen de la parkina
PARK6	Gen de la serin-treoninquinasa
PARK7	Gen de la proteína DJ-1
PBS	Tampón fosfato salino
PET	Tomografía por emisión de positrones
PGA	Ácido poliglicólico
PI	Índice de polidispersión
PLA	Ácido poliláctico
PLGA	Ácido poli(láctico-co-glicólico)
PSP	Parálisis supranuclear progresiva
PVA	Alcohol polivinílico
REM	Rapid eye movement
ROS	Especies reactivas de oxígeno
r.p.m.	Revoluciones por minuto
RT	Rotenona
SDS	Dodecil sulfato sódico
SEM	Microscopía electrónica de barrido

SN	Sustancia nigra
SNC	Sistema nervioso central
SNCA	Gen de alfa sinucleína
SNM	Síntomas no motores
SNpc	Sustancia nigra pars compacta
SNPr	Sustancia nigra pars reticulada
SPECT	Tomografía computarizada de emisión monofotónica
STN	Núcleo subtalámico
TC	Tolcapona
TH	Tirosina hidroxilasa
tmáx	Tiempo al que se alcanza la concentración máxima en plasma
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
UCH-L1	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1
UPS	Sistema ubiquitina proteasoma

ÍNDICE

RESUMEN	1
SUMMARY	7
I. INTRODUCCIÓN	13
1. Enfermedad de Parkinson	15
1.1. Manifestaciones clínicas	17
1.2. Etiología.....	21
1.2.1. Factores ambientales.....	22
1.2.2. Factores genéticos.....	23
1.3. Patogénesis.....	26
1.3.1. Disfunción mitocondrial.....	27
1.3.2. Estrés oxidativo.....	27
1.3.3. Alteración de la proteostasis.....	28
1.3.4. Inflamación y activación microglial.....	29
1.3.5. Excitotoxicidad.....	30
1.4. Diagnóstico.....	31
1.5. Tratamiento farmacológico de la enfermedad de Parkinson.....	36
1.5.1. Levodopa (L-DOPA)	36
1.5.2. Agonistas dopaminérgicos.....	38
1.5.3. Inhibidores de la MAO-B.....	38
1.5.4. Inhibidores de la COMT.....	39
1.5.5. Amantadina.....	40
1.5.6. Agentes neuroprotectores.....	40
1.6. Tratamiento quirúrgico de la enfermedad de Parkinson.....	43
1.6.1. Estimulación cerebral profunda(ECP)	43
1.6.2. Palidotomía.....	43
1.6.3. Implatación de las células fetales en la sustancia nigra.....	43
1.7. Tratamiento de las disquinesias.....	43
1.8. Modelos animales utilizados en la investigación de la enfermedad Parkinson....	44
1.8.1. Modelos basados en la utilización de pesticidas y neurotoxinas	45
1.8.2. Modelos genéticos.....	50
1.8.3. Modelo de lesión inducida por lipopolisacárido (LPS).....	52

1.8.4. Modelos preclínicos de terapia celular.....	52
2. Tolcapona.....	54
2.1. Introducción.....	54
2.2. Estructura y características físico-químicas.....	56
2.3. Mecanismo de acción y acciones farmacológicas.....	57
2.4. Interacciones.....	57
2.5. Aplicaciones terapéuticas.....	58
2.6. Características biofarmacéuticas y farmacocinéticas.....	58
2.7. Efectos adversos.....	59
II. PLANTEAMIENTO.....	61
III. OBJETIVOS.....	65
IV. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD NEUROPROTECTORA DE LA TOLCAPONA EN CULTIVOS CELULARES.....	69
1. Introducción.....	71
2. Condiciones experimentales de los ensayos realizados en cultivos celulares.....	75
2.1. Puesta a punto y estabilización de la línea celular SKN-AS.....	75
2.2. Ensayos de viabilidad de células SKN-AS mediante el método MTT.....	75
2.3. Ensayos de viabilidad celular y producción de ROS (Especies Reactivas de Oxígeno) en células SKN-N mediante citometría de flujo.....	76
2.4. Estudio del efecto de la tolcapona en la línea celular SKN-AS mediante microscopia confocal.....	78
2.5. Análisis estadístico.....	78
3. Resultados del estudio de la actividad neuroprotectora de la tolcapona en la línea celular SKN-AS.....	79
3.1. Ensayos de viabilidad celular en la línea celular SKIN-AS mediante el método MTT.....	79
3.2. Ensayos de viabilidad celular y producción de ROS (Especies Reactivas de Oxígeno) en células SKIN-AS mediante citometría de flujo.....	84
V. DESARROLLO DE SISTEMAS MULTIPARTICULARES DE TOLCAPONA: MICROPARTÍCULAS Y NANOPARTÍCULAS.....	95
1. Elaboración de micropartículas de PLGA cargadas con tolcapona.....	97
2. Elaboración de nanopartículas de PLGA cargadas con tolcapona	100
3. Caracterización de micropartículas y nanopartículas de tolcapona.....	101
3.1. Caracterización morfológica y distribución de tamaño de partícula.....	101

3.2. Determinación del rendimiento del proceso y eficacia de encapsulación.....	102
3.2.1. Cuantificación de la tolcapona por HPLC.....	103
3.3. Determinación del potencial Z.....	103
3.4. Estudios de cesión de tolcapona <i>in vitro</i>	104
4. Resultados obtenidos en el desarrollo de sistemas multiparticulares de tolcapona: Selección de las formulaciones	105
VI. ELECCIÓN DEL MODELO ANIMAL DE PARKINSON PARA EVALUAR LAS FORMULACIONES SELECCIONADAS (MP-TC4 Y NP-TC3)	113
1. Modelos animales utilizados en la enfermedad de Parkinson.....	115
VII. EVALUACIÓN DE LAS FORMULACIONES SELECCIONADAS EN UN MODELO ANIMAL INDUCIDO POR ROTENONA.....	143
1. Pruebas en animales.....	145
2. Tratamiento y grupos de animales	145
3. Evaluación del peso corporal.....	146
4. Pruebas de comportamiento.....	146
4.1. Pruebas de Catalepsia.....	146
4.2. Prueba de Aquinesia.....	147
4.3. Prueba de Natación	147
5. Evaluaciones Histológicas e Inmunohistoquímicas	148
5.1. Procesamiento cerebral.....	148
5.2. Tinción de NISSL.....	148
5.3. Ensayo Inmunohistoquímico de la TH.....	148
5.4. Ensayo Inmunohistoquímico de la GFAP.....	149
6. Procesamiento de órganos.....	149
7. Análisis estadístico.....	149
8. Resultados y discusión de la evaluación de las formulaciones seleccionadas (MP-TC4 y NP-TC3) en un modelo animal de Parkinson inducido por Rotenona.....	150
VIII. CONCLUSIONES.....	161
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	165



RESUMEN

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno neurodegenerativo complejo y de presentación heterogénea. Aunque aún no se dispone de ningún fármaco que cure la enfermedad, existen agentes para el control sintomático en cada una de sus fases, tratando de mantener en lo posible la calidad de vida de los pacientes. Además, dado que es el trastorno neurodegenerativo más frecuente tras la enfermedad de Alzheimer y que su factor de riesgo principal es la edad, la enfermedad de Parkinson supone, cada vez más, un reto de salud pública.

La tolcapona es un inhibidor de la catecol-O-metiltransferasa (COMT) empleado, junto con levodopa, en el control de las fluctuaciones motoras de la EP. La inhibición selectiva y reversible de COMT conduce a una reducción del catabolismo de levodopa a 3-O-metildopa, resultando en una mayor disponibilidad de dopamina en el cerebro, lo que permite una reducción de la dosis diaria total de levodopa.

OBJETIVO

El objetivo general de esta Tesis Doctoral ha sido el desarrollo, caracterización *in vitro* y evaluación en un modelo animal de dos nuevos sistemas terapéuticos de liberación controlada de tolcapona; microesferas y nanopartículas biodegradables de PLGA, para su administración en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Dichas formulaciones podrían mejorar los tratamientos actuales.

PARTE EXPERIMENTAL

Se estructura de la forma siguiente:

- Evaluación de la actividad neuroprotectora de la tolcapona en cultivos celulares.
- Desarrollo y caracterización de micropartículas de PLGA cargadas de tolcapona.
- Desarrollo y caracterización de nanopartículas de PLGA cargadas de tolcapona.
- Elección del modelo animal de Parkinson para evaluar las formulaciones seleccionadas.

- Evaluación de las formulaciones seleccionadas en un modelo animal de Parkinson inducido por rotenona.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación de la actividad neuroprotectora de la tolcapona en cultivos celulares

En primer lugar, se ha investigado el potencial efecto neuroprotector de la tolcapona en células de neuroblastoma humano (SKN-AS), mediante la determinación por MTT de la viabilidad celular y por citometría de flujo de la viabilidad celular y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Además, se ha analizado el efecto de la tolcapona en la recuperación del daño celular inducido por la neurotoxina (H_2O_2), empleando para ello microscopia confocal.

La incubación de las células tratadas con H_2O_2 , con concentraciones crecientes de TC supone una recuperación de la viabilidad celular. Los resultados obtenidos por citometría de flujo y microscopia confocal confirman el efecto neuroprotector de TC a las concentraciones ensayadas (40-100 μM), especialmente cuando se tratan las células con concentraciones de 80 μM y 100 μM .

Desarrollo y caracterización de micropartículas de PLGA cargadas de tolcapona

Se han preparado micropartículas cargadas con tolcapona mediante la técnica de extracción/evaporación del disolvente a partir de una emulsión O/A, utilizando como polímero biodegradable el ácido poli (láctico-co-glicólico) (PLGA 502) y distintas cantidades de tolcapona (70-120 mg). En todos los casos se han empleado 400 mg de PLGA 502.

La formulación más adecuada se ha preparado con 120 mg de tolcapona (formulación MP-TC4). Esta formulación presenta una alta eficacia de encapsulación ($85,13 \pm 2,08\%$), un tamaño medio de partícula de $17,00 \pm 3,22 \mu m$, y una liberación controlada del ingrediente activo durante 30 días.

Desarrollo y caracterización de nanopartículas de PLGA cargadas de tolcapona

Se han elaborado nanopartículas de tolcapona, utilizando también PLGA 502 como polímero formador de la cubierta. La técnica usada para su elaboración es la nanoprecipitación, empleando diferentes cantidades de tolcapona; 6, 8, 10 y 12 mg. En todos los casos, la cantidad de polímero empleada fue de 50 mg.

La formulación más adecuada se ha preparado con 10 mg de tolcapona (formulación NP-TC3). Esta formulación presenta un valor medio de eficacia de encapsulación de $53,69 \pm 9,09\%$, un tamaño medio de partícula de $182,59 \pm 23,94$ nm, un valor de potencial zeta de $-26,32 \pm 0,48$ mV, y es capaz de ceder el activo durante 5 días.

Elección del modelo animal de Parkinson para evaluar las formulaciones seleccionadas

Ambas formulaciones seleccionadas han sido evaluadas en un modelo animal de EP. Con el fin de seleccionar el modelo animal a emplear para los estudios *in vivo*, se ha realizado una revisión bibliográfica de los empleados en la evaluación de sistemas de liberación de fármacos para la enfermedad de Parkinson. En función de esta revisión, la eficacia *in vivo* de los sistemas multiparticulares desarrollados para tolcapona se ha evaluado en un modelo animal de Parkinson inducido por rotenona en ratas Wistar.

Evaluación de las formulaciones seleccionadas en un modelo animal de Parkinson inducido por rotenona

La neurotoxina empleada, rotenona, se ha administrado a una dosis de 2 mg/kg a ratas Wistar durante 43 días. Al final del estudio (44 días) los resultados obtenidos en los ensayos histológicos e inmunohistoquímicos (tinción de Nissl, proteína ácida fibrilar glial, y tirosina hidroxilasa), y en las pruebas de comportamiento (catalepsia, aquinesia y natación), han demostrado que la formulación que presenta una mayor capacidad para revertir la sintomatología causada por la rotenona corresponde a las nanopartículas de tolcapona (formulación NP-TC3),

cuando se administra a una dosis de 3 mg/kg/día cada 3 días a partir del día 15 del inicio del ensayo.

CONCLUSIONES

1. Los resultados obtenidos en la línea celular SN-AS confirman el efecto neuroprotector de TC especialmente a las concentraciones de 80 μ M y 100 μ M.
2. Los métodos empleados para la elaboración de las micropartículas y nanopartículas biodegradables de tolcapona han resultado adecuados para encapsular el activo.
3. En el modelo de Parkinson inducido con rotenona en ratas Wistar, la formulación que presenta una mayor capacidad para revertir la sintomatología corresponde a las nanopartículas de tolcapona (formulación NP-TC3).



SUMMARY

INTRODUCTION

Parkinson's disease (PD) is a complex neurodegenerative disorder with a heterogeneous presentation. To date there is no cure for the disease however, there are several drugs that can act controlling the symptoms along the progression of the disease in order to maintain the quality of life of the patients. Furthermore, given that it is the second most common neurodegenerative disorder after Alzheimer's disease, and that its main risk factor is age, Parkinson's disease is increasingly posing a public health challenge.

Tolcapone is a catechol-O-methyltransferase (COMT) inhibitor that is administered with levodopa to control motor fluctuations in PD. Selective and reversible inhibition of COMT leads to a reduction in the catabolism of levodopa to 3-O-methyldopa, resulting in increased availability of dopamine in the brain, thereby allowing for a reduction of total daily dose of levodopa.

OBJECTIVE

The main objective of this Doctoral Thesis is the development, in vitro characterization and in vivo evaluation in an animal model of two new controlled release systems of tolcapone (TC): biodegradable microspheres and nanoparticles using PLGA as polymer. Both systems are developed for Parkinson's disease in order to improve the current treatments.

EXPERIMENTAL

- Evaluation of the neuroprotective activity of tolcapone in cell cultures.
- Development and characterization of PLGA microparticles loaded with tolcapone.
- Development and characterization of PLGA nanoparticles loaded with tolcapone.
- Selection of the animal model of Parkinson's disease to evaluate the selected formulations.
- Evaluation of the selected formulations in a rotenone-induced animal model of PD.

RESULTS AND DISCUSSION

Evaluation of the neuroprotective activity of tolcapone in cell cultures

The effect of tolcapone on the recovery of neurotoxin H₂O₂-induced cell damage was analyzed in neuroblastoma cell line SN-AS, by MTT to determine cell viability, and by flow cytometry to determine cell viability and production of reactive oxygen species (ROS). Moreover, confocal microscopy was used to analyze the recovery produced by the drug regarding the neurotoxin-induced cell damage caused by H₂O₂. Incubation of neurotoxin-treated cells with increasing concentrations of TC resulted in a significant recovery of cell viability. The results obtained by both flow cytometry and confocal microscopy confirm the neuroprotective effects of TC at the concentrations tested (40-100 µM), especially when cells are treated with concentrations of 80 µM and 100 µM.

Development and characterization of PLGA microparticles loaded with tolcapone

Tolcapone microparticles were prepared by the solvent extraction/evaporation technique from an O/W emulsion, using poly (lactic-co-glycolic acid) as biodegradable polymer (PLGA 502) and different amounts of tolcapone (70-120 mg). In all cases, the amount of polymer used was 400 mg.

The most suitable formulation to achieve the proposed objective was prepared with 120 mg of TC (formulation MP-TC4). This formulation presents an encapsulation efficiency (85.13 ± 2.08%), an average particle size of 17.00 ± 3.22 µm, and controlled release of the active ingredient for 30 days.

Development and characterization of PLGA nanoparticles loaded with tolcapone

Tolcapone nanoparticles have also been prepared using PLGA 502 as biodegradable polymer. TC-loaded nanoparticles were prepared by the nanoprecipitation technique, using different amounts of TC: 6, 8, 10 and 12 mg. In all cases, the amount of polymer used was 50 mg.

The most suitable formulation was that prepared with 10 mg of tolcapone (formulation NP-TC3). This formulation exhibited mean encapsulation efficiency of $53.69 \pm 9.09\%$, mean particle size of 182.59 ± 23.94 nm, a zeta potential value of -26.32 ± 0.48 mV and was able to release tolcapone during 5 days.

Selection of the animal model of Parkinson's disease to evaluate the selected formulations

Both selected formulations were tested in an animal model of PD. In order to select the animal model for the in vivo tests, a literature review was carried out on the different models used for the evaluation of drug delivery systems designed for Parkinson's disease. Based on this review, the in vivo efficacy of the multiparticulate systems developed for tolcapone has been evaluated in an animal model of PD induced by rotenone in Wistar rats.

Evaluation of the selected formulations in a rotenone-induced animal model of PD

The neurotoxin used (rotenone) was administered at a daily dose of 2 mg/kg for 43 days to Wistar rats. At the end of the study (44 days) the results obtained in the histological and immunohistochemical tests (Nissl, glial fibrillar acid protein, and tyrosine hydroxylase), and in the behavioral tests (catalepsy, akinesia and swimming test), have demonstrated that the formulation showing greater capacity to reverse the symptoms caused by rotenone corresponds to tolcapone-loaded nanoparticles (formulation NP-TC3) which was administered at a dose of 3 mg/kg/day every 3 days from day 15th of the beginning of the test.

CONCLUSIONS

1. The results obtained in the SKN-AS cell line confirm the neuroprotective effects of tolcapone especially at concentrations of 80 μ M y 100 μ M.
2. The methods used for the preparation of biodegradable tolcapone-loaded micro- and nanoparticles are adequate to encapsulate the drug.

3. In the rotenone model of PD induced in Wistar rats, the formulation with the greatest capacity to reverse the symptoms corresponds to tolcapone-loaded nanoparticles (formulation NP-TC3).



I. INTRODUCCIÓN

1. ENFERMEDAD DE PARKINSON

La enfermedad de Parkinson (EP) y la enfermedad de Alzheimer (EA) son los trastornos neurodegenerativos más comunes, afectando a millones de personas en todo el mundo (Amiri *et al.*, 2013; Poewe *et al.*, 2017).

La enfermedad de Parkinson pertenece a la familia de las sinucleinopatías y se caracteriza patológicamente por pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra pars compacta (SNpc), que origina la progresiva denervación dopaminérgica del estriado y la formación de agregados de la proteína alfa-sinucleína. Cuando la pérdida de dopamina es del 50-60%, comienzan a hacerse evidentes los primeros síntomas de la enfermedad, fundamentalmente motores, tales como: temblor en reposo, rigidez, bradicinesia o lentitud en los movimientos, e inestabilidad postural, así como síntomas no motores; que abarcan disfunción gastrointestinal, depresión, anosmia, deterioro cognitivo, dolor y alteraciones del sueño, entre otros. A medida que progresa la neurodegeneración, la sintomatología se va haciendo más compleja y severa (Chaudhuri *et al.*, 2006).

La enfermedad fue descrita por primera vez como una “parálisis agitante” en 1817 por el Dr. James Parkinson (Parkinson J, 2002), pero en 1886 Jean-Martin Charcôt, fundador de la Neurología moderna, la rebautizó como Enfermedad de Parkinson, e indicó que los pacientes presentaban rigidez en lugar de parálisis (Charcôt JM, 1872). Tuvieron que pasar más de cien años hasta que Arvid Carlsson estableció las bases neuroquímicas de esta enfermedad, cuando descubrió que la dopamina (DA) actuaba como neurotransmisor (Carlsson *et al.*, 1957) y que se encontraba significativamente disminuida en el cerebro de pacientes con EP, en particular en el cuerpo estriado y en la sustancia nigra (Carlsson *et al.*, 1958).

Después de estos descubrimientos, se empezó a utilizar la terapia de reemplazo dopaminérgica con el precursor de la DA, levodopa (L-DOPA), para aliviar los síntomas motores de la enfermedad (Birkmayer y Hornykiewicz, 1961).

Aunque hay pacientes que no respondían bien a esta terapia, la levodopa incrementó notablemente la calidad de vida de los pacientes en los que sí era efectiva, pero pasados unos años de tratamiento, estos empiezan a desarrollar movimientos involuntarios denominados disquinesias (Marsden y Parkes, 1977). En la actualidad, los únicos tratamientos existentes están enfocados al

alivio de los síntomas, no habiéndose encontrado aún un remedio a la muerte neuronal que los provoca.

A pesar de todos los avances de la neurología, aún se desconocen available con exactitud las causas que desencadenan esta enfermedad, por lo que también se desconoce cómo prevenirla. Afecta tanto a hombres como a mujeres, y más del 70% de las personas diagnosticadas de EP supera los 65 años. Sin embargo, no es una enfermedad exclusivamente de personas de edad avanzada, ya que el 30% de los diagnósticos se produce en personas menores de 65 años, e incluso se ha descrito Parkinson infantil (Poewe *et al.*, 2017).

En la patogenia de la EP se proponen varios mecanismos como causantes de la lesión del grupo de neuronas presentes en la substantia nigra, sin que exista hasta el momento una causa directamente relacionada. Entre estos mecanismos se postula una combinación de predisposición genética junto con factores ambientales (Albin, 2006).

El factor genético, que inicialmente se propuso como única causa, se ve más asociado con la forma atípica de inicio temprano de la EP, que representa un porcentaje bajo de los casos, lo que sustenta la hipótesis de que más de un factor, además del genético, puede ser la causa de esta patología (Albin., 2006; Morgado *et al.*, 2007). Se han identificado al menos nueve loci y la clonación de genes involucrados en la forma familiar de la enfermedad (Morgado *et al.*, 2007).

Entre los factores ambientales propuestos se encuentran la oxidación desencadenada por la presencia de radicales libres, la acción de toxinas exógenas, como manganeso y los plaguicidas organofosforados, y otros posibles factores ambientales (Davies, 2008), como por ejemplo ocurre tras la exposición aguda a la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina, compuesto análogo a la meperidina, que comúnmente se encuentra como contaminante en psicoestimulantes ilícitos, y que es una causa conocida de desarrollo rápido de la enfermedad, por lo que se emplea en investigación para el desarrollo de modelos animales de la EP.

En un individuo sano, la generación de los movimientos motores coordinados por parte del cerebro, radica en un equilibrio entre la activación de los movimientos voluntarios o vía directa y la acción de la vía inhibitoria o vía indirecta. En ambas vías participa el neurotransmisor dopamina, así como sus receptores dopaminérgicos. Así, en condiciones normales, están implicados los receptores tipo 1 de dopamina (D1), situados en el globo pálido interno y en la parte reticular de la sustancia nigra, junto con las neuronas dopaminérgicas que proyectan al globo pálido externo,

donde se localizan los receptores tipo 2 de dopamina (D2). En los pacientes con EP, debido a la existencia de degeneración dopaminérgica, estas vías se encuentran afectadas, produciéndose una hipoactividad en la vía directa y una hiperactividad en la vía inhibitoria. Todo ello genera una incapacidad para la realización de los movimientos coordinados. La pérdida de comunicación dopaminérgica entre los ganglios basales y el cuerpo estriado genera una serie de acontecimientos causantes de la sintomatología clásica de la EP (temblor, rigidez muscular, bradicinesia).

Debido a que la dopamina participa como neurotransmisor a nivel sistémico en otras funciones del organismo, una disminución en sus niveles puede asociarse con otras alteraciones clínicas que afectan, por ejemplo, a la presión sanguínea y la contracción cardíaca o a la regulación hormonal de la prolactina. Por ello, en pacientes con EP pueden aparecer acontecimientos adversos adicionales, como hipoventilación central, una marcada hipotensión ortostática, mioclonía o incontinencia urinaria (Park *et al.*, 2018).

Como otras enfermedades neurodegenerativas, la edad de inicio es un factor importante, ya que tiene influencia en sus manifestaciones clínicas y en su progresión (Jankovic J., 2008; Schrag *et al.*, 2003). Síntomas no motores como trastornos neuropsiquiátricos y del sueño, dolor, disfunciones autonómicas, se desarrollan con frecuencia antes de la aparición del deterioro motor, y tienen un impacto muy negativo en la calidad de vida de los pacientes (Chaudhuri y Schapira, 2009).

1.1. Manifestaciones Clínicas

La EP es una enfermedad neurodegenerativa, crónica y progresiva, cuyos síntomas empeoran con el tiempo, a medida que progresa la neurodegeneración. Aproximadamente el 90% de los casos son esporádicos, es decir, sin una causa genética hereditaria. Antes de la existencia de la terapia con L-DOPA, la mortalidad de los pacientes era tres veces mayor que el resto de la población de la misma edad y aunque este fármaco ha mejorado cualitativamente su día a día, la esperanza de vida sigue siendo menor que la de la media del resto de población (D'Amelio *et al.*, 2006).

Clínicamente, cualquier afección que incluya déficit estriatal de DA o daños en el estriado, puede conducir a parkinsonismo. Los primeros síntomas se engloban en la fase “premotora” de la enfermedad, pudiendo trascurrir varios años antes de que se detecten síntomas motores, que

incluso pueden pasar inadvertidos o ser malinterpretados. Entre los citados síntomas podemos destacar sensación de astenia, rigidez, lenguaje monótono, disautonomía, disfunciones gastrointestinales, urinarias y sexuales, trastornos del estado del ánimo y del sueño y enlentecimiento general (Nalls *et al.*, 2011; Sveinbjornsdottir, 2016).

En la fase de síntomas motores (Tabla 1), destacan los denominados síntomas cardinales de la enfermedad: temblor, rigidez, bradicinesia o acinesia y alteraciones posturales:

➤ **Temblor en Reposo:** a 4-6 hercios, es el resultado de una contracción lenta de los músculos tanto agonistas como antagonistas. Es la forma más frecuente de presentación de la enfermedad, aunque no se manifiesta en todos los pacientes. El temblor es principalmente distal, afecta sobre todo a las extremidades superiores y, con menor frecuencia, a labios, mentón, lengua y extremidades inferiores. Es característico que desaparezca con el movimiento, para reaparecer de nuevo cuando el miembro vuelve a estar en reposo. También es típico que cese durante el sueño y aumente en situaciones de estrés y ansiedad (Sveinbjornsdottir., 2016).

➤ **Rigidez:** conocida como hipertonia parkinsoniana, y se caracteriza por una elevada rigidez debido al aumento del tono muscular, de manera que los músculos se encuentran en constante tensión. Afecta a los brazos, las piernas y el tronco, aumentando el tono durante el movimiento pasivo de una extremidad. Ésta puede ser sostenida durante todo el desplazamiento o durante el movimiento completo; en este caso se la denomina rigidez “de tubo de plomo”. La rigidez suele ser más evidente en los segmentos distales de las extremidades y en las articulaciones de la muñeca y el tobillo. Clínicamente se evalúa mediante el movimiento pasivo de varias articulaciones, mientras se le pide al paciente que intente relajar su extremidad. Se considera que hay rigidez cuando es necesaria más fuerza de la esperada para movilizar la articulación, en un cierto rango de movimiento (Cano de la Cuerda *et al.*, 2010). En ocasiones, la rigidez está sujeta a interrupciones rítmicas, denominándose entonces “rigidez de rueda dentada”, y se atribuye al temblor postural que afecta a la extremidad, aunque éste no sea siempre visible.

➤ **Bradicinesia o Acinesia:** es el síntoma más incapacitante de la enfermedad; y se caracteriza por la lentitud en la ejecución de cualquier movimiento, con una reducción progresiva de la velocidad y la amplitud de los movimientos repetitivos. Su consecuencia

es una falta de expresividad motora, con disminución del parpadeo. También puede afectar al habla, provocando una disminución del volumen de voz, así como a la masticación y la deglución. Influye también produciendo una disminución del balanceo de los brazos durante la marcha (Sveinbjornsdottir, 2016).

➤ **Alteraciones en el equilibrio y la coordinación:** a medida que la enfermedad evoluciona, los pacientes sufren una pérdida de reflejos posturales, adquiriendo una postura encorvada, que dificulta el mantenimiento de la posición vertical corporal, pudiendo ocasionar caídas involuntarias (Beitz, 2014).

Los síntomas de la EP a menudo comienzan en un lado del cuerpo, extendiéndose, en un período de tiempo de varios meses a pocos años, a ambos lados. Las alteraciones, que se perciben del lado opuesto del cuerpo, casi siempre presentan menor gravedad que en el lado inicial, condición que suele conservarse. A medida que los síntomas empeoran, las personas que padecen la enfermedad pueden tener problemas para caminar, hablar o realizar tareas sencillas, de manera que al cabo de unos 10-15 años, el enfermo de Parkinson suele requerir asistencia para la mayor parte de sus actividades diarias, pasando a ser totalmente dependiente al final de la enfermedad (Poewe, 2006).

Además, los pacientes pueden presentar síntomas no motores, que, aunque menos conocidos por su alta variabilidad, no por ello resultan menos importantes. Destacan las alteraciones producidas en el sueño, lentitud en el pensamiento, razonamiento y memoria, así como alteraciones neuropsiquiátricas (depresión, ansiedad, apatía, alucinaciones, delirios, etc.), entre otros (Rana *et al.*, 2015).

Síntomas motores
Relacionados con el movimiento y la movilidad. Pueden ser modificaciones de los síntomas principales de la enfermedad de Parkinson.
<ul style="list-style-type: none"> • Temblor. • Dificultad para levantarse de la silla. • Dificultad para usar las manos. • Calambres musculares. • Dificultad para hablar. • Lentitud general. • Rigidez general. • Problemas de equilibrio.
Síntomas no motores
Afectan al proceso de pensamiento, la sensibilidad y la sensación de bienestar.
<ul style="list-style-type: none"> • Ansiedad. • Intranquilidad. • Crisis de angustia. • Dificultad para respirar. • Insomnio, trastornos del sueño. • Sudoración excesiva. • Dificultad para pensar con claridad. • Lentitud del pensamiento. • Falta de energía. • Dolor.

Tabla 1. *Enfermedad de Parkinson. Síntomas motores y no motores más frecuentes.*

De todos ellos, el síntoma más frecuente de la enfermedad es el temblor en reposo, el cual aparece en alrededor de un 50% de los casos, aumentando este porcentaje hasta el 80% con el avance de la enfermedad. El segundo síntoma en orden de frecuencia es la alteración en la marcha, que suele comenzar en una extremidad (lado). Sin embargo, la persistencia de alteración asimétrica en la marcha debe hacer considerar la posibilidad de otras enfermedades, como la parálisis supranuclear progresiva. El tercer síntoma en frecuencia de presentación es la bradicinesia.

La fisiopatología de los síntomas no motores (SNM) aún no se comprende bien, aunque se postula la existencia de una disfunción de los sistemas dopaminérgico y no dopaminérgico (Fox, 2013).

Entre ellos, el dolor es un síntoma no motor importante de la EP, a menudo subestimado y tratado de manera inadecuada (Buhmann *et al.*, 2020). La neurobiología del dolor en la EP es compleja y parece implicar la neurotransmisión serotoninérgica, noradrenérgica, glutamatérgica y del ácido gamma-aminobutírico (GABA), además de los sistemas dopaminérgicos (Barone, 2010).

La pérdida olfativa es otro de los síntomas no motores comunes en la EP, y suele ocurrir a menudo en las primeras etapas, antes de la aparición de los síntomas motores (Pont-Sunyer *et al.*, 2015). La disfunción olfativa está asociada con un deterioro cognitivo y una progresión más rápida de la enfermedad (Barone, 2010).

En cualquier caso, debido a los diversos perfiles y estilos de vida de las personas afectadas por la EP, las discapacidades motoras y no motoras deben evaluarse en el contexto de las necesidades y tratamiento de cada paciente (Jankovic, 2008).

1.2. Etiología

La causa de la EP no está totalmente esclarecida hoy en día. Menos del 10% de los casos son debidos a factores genéticos, a los que se denomina parkinsonismo familiar. El otro 90% se denomina parkinsonismo esporádico o idiopático, y puede estar relacionado con factores ambientales, exposición a contaminantes, entre otros.

La hipótesis de que la enfermedad es provocada por toxinas ambientales fue dominante durante el siglo XX, consecuencia de la epidemia de encefalitis letárgica y los casos de EP inducidos por el subproducto de la síntesis de heroína; el 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP).

Sin embargo, con el descubrimiento de varios genes causantes de la enfermedad, se empezó a pensar en una susceptibilidad hereditaria. Hoy en día se asume que ambos factores pueden estar relacionados (Dauer y Przedborski, 2003).

1.2.1. Factores Ambientales

A pesar de que hasta ahora no se ha sugerido ningún factor ambiental específicamente asociado a la EP, numerosos estudios epidemiológicos han relacionado diversos factores ambientales con un mayor o menor riesgo de padecer la EP (Campdelacreu, 2014).

La hipótesis ambiental postula que la neurodegeneración resulta de la exposición a una neurotoxina que daña específicamente las neuronas dopaminérgicas. Teóricamente, la neurodegeneración progresiva de la EP se debería a una exposición continuada a esta toxina o por una exposición limitada, que iniciaría una cascada de eventos perjudiciales. Por ejemplo, se ha visto que personas drogo-dependientes desarrollaron un síndrome idéntico a la EP tras su intoxicación ocasional con MPTP (Langston *et al.*, 1983), lo que sería un caso prototípico de cómo un agente exógeno puede provocar la enfermedad.

También se ha postulado que la población rural está más expuesta a sufrir la enfermedad por el uso y contacto con pesticidas y herbicidas tales como el paraquat, estructuralmente similar al metabolito activo del MPTP 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP⁺), y la rotenona, que se comportan como toxinas mitocondriales (inhibidores del complejo mitocondrial I) (Tanner, 1992). Otros estudios no aceptan la hipótesis de que exista una relación entre la exposición a una toxina específica y la aparición de EP esporádico, argumentando para ello que, por ejemplo, el catión amonio cuaternario del paraquat no permitiría a la molécula atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) (Hisata, 2002) (Figura 1).

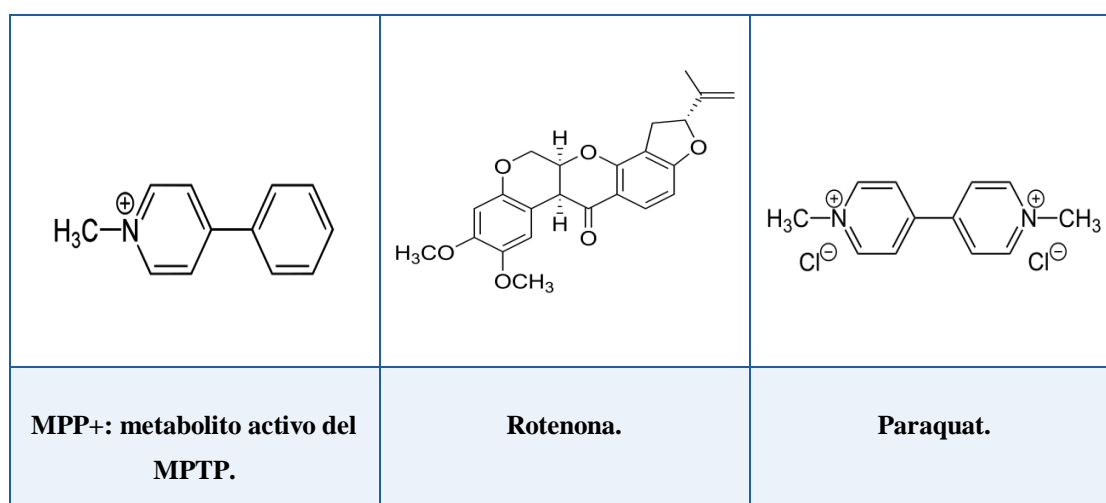


Figura 1. Estructuras químicas de MPTP⁺, rotenona y paraquat.

1.2.2. Factores Genéticos

En las últimas dos décadas se han descrito diversos genes que pueden participar en la génesis de la EP. El primero de estos genes fue identificado en una familia italo-americana, en la cual se encontró una herencia dominante autonómica para la α -sinucleína (Polymeropoulos *et al.*, 1997). Desde entonces se han identificado casi una veintena de loci implicados en la EP familiar, parkinsonismo y síndromes donde el parkinsonismo está predominantemente presente (Hardy *et al.*, 2009) (Tabla 2). Lo interesante de estos genes parkinsonianos es que han permitido profundizar en los procesos afectados en la génesis de la EP a partir de una mutación en un gen específico y trasladar esa información a los casos esporádicos (Dauer y Przedborski, 2003; Van Der Brug *et al.*, 2015).

Los genes que confieren susceptibilidad o que son causa directa de la misma, se agrupan bajo la denominación de PARK (PARK1-PARK16) (Kubo *et al.*, 2006; Klein *et al.*, 2007; Mena *et al.*, 2008; Hatano *et al.*, 2009). Se puede decir que los genes parkinsonianos implican alteraciones en los siguientes procesos, también encontrados en los casos esporádicos (Van Der Brug *et al.*, 2015):

- Alteración de la proteostasis con proteínas mal plegadas y acumulación de agregados proteicos (Parkina y UCH-L1).
- Defectos en la fosforilación de ciertos sustratos, incluyendo quinasas (PINK1, LRRK2).
- Disfunción mitocondrial y estrés oxidativo (PINK1, DJ-1).

El gen de la α -sinucleína (PARK1) ha sido el primero en ser reconocido como implicado en una forma anormal de la EP, que se transmite de manera autosómica dominante. La α -sinucleína se localiza fundamentalmente en el neocórtex del hipocampo y sustancia nigra (SN), y constituye la proteína mayoritaria aislada a partir de los cuerpos de Lewy (LB), una de las lesiones más características localizadas en el análisis postmortem de cerebros de personas que han padecido la EP (Cookson, 2012).

El gen parkina (PARK2), está implicado en un tipo de parkinsonismo familiar precoz, autosómico recesivo, que afecta a cerca del 50% de los casos de EP familiar (Klein y Westenberger, 2012). Este tipo de la enfermedad se manifiesta con prácticamente ausencia de cuerpos de Lewy, lo que sugiere que dicho gen juega un papel fundamental en la

formación/ausencia de este tipo de inclusiones. Así, parkina está implicado en una de las vías mayoritarias de degradación de proteínas en la célula; la vía de ubiquitina-proteasoma, de manera que debido a su actividad E3-ubiquitina ligasa reconoce proteínas específicas como sustrato, e induce su poliubiquitinación y posterior degradación (Hasegawa *et al.*, 2008).

El gen PINK 1 (PARK6), codifica la serin-treoninquinasa, cuya función no está totalmente esclarecida, aunque se postula que podría ejercer un papel protector en situaciones de estrés celular o incremento en la demanda de energía por las células (Valente *et al.*, 2004).

El gen LRRK2 (PARK8) codifica la LRRK2 (Leucine-Rich Repeat Kinase 2) o dardarina, proteína abundante en el cerebro, aunque también se encuentra en otros tejidos. El papel funcional de la dardarina está aún por dilucidar, aunque se ha postulado que interviene en reacciones que requieren interacción proteína-proteína, en determinados procesos de transducción de señales, en la formación de la estructura del citoesqueleto, y en funciones de aclaramiento celular mediante autofagia. Se conocen bastantes mutaciones del gen LRRK2 implicados en casos dominantes de la EP, siendo algunas de las más frecuentes en la población caucásica las G2019S y la R1441G. Se calcula que cerca del 30% de los casos de parkinsonismo familiar podrían deberse a una alteración en este gen, así como alrededor de un 2-3% de los casos no familiares. Las mutaciones del gen LRRK2 se asocian a parkinsonismo clásico de inicio tardío, con herencia autosómica dominante, y con una mayor predisposición a presentar síntomas psiquiátricos, tales como: depresión, ansiedad, irritabilidad, alucinaciones y demencia, que no están relacionados con la medicación dopaminérgica (Mena *et al.*, 2008).

El gen DJ1 (PARK7) está localizado en la región 1p36, contiene 8 exones y codifica una proteína de 189 aminoácidos que pertenece a la familia ThiJ/Pfp1. La frecuencia de mutaciones es muy baja, estando tan sólo presente en alrededor del 2% de los pacientes con EP de inicio temprano. La función del gen DJ1 podría ser la de proteger las neuronas del estrés oxidativo y/o del daño mitocondrial (Kubo *et al.*, 2006).

Más recientemente, y gracias a los estudios genómicos realizados a gran escala mediante el contraste de miles de análisis poblacionales, se han identificado otros loci relacionados con el riesgo de sufrir EP. Aunque este riesgo sea bajo, el conocimiento de nuevas vías implicadas en la muerte neuronal supone que se puedan desarrollar nuevas estrategias para bloquearlas (Van Der Brug *et al.*, 2015).

Así, se ha conseguido construir un mapa genético global que relaciona variaciones genéticas poco frecuentes, pero de alto riesgo, como las presentes en SNCA y LRRK2, junto con variaciones más frecuentes, de alto riesgo, que no son la causa directa de la enfermedad, como las sufridas por GBA y LRRK2, hasta las de alta frecuencia, pero bajo riesgo de SNCA, MAPT, LRRK2 y en el locus HLA (Nalls *et al.*, 2011). Llama la atención que existan loci que abarquen todo el espectro de frecuencia de los alelos de riesgo y severidad como, por ejemplo, algunas mutaciones puntuales en LRRK2 que son causantes de la enfermedad, mientras que polimorfismos del gen que son factores de riesgo elevado y otras variaciones de mayor frecuencia, confieren, sin embargo, un riesgo menor de desarrollar la EP (Paisán-Ruiz *et al.*, 2013).

Locus	Localización cromosómica	Gen	Herencia	Manifestaciones clínicas
PARK1	4q21-q23	α -sinucleína	AD	Cuerpos de Lewy. Inicio temprano y progresión lenta.
PARK2	6q25.2-q27	PARK2	AR	Inicio juvenil, progresión lenta.
PARK3	2P13	PARK3	AD	Inicio tardío. Cuerpos de Lewy.
PARK4	4p14-16.3	α -sinucleína (mutaciones múltiples)	AD	Cuerpos de Lewy
PARK5	4p14	UCH-L1	AR	Atrofia ocular, inicio infantil
PARK6	1p35-p36	PINK1	AR	Inicio temprano y progresión lenta.
PARK7	1p36.33-p36.12	DJ-1	AR	Inicio juvenil, progresión lenta.
PARK8	12p11.23-q13.11	LRRK2	AD	EP familiar de inicio tardío y esporádico. Pueden aparecer cuerpos de Lewy.
PARK9	1p36	ATP13A2	AR	Síndrome Kufor-Rakeb.
PARK10	1p32	PARK10	No determinado	Inicio tardío
PARK11	2q36-q37	GIGYF2	No determinado	Susceptibilidad de sufrir EP.
PARK12	Xq21-q25	PARK12	Ligada al cromosoma X	
PARK13	2P12	HTRA2	No determinado	
PARK14	18q11	PLA2G6	No determinado	
PARK15	22q12-q13	FBXO7	AR	Inicio temprano.
PARK16	1q32	FBXO7	No determinado	

Tabla 2. Genes asociados a la enfermedad de Parkinson. Localizaciones cromosómicas de los loci “PARK” definidos en la base de datos OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man). AD; autosómica dominante, AR; autosómica recesiva.

1.3. Patogénesis

Al margen del origen genético, ambiental o la interacción entre ambos, las características patológicas comunes de la EP son la pérdida de neuronas dopaminérgicas nigroestriatales y la presencia de inclusiones intracelulares o cuerpos de Lewy. Estos agregados proteicos están formados principalmente por acúmulos de la proteína α -sinucleína (Spillantini *et al.*, 1997), neurofilamentos y ubiquitina (Kuzuhara *et al.*, 1988).

Los cuerpos celulares de las neuronas nigroestriatales están en la SNpc, y proyectan, entre otras estructuras, al putamen. Estas neuronas contienen cantidades visibles de neuromelanina, de color negro, por lo que, al morir, se produce la despigmentación típica encontrada en estudios post mortem. Se estima que los síntomas se hacen visibles cuando los niveles de DA disminuyen aproximadamente un 80% en el putamen dorsolateral, lo que significa una elevada denervación de esta estructura, y cuando la muerte neuronal en la SNpc está bastante extendida y alcanza cerca del 60%, lo que dificulta el diagnóstico preventivo de la enfermedad (Bernheimer *et al.*, 1973). Durante la fase subclínica se produce un mecanismo compensatorio tanto en los ganglios basales como en otras áreas cerebrales, para suplir la falta de DA (Bezard *et al.*, 2003). Más adelante, también se produce la degeneración de neuronas no dopaminérgicas, como la vía colinérgica del núcleo basal de Meynert, las neuronas serotoninérgicas del núcleo del rafe (asociadas a la aparición de demencia y depresión), y las neuronas secretoras de hipocretina en el hipotálamo (Braak *et al.*, 2003).

En la vía directa, las neuronas espinosas medianas del estriado producen una inhibición GABAérgica del globo pálido interno y la sustancia nigra pars reticulada (SPNr), que a su vez inhibe el tálamo, cuya función es excitatoria sobre la corteza frontal, traduciéndose en la ejecución del movimiento. La función de la vía indirecta es la contraria y normalmente está inhibida por la SPNr. Al activarse, las proyecciones GABAérgicas inhiben al núcleo subtalámico, que estaría controlando al globo pálido interno y la corteza frontal, produciendo un cese del movimiento. Muchos de los mecanismos por los que se cree que degeneran las neuronas dopaminérgicas nigroestriatales están interconectados entre sí actuando de manera concertada, lo que sin duda tiene que influenciar el diseño de futuras estrategias neuroprotectoras que deberían basarse en un tratamiento farmacológico multifactorial (Youdim *et al.*, 2007).

Entre estos mecanismos destacan los siguientes:

1.3.1. Disfunción mitocondrial

La primera evidencia de disfunción mitocondrial encontrada en la EP fue la inhibición del complejo I (Schapira *et al.*, 1990), y poco después, de una de las enzimas clave del ciclo de Krebs, la α -cetoglutarato deshidrogenasa (Mizuno *et al.*, 1994) en la SN de pacientes con la enfermedad. También se ha visto la existencia de una alteración de la función mitocondrial en casos de EP familiar con mutaciones en α -sinucleína, parkina, PINK1 y DJ-1, y de LRRK2 (Schapira, 2008; Schapira y Jenner, 2011). En concreto, parkina y PINK1 actúan conjuntamente en la autofagia de las mitocondrias defectuosas, llamada mitofagia (Narendra *et al.*, 2008). La existencia de un déficit en la cadena de transporte de electrones a nivel mitocondrial, junto con la existencia de depósitos de hierro en el cerebro, que estarían actuando como catalizadores en la reacción de Fenton para la formación de radicales libres, explicarían el hecho de que las personas afectadas por EP poseen un mayor estrés oxidativo, junto con una menor defensa de los mecanismos antioxidantes (Jomova *et al.*, 2010).

1.3.2. Estrés Oxidativo

Los mecanismos de óxido-reducción desempeñan un papel importante en la fisiología celular, y engloban procesos de renovación de membranas, supervivencia de células en el sistema nervioso durante etapas embrionarias, mitosis, migración celular, síntesis y liberación de hormonas, aumento en la transcripción de citocinas durante procesos inflamatorios, así como participación en la señalización celular y mecanismos de segundos mensajeros.

Los radicales libres y las especies reactivas de oxígeno (ROS) se generan en el metabolismo celular, y tienen como objetivo la obtención de energía. Para poder mantener un equilibrio de óxido-reducción en el organismo, los sistemas antioxidantes eliminan las ROS producidas. En situaciones patológicas como la EP, se produce un estado de estrés oxidativo, y como consecuencia se aumenta la producción de radicales libres y de ROS (Lin y Beal, 2006). Cuando los mecanismos celulares no pueden contrarrestar estos cambios, se inicia una cadena de reacciones que involucran alteraciones de los canales iónicos, junto con un aumento en la liberación de calcio y en la producción de óxido nítrico (Halliwell, 2006). El aumento en los niveles de calcio y óxido nítrico estimula la producción de interleucinas inflamatorias, causando gliosis e incrementando el estado de estrés oxidativo. Además, la producción de ROS también

activa el factor nuclear kappa beta (NF κ B), lo que conduce a la alteración del sistema inmune (Flood *et al.*, 2011).

En la actualidad existen evidencias demostradas de las propiedades de agregación de α -sinucleína y de su asociación con el estado de estrés oxidativo presente en la EP. Así, se ha observado *in vitro* que los agregados tipo amiloide de la α -sinucleína son similares a los observados *in vivo* (Jenner y Olanow, 1996), y que además se encuentran inducidos por co-incubación con cobre (II), Fe/peróxido de hidrógeno, o citocromo c/peróxido de hidrógeno (Sayre *et al.*, 2001).

Las deficiencias en las principales enzimas antioxidantes en el cerebro, como la catalasa superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa, la reducción en los niveles de glutatión reducido y la menor señalización mediada por Nrf2 (Cuadrado *et al.*, 2009), al igual que la existencia de peroxidación lipídica (malondialdehído, hidroperóxidos, 4-hidroxinonenal), oxidación del ADN (8-hidroxi-2'-desoxiguanosina), la formación de agregados de α -sinucleína (Tofaris y Spillantini, 2005), la existencia de alteraciones en el metabolismo del hierro y los depósitos de este metal que se forman en la SNpc, junto con otros acontecimientos observados en muestras de pacientes o en modelos experimentales de la EP, son todos indicadores de que el estrés oxidativo en la EP es un hecho real e importante que contribuye notablemente a su patogénesis (Dong *et al.*, 2009), y que además no parece limitarse solamente al cerebro (Kikuchi *et al.*, 2002). El origen de los radicales libres implicados en el estrés oxidativo apunta tanto a fuentes neuronales como gliales, procedentes de un malfuncionamiento a nivel mitocondrial y, posiblemente también a nivel del retículo endoplásmico (Surmeier *et al.*, 2007; Schapira y Jenner, 2011).

1.3.3. Alteración de la proteostasis

La presencia de diferentes proteínas agregadas en los cuerpos de Lewy condujo a la idea de que el catabolismo de las proteínas dañadas o mutadas podría estar interrumpido en la EP (Giasson *et al.*, 2000), situando en el punto de mira al sistema ubiquitina-proteasoma (UPS), cuya implicación ha sido corroborada tras el descubrimiento de las mutaciones en parkina y UCH-L1, que tienen función como ligasa proteína-ubiquitina y en el reciclado de ubiquitina. Además, se ha descrito la existencia de cambios en la actividad catalítica y en la expresión en la SNpc del proteasoma 26S (también afectado por la alteración de la función

mitocondrial) que están asociados con el hecho de que la degradación de la α -sinucleína (McNaught y Jenner, 2001; Tofaris *et al.*, 2001) estuviese interrumpida en la EP. De hecho, la expresión de las proteínas de membrana asociadas al lisosoma de tipo 2A (LAMP2A), que median la autofagia por chaperonas, y la proteína de choque térmico 70 (Hsp70) se encuentra reducida en la SNpc de pacientes con EP (Alvarez-Erviti *et al.*, 2010).

1.3.4. Inflamación y activación microglial

La inflamación presente en las enfermedades neurodegenerativas, como la EP, se produce como respuesta a una lesión o alteración en el sistema nervioso central (SNC), y consiste principalmente en una respuesta inmune innata, que activa las células de la glia (astrocitos y microglía) (Gao *et al.*, 2003; Block y Hong, 2005; Hanisch y Kettenmann, 2007). Además, la existencia de inflamación en el sistema periférico aumenta más aún el daño en la SN y parece ser debido a una ruptura de la BHE, lo que estaría permitiendo que las citoquinas proinflamatorias periféricas afectasen al cerebro (Hernández-Romero *et al.*, 2012).

En condiciones normales, la microglía se encuentra en reposo, pero si existe una lesión o infección, se activa (Liu *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2012). Una vez activada, sufre un proceso de maduración originando dos estadios diferentes: el activo y el reactivo. La microglía activada, desde el punto de vista estructural, se caracteriza por ser una célula ramificada, con un cuerpo celular más grande que la no activada, y que presenta proyecciones cortas. Expresa receptores del complemento CR3 y del complejo de histocompatibilidad de clase-1 (MHC-1). Además, activa una serie de productos citotóxicos, que provocan daño y muerte neuronal, tales como: factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleuquinas (IL-1b) e interferón gamma (IFN- γ), factores que son potentes inductores del aumento de producción de óxido nítrico (Liu *et al.*, 2003; Hirsch y Hunot, 2009). Por otra parte, la microglia reactiva es más pequeña, esférica, carece de ramificaciones, y en la que está aumentada la expresión de MHC-1 y MHC-2 y la capacidad de presentar antígenos a las células T para su degradación. Por lo tanto, después de un estímulo inflamatorio descontrolado, la activación de la microglía interviene en la extensión de la lesión cerebral (Wyss-Coray y Mucke, 2002).

En estudios realizados en muestras post mortem de pacientes con EP, se ha encontrado microglía activada y astrocitosis en la SNpc (McGeer *et al.*, 1988). En esta microglía activada está presente el óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (Hirsch *et al.*, 2003), fuente de óxido nítrico

(NO), que a su vez puede reaccionar con el superóxido, tanto de origen glial como neuronal, para formar peroxinitrito, altamente reactivo, y que puede nitrar proteínas y otras biomoléculas, como la α -sinucleína, forma en la que se encuentra en los cuerpos de Lewy (Giasson *et al.*, 2000).

Todas estas evidencias señalan el valor que tiene en la patogénesis de la EP la activación de las células gliales, hasta el punto de que los niveles en suero de RANTES, una quimioquina producida por la microglía activada, que se sabe se encuentran muy elevados en la EP, puede utilizarse y se ha propuesto como biomarcador de la enfermedad (Rentzos *et al.*, 2007).

Un segundo tipo de células de la glía son los astrocitos; que actúan como puente para suministrar los nutrientes de los capilares sanguíneos a las neuronas, y que son el lugar principal de almacenamiento de glucógeno en el cerebro. Los astrocitos se activan mediante diversas modificaciones estructurales, que reciben el nombre de astrocitosis. La característica principal de la astrocitosis es el aumento en el número y tamaño de la proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP), que forma parte del citoesqueleto, y es considerada como el principal marcador de astrocitosis (Raine, 2000). La función precisa de la molécula de GFAP todavía no está clara, aunque parece que un aumento en los niveles de GFAP provoca una mayor producción de esta proteína en las células, así como un aumento en el número de astrocitos, ya sea debido a su proliferación o a su migración. Una de las funciones más importantes de los astrocitos activados es su participación en la respuesta inmune del sistema nervioso central. Se ha visto que los astrocitos activos producen moléculas que están implicadas en la iniciación y regulación de la respuesta inflamatoria. Entre ellas se incluyen citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1b, IL-17 y IL-6) y antiinflamatorias, quimiocinas, eicosanoides, prostaglandinas y tromboxanos (Mrak y Griffin, 2005).

Por otra parte, también se ha demostrado que los astrocitos activos conducen a la expresión de la ciclo-oxigenasa tipo-2 (COX-2) y del óxido nítrico sintasa, que provocarían la producción de ROS y de NO, responsables del estrés oxidativo y de la muerte neuronal (Rappold y Tieu, 2010).

1.3.5. Excitotoxicidad

Tanto el cuerpo estriado, donde se localizan las terminaciones nigroestriatales dopaminérgicas, como la SNpc, donde se encuentran los cuerpos celulares de estas neuronas, están sometidos a control glutamatérgico, por lo que una alteración en la homeostasis de este

neurotransmisor puede ser parte del proceso patogénico en la EP. Se cree que la causa de la excitotoxicidad en la EP es la hiperactividad del núcleo subtalámico (STN), que libera glutamato e inerva la SNpc y el segmento interno del globo pálido (Bevan *et al.*, 2002; Steigerwald *et al.*, 2008). Así, a medida que se produce la pérdida neuronal en la SNpc, aumenta la actividad glutamatérgica del STN, que amplifica la muerte celular, y que contribuye a la evolución de algunos de los síntomas clínicos de la EP, por ejemplo; el temblor parkinsoniano.

1.4. Diagnóstico

El diagnóstico de la EP se basa principalmente en el estudio de los síntomas, los antecedentes, y el examen físico, pudiendo ser necesaria la realización de estudios complementarios, incluyendo técnicas de neuroimagen y el empleo de biomarcadores. La buena respuesta al tratamiento dopaminérgico también constituye un dato diagnóstico importante (Jankovic, 2008; Lees *et al.*, 2009; Shulman *et al.*, 2011).

El diagnóstico definitivo precisa de la confirmación de los hallazgos neuropatológicos característicos, es decir; pérdida neuronal a nivel de la SNpc y la presencia de cuerpos de Lewy. La confirmación histopatológica no se alcanza en vida, realizándose post-mortem en la mayoría de los casos en los que se obtiene (Dickson *et al.*, 2009). No obstante, los criterios clínicos más empleados son los dados por el Parkinson's UK Brain Bank (Tabla 3) (<https://www.parkinsons.org.uk>), que permiten definir con una precisión elevada, cercana al 75-95%, que realmente se trata de una EP (Postuma *et al.*, 2015; Martínez-Fernández *et al.*, 2016). Se fundamenta en lo siguiente:

- La presencia de un parkinsonismo, definido por bradicinesia o lentitud de movimiento y al menos otro signo motor.
- La exclusión de otras causas justificativas, generalmente descartadas por los antecedentes del paciente y el examen físico-neurológico.
- La existencia de datos característicos de la EP que apoyen este diagnóstico (Postuma *et al.*, 2015). Recientemente, la Movement Disorder Society (MDS) ha publicado unos nuevos criterios que están pendientes de ser formalmente validados, y que se fundamentan en los

mismos principios que los criterios “clásicos” del Parkinson's UK Brain Bank (Tarakad y Jankovic, 2017).

Estos criterios están siendo revisados, para su mejora, por la Movement Disorders Society (MDS) (Berg *et al.*, 2015).

Hay que tener en cuenta que otros trastornos neurodegenerativos pueden parecerse clínicamente a la EP, como ocurre con la demencia de cuerpos de Lewy, la atrofia multisistémica o la parálisis supracraneal progresiva. Este grupo de disfunciones representan aproximadamente al 9-33% de los pacientes en los que existe sospecha de EP. En estos casos, el diagnóstico diferencial entre la EP y otros trastornos productores de parkinsonismo puede ser difícil, principalmente en los estadios tempranos de la enfermedad, cuando se superponen los signos y síntomas. Sin embargo, algunas características clínicas pueden ayudar a diferenciarlos. Por ejemplo, en la atrofia multisistémica y en la parálisis supranuclear progresiva, existe degeneración corticobasal diferente a la observada en la EP. Por lo que se refiere a la demencia de cuerpos de Lewy, se caracteriza por escaso temblor y síntomas psiquiátricos frecuentes, con alucinaciones visuales e hipersensibilidad neuroléptica (McKeith *et al.*, 2005).

1. Diagnóstico de la EP
<p>Bradicinesia: lentitud en el inicio de los movimientos voluntarios con reducción progresiva de la velocidad y amplitud del mismo tras una acción repetida. Además, uno de los siguientes signos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Rigidez. • Temblor de reposo 4-6 hercios (Hz). • Inestabilidad postural.
2. Criterios de exclusión de la EP
<p>Antecedente de <i>ictus</i> de repetición con una progresión escalonada de los signos parkinsonianos.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Antecedentes de traumatismos craneoencefálicos repetidos. • Antecedente de encefalitis. • Tratamiento con neurolépticos al inicio de la sintomatología. • Existencia de más de un familiar afectado. • La enfermedad remite de forma sostenida. • Afectación estrictamente unilateral después de tres años. • Paresia supranuclear de la mirada. • Signos cerebelosos. • Afectación autonómica importante de forma precoz. • Aparición de demencia de forma precoz con alteración en memoria, lenguaje y praxias. • Presencia de un tumor cerebral o hidrocefalia comunicante en un escáner cerebral. • Respuesta negativa a una dosis suficiente de levodopa una vez excluida (malabsorción). • Exposición a MPTP.
3. Datos de apoyo positivo durante del seguimiento de la enfermedad
<p>Se requiere tres o más para el diagnóstico de la enfermedad de Parkinson establecida.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Inicio unilateral. • Presencia de temblor de reposo. • Curso progresivo. • Asimetría mantenida con predominio de la afectación en un lado del cuerpo. • Respuesta excelente a levodopa (70-100%). • Presencia de discinesias marcadas inducidas por levodopa. • Respuesta a levodopa tras 5 años o más. • Duración de la enfermedad 10 años o más.

Tabla 3. Criterios dados por el Parkinson's UK Brain Bank para el diagnóstico de la EP.
MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridiniol.

Los elementos fundamentales para llegar a este diagnóstico clínico son anamnesis y exploración neurológica detalladas. En la anamnesis se describen como signos de EP el curso lento y progresivo de la clínica cardinal motora y su distribución típicamente asimétrica (Djaldetti *et al.*, 2006). Es fundamental además saber qué otra medicación está tomando el paciente, ya que varios fármacos, debido a su acción bloqueante dopaminérgica, pueden inducir un parkinsonismo farmacológico, como puede ocurrir con neurolépticos, con la excepción de la clozapina y la quetiapina, algunos antieméticos como la metoclopramida, fármacos para tratar la flatulencia (clebopride) y antivertiginosos (sulpiride y tietilperazina), entre otros (Bondon-Guitton *et al.*, 2011). El parkinsonismo secundario a fármacos suele tener características distintas a la EP idiopática, ya que la clínica es predominantemente rígida-acinética y su presentación es simétrica.

En la exploración neurológica, aparte de las manifestaciones motoras características de la EP (temblor de reposo, rigidez, bradicinesia), se debe descartar la presencia de signos atípicos indicativos de otras causas, como son parálisis supranuclear de la mirada (característico de la parálisis supranuclear progresiva o PSP), existencia de alteraciones cerebelosas o del equilibrio (típicas de la atrofia multisistema o AMS y de la PSP), déficits cognitivos clínicamente significativos de inicio precoz, signos corticales; como apraxia motora o alteraciones de la sensibilidad cortical (especialmente en el síndrome/degeneración cortico basal gangliónica o DCB), y disfunción autonómica propia de la AMS (Williams y Litvan, 2013). Puede ayudar al diagnóstico en casos dudosos realizar la administración de levodopa, ya que la EP responde de forma significativa a este fármaco, mientras que en los parkinsonismos secundarios y atípicos la respuesta suele ser más limitada.

Aunque no es estrictamente necesario para el diagnóstico, a todo paciente con sospecha de EP se le debería realizar una analítica general básica con medición de hormonas tiroidea, al igual que una resonancia magnética de cráneo puede ser de utilidad para descartar lesiones isquémicas crónicas, cuando hay sospecha de un parkinsonismo vascular o en casos en que se sospeche el diagnóstico de parkinsonismo atípico, ya que existen hallazgos característicos de cada entidad que permiten orientar el diagnóstico. Estudios de neuroimagen funcional como el SPECT de transportadores de dopamina o DaTSCAN o el PET con el trazador [18F]-L-6-fluorodopa, evalúan la integridad de la vía dopaminérgica y pueden ayudar en casos en que exista la duda.

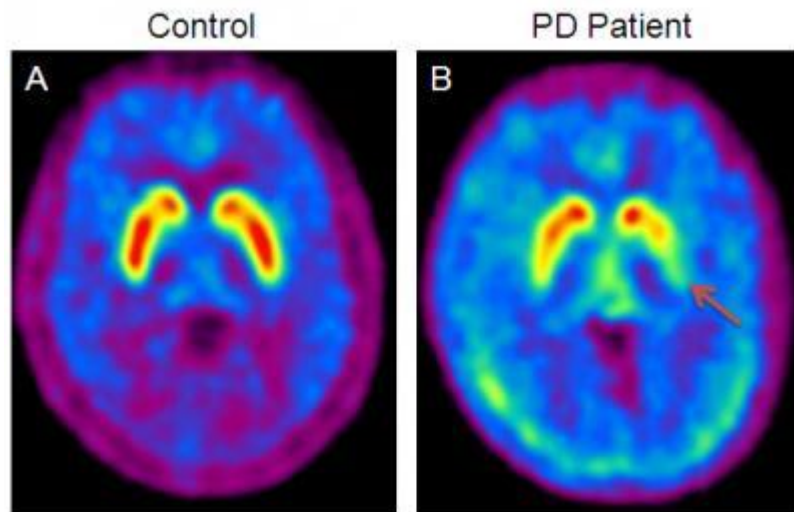


Figura 2. PET (tomografía por emisión de positrones) obtenido con 18-fluorodopa que muestra una alta captación estriatal (valor más alto en rojo). B. Ejemplo de un paciente con enfermedad de Parkinson con signos motores confinados principalmente a las extremidades izquierdas. La captación está marcadamente reducida en el putamen posterior derecho (el área indicada por la flecha es 70% por debajo de lo normal) y en menor grado en el putamen anterior y el caudado del hemisferio izquierdo. Modificado de Obeso JA. *et al.*, 2010.

Se denomina diagnóstico en fase prodrómica cuando las manifestaciones de neurodegeneración de la EP están presentes, pero el diagnóstico clínico clásico no es posible. Los enfermos típicamente suelen tener un desarrollo gradual de los síntomas no motores durante varios años antes de que comiencen los síntomas motores. Los síntomas prodrómicos no motores incluyen: trastorno de conducta del sueño en la fase de movimientos oculares rápidos, REM), somnolencia diurna excesiva, pérdida del olfato, estreñimiento, disfunción urinaria, hipotensión arterial ortostática (no atribuida a exceso de agentes hipotensores) y depresión. Dichos síntomas no son específicos de la enfermedad, pero cuando se asocian es mayor su posibilidad (Heinzel *et al.*, 2019; Postuma y Berg, 2019).

Además de las características no motoras, los marcadores propuestos para la fase prodrómica son: una puntuación >3 en la Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS, 1987) o >6 en la versión UPDRS de la International Parkinson and MDS (UPDRS-MDS, 2008) con exclusión de puntajes de temblor postural y de acción, captación dopaminérgica presináptica anormal, y consideración de varios marcadores de riesgo (sexo masculino, exposición a solvente ocupacional, exposición regular a pesticida, e historia familiar de enfermedad de Parkinson de primer grado) (Barber *et al.*, 2017; Heinzel *et al.*, 2019).

En la última década ha ocurrido una expansión en el campo de la fase prodrómica (Postuma y Berg, 2019). Recientemente, se han valorado nuevos marcadores: diabetes mellitus tipo 2, déficit cognitivo global, inactividad física, y niveles bajos de urato en plasma en hombres.

1.5. Tratamiento farmacológico de la Enfermedad de Parkinson

Las enfermedades del sistema nervioso central (SNC) comprenden una amplia gama de afecciones neurológicas, que en su mayoría carecen de tratamientos efectivos (Lee y Trojanowski, 2006). Al igual que para otros trastornos neurodegenerativos importantes, en la actualidad no existen tratamientos curativos de la EP, por lo que se emplean tratamientos paliativos de los síntomas (Barker *et al.*, 2018). El desarrollo de agentes que interactúen con varios sistemas de neurotransmisión en el SNC podría ser de gran utilidad para el tratamiento de esta enfermedad (Fox, 2013).

1.5.1. Levodopa (L-DOPA)

La terapia de reemplazo de neurotransmisores con el precursor de la dopamina levodopa sigue siendo el tratamiento sintomático estándar de la enfermedad (Schapira *et al.*, 2006).

Se administra levodopa, en lugar de DA, porque ésta es incapaz de atravesar la barrera hematoencefálica. Una vez en el estriado, la L-DOPA es transformada en DA por las neuronas dopaminérgicas supervivientes, pero también existe síntesis extra-dopaminérgica por parte de neuronas serotoninérgicas, noradrenérgicas, e incluso en la glía (De Deurwaerdère *et al.*, 2017). Habitualmente se administra junto con inhibidores de la DOPA descarboxilasa periférica (carbidopa, benserazida), de la catecol-O-metil transferasa (entacapona, tolcapona) y de la monoamino oxidasa B (rasagilina, selegilina) para aumentar la biodisponibilidad de DA, al evitar la degradación periférica de la L-DOPA (Connolly y Lang, 2014). Aun así, el porcentaje de fármaco que es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica sigue siendo bajo, pero eficaz durante unos años, a partir de los cuales pierde eficacia (Nyholm *et al.*, 2002).

Los síntomas motores pueden tratarse inicialmente con terapias dopaminérgicas; sin embargo, la enfermedad continúa progresando. Por lo tanto, los pacientes con EP tienen una

necesidad urgente de terapias modificadoras de la enfermedad que puedan ralentizar o detener la progresión incesante de los síntomas y el proceso neurodegenerativo (Shihabuddin *et al.*, 2018).

Las complicaciones motoras asociadas con la terapia crónica con levodopa incluyen desvanecimiento, retraso en la aparición del efecto, fenómeno on-off o pérdida puntual y transitoria del efecto, y discinesias. El tipo de fluctuación motora más frecuente, denominado deterioro de fin de dosis o wearing-off, consiste en que los síntomas comienzan a reaparecer antes del momento de la toma de la siguiente dosis del medicamento. A medida que el wearing-off se hace más evidente, el lapso de tiempo durante el cual se experimenta una buena respuesta a la levodopa, (conocido como tiempo 'on'), se acorta, alargándose aquel durante el cual se produce una respuesta deficiente (conocido como tiempo 'off').

Las complicaciones motoras son el resultado de la combinación de múltiples factores subyacentes. Así, la disfunción terminal dopaminérgica estriatal juega un papel fundamental en la respuesta variable al tratamiento con levodopa. Con el avance de dicha disfuncionalidad junto con la pérdida de dopamina, las neuronas del estriado pierden lentamente la capacidad de almacenar dopamina en las vesículas terminales. Además, la administración oral de levodopa a intervalos de tiempo produce una estimulación pulsátil de las neuronas del estriado, que se traduce en cambios a nivel del receptor, los cuales contribuyen a las fluctuaciones que se observan en la respuesta clínica al fármaco (Chaudhuri *et al.*, 2018).

La biodisponibilidad por vía oral de la levodopa se ve afectada por diversos factores, como vaciamiento gástrico retardado y absorción deficiente a nivel intestinal y a través de la barrera hematoencefálica (Virhammar y Nyholm, 2017; Chaudhuri *et al.*, 2018).

Los fármacos que actúan únicamente a nivel del sistema dopaminérgico apenas producen efecto sobre los síntomas no motores de la enfermedad, a diferencia de los que interactúan con varios sistemas implicados en la neurotransmisión (Fox, 2013).

Como alternativa, se han desarrollado agonistas dopaminérgicos de larga duración, y agentes no dopaminérgicos que pueden mejorar la función motora y reducir la incidencia de complicaciones motoras (Schapira *et al.*, 2006).

Sin embargo, a pesar de los avances en el desarrollo de nuevos agentes farmacológicos, siguen siendo tratamientos sintomáticos, por lo que hay una gran necesidad de búsqueda y

desarrollo de agentes modificadores de la enfermedad que prevengan, mejoren o reviertan la neurodegeneración en la EP, algo aún no logrado (Hurtado-Lorenzo y Anand, 2008).

1.5.2. Agonistas Dopaminérgicos

A este grupo pertenecen agentes como apomorfina, bromocriptina, pramipexol y rotigotina, que actúan estimulando directamente los receptores dopaminérgicos de las neuronas de proyección estriatal. Estos compuestos presentan diferentes afinidades por los receptores D1/D2, pero por norma general, parece que el beneficio se obtiene gracias a su acción sobre los D2. No son tan efectivos como la L-DOPA. La apomorfina se emplea, por su rápido inicio del efecto, en casos súbitos de inmovilidad, aunque tiene una corta duración de efectos; de unos 30 minutos (Lewis *et al.*, 2008). Los agonistas pueden prescribirse como terapia inicial o como complemento de la L-DOPA en personas que desarrollan fluctuaciones en su sintomatología. Los parches de rotigotina son útiles en pacientes con problemas de deglución (Chen *et al.*, 2009).

1.5.3. Inhibidores de la MAO-B

Las monoaminoxidasas (MAO) son enzimas que intervienen en el catabolismo de las aminas biógenas, en especial de las catecolaminas, inhibiendo su acción enzimática. Las plaquetas y el cerebro humano son las localizaciones principales de la MAO-B, siendo ésta la responsable de la degradación de un 80% de la dopamina cerebral, de ahí el interés de los inhibidores selectivos de la MAO-B en el tratamiento de la EP.

Dentro de estos agentes terapéuticos se encuentran los derivados de las propargilaminas; tales como selegilina y rasagilina. Estos compuestos poseen una cadena propargilo que les confiere efectos neuroprotectores en una variedad de modelos experimentales tanto *in vitro* como *in vivo* (Ebadi *et al.*, 2002; Nayak y Henchcliffe, 2008).

Selegilina es un inhibidor selectivo e irreversible de la MAO-B (Chrisp *et al.*, 1991). que presenta además capacidad inhibitoria de los receptores dopaminérgicos presinápticos y de bloqueo de la reabsorción de dopamina. La consecuencia de estas acciones es el aumento de la dopamina estriatal en el cerebro de los pacientes de EP (Riederer y Youdim, 1986). Además, tiene efectos psicoestimulantes y antidepresivos. La selegilina retrasa el comienzo de la incapacidad

asociada a la fase precoz no tratada de la EP, lo que permite posponer la introducción de levodopa, a pesar de que tiene una eficacia de leve a moderada en el control de los síntomas de la enfermedad.

Rasagilina, al igual que selegilina, es un inhibidor selectivo e irreversible de la MAO-B, pero a diferencia de lo que sucede con la selegilina, no da lugar en su proceso de biotransformación a derivados anfetamínicos (Thébaud *et al.*, 2004). Su metabolito principal es el aminoindano, molécula con posible acción antiparkinsoniana. Dentro del grupo de las propargilaminas es el compuesto más potente.

Estos agentes actúan sobre diversas vías de señalización intracelular relacionadas con la cascada apoptótica, lo que puede ser la base de su posible efecto neuroprotector sobre procesos patológicos de diversa patogenia (Rieder y Youdim, 1986; Chrisp *et al.*, 1991). Están indicados para el tratamiento de la EP en monoterapia en la EP temprana, y como terapia adyuvante de la levodopa en la EP más avanzada. Pueden utilizarse junto con otros agentes antiparkinsonianos.

1.5.4. Inhibidores de la COMT

Los inhibidores de la COMT (catecol orto metiltransferasa) se emplean en pacientes con intensa denervación dopaminérgica, lo que se manifiesta en la EP avanzada. En estos casos, el organismo es incapaz de almacenar levodopa, por lo que solo existe respuesta terapéutica durante el período de tiempo en el que la dopamina se encuentra en el espacio extracelular. En el SNC, la levodopa se convierte en dopamina, la cual es recaptada o bien metabolizada por la COMT y la MAO. El objetivo de estos fármacos es inhibir al máximo el metabolismo de la dopamina mediado por la COMT.

Dentro de los inhibidores de la COMT se encuentran entacapona y tolcapona. La asociación levodopa/entacapona es eficaz en la EP avanzada. Puede disminuir el tiempo off comparado con la levodopa, por lo que puede usarse en pacientes no ancianos con EP avanzada que presenten o no fluctuaciones motoras. Sin embargo, aunque mejoran los síntomas motores en período on, aunque no de forma muy potente (Gershanik *et al.*, 2003).

La tolcapona es más potente y presenta una mayor duración de efectos que la entacapona, resultando eficaz en la EP con fluctuaciones motoras, ya que permite disminuir la dosis diaria de levodopa (Gershanik *et al.*, 2003).

1.5.5. Amantadina

La amantadina es un agente antivirásico que promueve la liberación de DA, bloquea su recaptación, inhibe el receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) y tiene una ligera actividad anticolinérgica. En las etapas tempranas de la EP se puede usar contra el temblor, pero su importancia reside en que está aprobada para tratar la disquinesia provocada por la levodopa (Hubsher *et al.*, 2012).

1.5.6. Agentes neuroprotectores

Se incluyen aquí compuestos con acción neuroprotectora, la mayoría de ellos aún en fase de desarrollo o en ensayos preclínicos. En este grupo podemos destacar aquellos fármacos que actúan en etapas tempranas de los procesos de muerte neuronal apoptótica, como es el caso de los que presentan capacidad antioxidante, como la coenzima Q10. Otro ejemplo es el MitoQ, una ubiquinona que atraviesa las membranas celulares y se localiza selectivamente en la mitocondria, restaurando la capacidad anti-ROS de ésta y aliviando los daños oxidativos. También se han realizado investigaciones con agentes antagonistas del receptor de glutamato, que inhibirían procesos pro-apoptóticos, como son aquellos mediados por la sobreexcitación de dicho receptor o por procesos excitotóxicos. (Stocchi, 2006).

En las tablas 4 y 5 se resumen los agentes/compuestos y estrategias empleadas en la actualidad en el tratamiento de los distintos síntomas de la EP.

Síntomas no motores	Posibles tratamientos
Deficiencia cognitiva, demencia.	Rivastigmina, Donepezilo, Galantamina, Memantina.
Psicosis	Quetiapina, Clazapina.
Depresión	Inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS). Antidepresivos tricíclicos.
Apatía, anhedonia, fatiga	Armodafinilo, Modafinilo, estimulación del SNC.
Hipotensión ortostática	Fludocortisona, Midodrina, Efedrina, Droxidopa.
Estreñimiento	Polietilenglicol, Macrogol, Prucaloprida, Neostigmina.
Disfunción urinaria	Oxibutina, Tolterodina, Cloruro Traspium, estimulación BoNT.
Disfunción sexual	Sildenafil.
Hiperhidrosis	Anticolinérgicos, inyección BoNT intracutánea.
Seborrea	Esteroides tópicos, inyección BoNT intracutánea.
Pérdida de peso	Gestión nutricional.
Somnolencia diurna	Armodafinilo, Modafinilo, estimulación SNC.
Movimiento rápido de los ojos, sueños vivos.	Clonazepam, Melatonina, Quetiapina.
Dolor, parestesia	Gabapentina, Pregabalina, Duloxetina.

Tabla 4. Estrategias en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

Por último, mencionar, que a los tratamientos descritos pueden asociarse otros fármacos, con el fin de aliviar otros síntomas no motores y que se encuentran en los pacientes de la EP en proporción variable. El control de estos síntomas es muy importante en el manejo de estos enfermos y contribuyen a la mejora de su calidad de vida.

Fármaco	Modo de acción	Comentarios
Levodopa (más inhibidor de la DOPA-descarboxilasa).	Se transforma en dopamina a nivel del SNC por la acción de la DOPA-descarboxilasa. Se trata por tanto de un aporte exógeno de dopamina para compensar la deficiencia de este neurotransmisor.	Es la medicación standard en la EP. La asociación con un inhibidor de la DOPA-descarboxilasa periférica (carbidopa, benserazida) impide la transformación prematura en dopamina, lo cual permite dar dosis menores y minimizar los efectos secundarios gastrointestinales y cardiovasculares provocados por la dopamina liberada antes de llegar al cerebro. El principal inconveniente de la levodopa es que pierde el efecto después de varios años (3-5) de tratamiento. Aparecen efectos secundarios como disquinesias o el llamado fenómeno on/off.
Bromocriptina Lisurida Pergolida Pramipexol Ropinirol	Estructura química que se asemeja a la de la dopamina y actúa, estimulando los receptores postsinápticos.	Eficacia inferior a la de levodopa (sólo un tercio de los pacientes responde satisfactoriamente) y suelen requerir más tiempo para ajustar la posología. Se suelen usar en tratamientos combinados con levodopa.
Selegilina Rasagilina	Inhiben el metabolismo de la dopamina en el cerebro, producido por oxidación catalizada por la MAO-B.	Selegilina y rasagilina son inhibidores selectivos de la MAO-B. Su utilidad en la EP deriva de la capacidad de potenciar la acción de la levodopa al inhibir su catabolismo por la vía de la dopamina. Permiten disminuir la dosis de levodopa en hasta un 30%.
Entacapona Tolcapona	Inhibidores del enzima catecol O-metil-transferasa (COMT).	Cuando la levodopa se administra conjuntamente con un inhibidor periférico de la <i>DOPA-descarboxilasa</i> , la principal vía metabólica periférica es mediante la COMT, que transforma la levodopa en 3-O-metildopa. Ésta es capaz de competir con la levodopa en el sistema de transporte activo de la BHE (astrocitos), reduciendo la penetración de levodopa en el SNC y, con ello, su capacidad de transformarse en dopamina. Se estima que la adición de entacapona al tratamiento con levodopa/carbidopa incrementa un 25-50% la biodisponibilidad de la levodopa, prolongando los efectos antiparkinsonianos de ésta.
Amantadina	Posiblemente favorece la liberación de dopamina y/o inhibe su recaptación en ventana sináptica.	Inicialmente usado como antiviral, la amantadina es un antiparkinsoniano menos potente que los anteriores y con el inconveniente de perder rápidamente eficacia si se usa sola (en menos de seis meses). A su favor tiene una incidencia escasa de efectos secundarios y no ser necesario un laborioso ajuste individual de la dosis. Se suele emplear en los primeros estadios de la enfermedad o en combinación con levodopa o amantadina en fases avanzadas
	Anticolinérgicos	
Biperideno Triexifenidilo Prociclidina Metixeno	Antagonizan la actividad colinérgica cerebral, exacerbada por la deficiencia de acción dopaminérgica. Posiblemente inhiban también la recaptación de dopamina por las neuronas presinápticas.	Usados desde el siglo pasado, los anticolinérgicos tienen un efecto parkinsoniano relativamente débil, pero aditivo con la levodopa o la bromocriptina. Mejoran el temblor, pero no tienen efecto sobre la rigidez o la bradiquinesia. Se suelen utilizar en fases iniciales y sobre todo en el tratamiento de cuadros extrapiramidales inducidos por antipsicóticos, donde nAgenteso debe usarse levodopa. Todos los anticolinérgicos tienen aproximadamente la misma eficacia, pero ciertos pacientes toleran algunos mejor que otros. Cambiar de medicamentos en caso de efecto colaterales graves.

Tabla 5. Agentes terapéuticos utilizados en la enfermedad de Parkinson.

1.6. Tratamiento quirúrgico de la Enfermedad de Parkinson

En casos extremos, y con ausencia o escasa respuesta a la terapia farmacológica, se valora la posibilidad del tratamiento quirúrgico.

Entre estas opciones quirúrgicas están las siguientes:

1.6.1. Estimulación cerebral profunda (ECP)

Se realiza mediante la implantación de unos pequeños electrodos que aplican una corriente sobre el globo pálido interno, el tálamo y el núcleo subtalámico para tratar de aliviar los temblores, rigidez y los problemas para caminar, entre otros (Ughratdar *et al.*, 2015).

1.6.2. Palidotomía

Intervención en la que se produce una lesión en el globo pálido en su porción interna y el ansa lenticularis, con el fin de aliviar la excesiva inhibición talámica y mejorar síntomas como la rigidez y la bradicinesia (Llumiguano *et al.*, 2006).

1.6.3. Implantación de células fetales en la sustancia nigra

Implantes de células madre y células reprogramadas procedentes de fibroblastos (Lindvall y Björklund, 2004). Desafortunadamente, en algunos casos ha aparecido rechazo autoinmune, se han desarrollado tumores o un efecto secundario de causa desconocida llamado disquinesia inducida por injerto (Wijeyekoon y Barker, 2009). Cuando se utilizan células reprogramadas del propio paciente vuelven a aparecer los agregados proteicos y si las células son sanas, se vuelven a reproducir esos problemas con la α -sinucleína por propagación priónica (Brundin *et al.*, 2008), lo que ha limitado el uso de esta técnica.

1.7. Tratamiento de las disquinesias

Las disquinesias abarcan diferentes fenómenos hipercinéticos, particularmente

movimientos rápidos, breves e irregulares, distonía (menor tono muscular), estereotipias (movimientos balanceantes del cuerpo), y acatisia (incapacidad para mantenerse quieto) (Loonen y Ivanova, 2013). La disquinesia inducida por levodopa aparece en alrededor del 30% de los pacientes con EP, que han sido tratados con el fármaco durante un periodo prolongado de tiempo. Los mecanismos que la provocan no están bien definidos por el momento, aunque se piensa que puede estar inducida por una concentración de DA estriatal suficiente como para activar sus receptores postsinápticos, y que la distonía puede aparecer cuando la concentración de DA es baja (Bezard *et al.*, 2001; Huot *et al.*, 2013).

La estrategia más utilizada para tratarlas suele ser el fraccionamiento de las dosis de L-DOPA (Vijayakumar y Jankovic, 2016).

1.8. Modelos animales utilizados en investigación de la Enfermedad de Parkinson

A medida que se avanza en los descubrimientos sobre la etiopatogenia de la EP, se desarrollan nuevos modelos animales y celulares que buscan mimetizar los mecanismos causantes o acompañantes de la enfermedad (Meredith *et al.*, 2008).

En cuanto a los modelos animales, un modelo experimental ideal de EP debería reproducir las características patológicas y clínicas de la enfermedad, comprendiendo los sistemas dopaminérgicos y no dopaminérgicos, el sistema nervioso central y el periférico. Adicionalmente, debería ser un modelo dependiente de la edad para representar con fidelidad el transcurso y evolución de la misma. Desafortunadamente, ningún modelo de EP reúne todas estas características (Dawson *et al.*, 2010). A pesar de estas limitaciones, los modelos animales nos sirven como herramienta para comprender los mecanismos de la enfermedad e investigar posibles dianas terapéuticas.

Los modelos animales pueden dividirse en modelos basados en la administración de neurotoxinas, pesticidas y en modificaciones genéticas. Los más utilizados son los basados en la administración de neurotoxinas o pesticidas a animales de experimentación, como rotenona, paraquat, 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) y 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina (MPTP) (Tabla 6).

Dentro de los animales más utilizados para desarrollar los modelos animales se encuentran ratas, ratones, pez cebra, la mosca *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* y los primates no humanos.

Así, modelos de EP desarrollados en ratones conducen a síntomas tales como: disminución de la coordinación, el equilibrio, la función gastrointestinal, agudeza olfatoria, dificultad para formar nidos y alteraciones en la capacidad de caminar (Miyazaki *et al.*, 2020). Los modelos desarrollados en ratas suelen conducir a rigidez en las extremidades, déficits cognitivos, reducción de la actividad motora, movimientos rotacionales, hipocinesia, bradicinesia y asimetría postural. Los primates no humanos presentan cambios conductuales análogos a los de pacientes de EP, incluyendo bradicinesia, rigidez de extremidades, anormalidad postural, dificultad para mantener el equilibrio, temblor en reposo, síndrome parkinsoniano bilateral estable, inestabilidad del gesto, y deterioro de las habilidades motoras gruesas y finas (Hallett *et al.*, 2015; Hsueh *et al.*, 2018).

1.8.1. Modelos basados en la utilización de pesticidas y neurotoxinas

Se pueden citar los siguientes:

➤ **Rotenona**

La rotenona es un plaguicida o insecticida liposoluble que genera estrés oxidativo, el cual daña selectivamente las neuronas dopaminérgicas (nDA), ya que inhibe el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, generando deficiencias motoras características de la enfermedad (Blesa *et al.*, 2012).

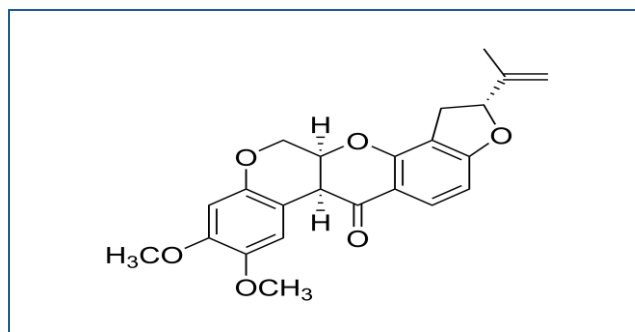


Figura 3. Estructura química de la rotenona.

Como modelo de la EP en ratones tiene la capacidad de reproducir características similares a las que ocurren en humanos, y formar inclusiones intracelulares parecidas a los cuerpos de Lewy (Blesa y Przedborski, 2014). En ratas la exposición a rotenona genera una degeneración de las neuronas dopaminérgicas y la formación de inclusiones celulares similares a los cuerpos de Lewy. Estos efectos se pueden observar como deficiencias motoras, tal y como ocurre en la EP, incluyendo: hipocinesia, rigidez postural y temblores (Blesa *et al.*, 2012).

➤ **Paraquat**

Herbicida empleado en modelos experimentales de la EP. Paraquat es el 1,1-dimetil-4,4-dipiridinio, que conduce a la formación de radicales libres que reaccionan con las membranas lipídicas de las células. Se ha demostrado cierta selectividad de este compuesto hacia las nDAs de la SNpc positivas a tirosina hidroxilasa (TH) (Spivey, 2011; Blesa *et al.*, 2012).

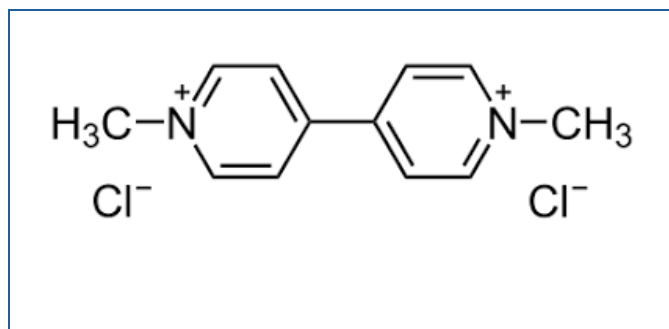


Figura 4. Estructura química del paraquat.

La administración sistémica a ratas del paraquat produce reducción en las actividades motoras, se reducen las fibras y neuronas TH positivas en la SNpc y presenta capacidad de producir cuerpos de Lewy, con la desventaja de que se han obtenido resultados variables en cuanto a la muerte neuronal (Blesa y Przedborski, 2014).

➤ **6-Hidroxidopamina (6-OHDA)**

Hasta el momento la toxina más utilizada es la 6-OHDA, ya que presenta actividad inhibitoria de la cadena respiratoria mitocondrial con formación de radicales libres al ser metabolizada. Tres características importantes de esta toxina son: 1) induce una rápida neurodegeneración; 2) tiene una gran afinidad por los transportadores de noradrenalina y

dopamina, provocando la muerte de neuronas adrenérgicas y dopaminérgicas; y 3) no atraviesa la barrera hematoencefálica (Blandini *et al.*, 2008; Blesa y Przedborski, 2014). Al realizar una lesión unilateral en el prosencéfalo medial se produce una pérdida de las neuronas reactivas a TH en la SNpc y una pérdida de más del 90% de nDA, generando una disminución y desequilibrio de las actividades motoras (Dunnett y Lelos, 2010). Para desarrollar la neurodegeneración, la 6-OHDA tiene que ser inyectada de forma estereotáxica, lo cual es un inconveniente.

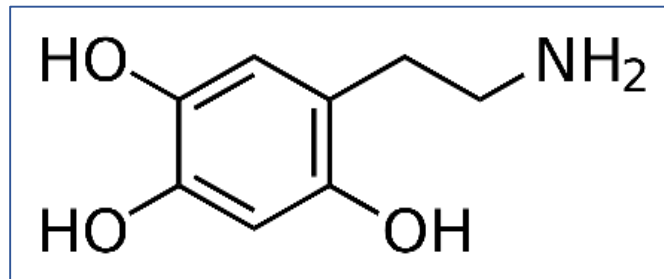


Figura 5. Estructura química de la 6-hidroxidopamina (6-OHDA).

En ratas, la lesión unilateral producida con la administración de 6-OHDA ocasiona un daño severo en las neuronas dopaminérgicas, generando un comportamiento motor asimétrico, por lo que es un modelo ideal para estudios de terapias de reemplazo celular y factores neuroprotectores. Por otra parte, para producir lesiones parciales es necesario disminuir la dosis administrada, con el propósito de estudiar los mecanismos patofisiológicos y de neurodegeneración, debido a que las lesiones causadas en el estriado causan cambios neurodegenerativos de manera progresiva en las nDA de la SNpc. (Rodríguez Díaz *et al.*, 2001).

➤ **MPTP**

MPTP es la 1-metil-4-fenil,6-tetrahidropiridina, una protoxina que al ser metabolizada mediante la MAO-B se transforma en el metabolito 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP⁺), que es el activo como neurotoxina. Su mecanismo de acción se basa en la liberación excesiva de dopamina, que al ser metabolizada genera especies reactivas de oxígeno (ROS) y radicales libres en exceso. Adicionalmente, el MPP⁺ es un inhibidor del complejo I de la cadena mitocondrial, disminuyendo la producción de adenosín trifosfato. Sin embargo, esta toxina no es selectiva a neuronas dopaminérgicas de la SNpc, ni suele inducir la formación de cuerpos de Lewy en modelos animales (Blesa *et al.*, 2012).

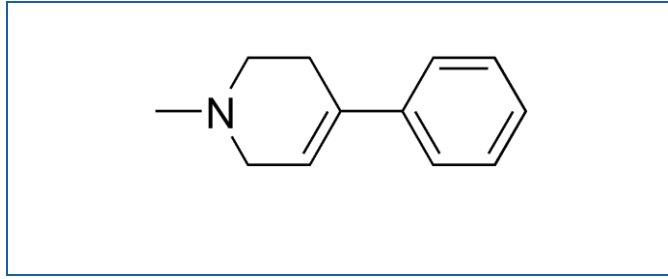


Figura 6. Estructura química del MPTP.

Los modelos con MPTP en primates no humanos brindan información sobre posibles terapias y mecanismos patogénicos de la EP ya que, si se produce una lesión de manera sistémica, el comportamiento será muy similar a la enfermedad presente en humanos. Sin embargo, es un procedimiento largo y con una tasa de mortalidad considerablemente alta. En cambio, en ratones se aprecian características neuropatológicas y bioquímicas de daño en el sistema dopaminérgico, además de una reducción en la actividad motora. Si se realiza una lesión de manera sistémica en ratones, por tanto, se ocasiona discapacidad en el sistema dopaminérgico, lo que resulta muy adecuado para estudiar procesos patofisiológicos y neurodegenerativos. En ambas especies MPTP causa daños en la ruta nigroestriatal con una gran pérdida de nDA en el estriado y en la SNpc. La mayor desventaja es que no se ha observado la formación de cuerpos de Lewy con este modelo (Blesa y Przedborski, 2014).

En la tabla 6 se muestra un esquema de las características de los modelos experimentales en animales desarrollados con pesticidas y neurotoxinas. Cabe mencionar que estos modelos de neurotoxinas se basan en la administración de las neurotoxinas principalmente en tres áreas del cerebro: el estriado, el haz medio del prosencéfalo y en la sustancia nigra. Cuando se afectan estas áreas se activan mecanismos compensatorios con el objetivo de mantener la actividad neurológica, y mediante alteraciones en la síntesis y liberación de dopamina, aumento de la actividad de la TH, cambios en la actividad del estriado, y del cerebelo, corteza y zonas corticales (Grandi *et al.*, 2018).

Modelo	Tipo	Animal	Efecto	Referencias
Neurotoxinas	Rotenona	Rata	Degeneración de neuronas nigroestriadas. Disminución del número de nDA. Formación de cuerpos de Lewy. Deficiencias motoras: hipocinesia, rigidez postural y temblores en miembros.	(Blesa <i>et al.</i> , 2012; Blesa y Przedborski, 2014).
		Ratones	Reducción de la actividad motora, pérdida de fibras y neuronas en SNpc, disminución de células TH positivas. Formación de cuerpos de Lewy.	(Blesa <i>et al.</i> , 2012; Blesa y Przedborski, 2014; Mohamed <i>et al.</i> , 2019).
	6-OHDA	Ratas	Locomoción reducida. No se han logrado observar cuerpos de Lewy. La lesión unilateral produce un daño completo en las neuronas dopaminérgicas. Comportamiento motor asimétrico. Lesiones en el estriado causan cambios neurodegenerativos de manera progresiva en las nDA de la SNpc.	(Bankiewicz <i>et al.</i> , 1999; Blesa <i>et al.</i> , 2012).
		Primates	No se observan cuerpos de Lewy. La lesión unilateral en el prosencéfalo medio produce pérdida de las neuronas reactivas a TH en la SNpc. Pérdida de más del 90% de nDA. Reducción de las actividades motoras.	(Annett <i>et al.</i> , 1992; Dunnett y Lelos, 2010).
	MPTP	Primates	No induce la formación de cuerpos de Lewy. La lesión de manera sistémica genera un comportamiento muy similar al de la EP en humanos. Locomoción reducida. Procedimiento largo y con una tasa de mortalidad considerablemente alta. Daños en ruta nigroestriatal con una gran pérdida de nDA en el estriado y la SNpc.	(Blesa y Przedborski, 2014).
		Ratones	Discapacidad en el sistema dopaminérgico. Reducción de la actividad motora y bradiquinesia. Daños en ruta nigroestriatal con gran pérdida de nDA en el estriado y la SNpc. No se observan cuerpos de Lewy	(Bankiewicz <i>et al.</i> , 1999; Blesa <i>et al.</i> , 2012; Blesa y Przedborski, 2014; Dauer y Przedborski, 2003).
Genéticos	α -syn	Ratones	Disminución de los niveles de TH y dopamina. Exhibición de un comportamiento alterado. Falta de resultados consistentes en relación a la neurodegeneración producida.	(Blesa y Przedborski, 2014).
		Ratas	Se han dirigido factores virales con α -sinucleína exógena, con los cuales se ha observado alteración en la proteína y neurodegeneración dopaminérgica.	(Decressac <i>et al.</i> , 2012)

LRRK2	Ratones	Poco o nulo daño en la función de las nDA en la SNpc. Neurodegeneración o cambios en la estructura neuronal. Knock-out produce acumulación de α -sinucleína y ubiquitina, se inhibe la diferenciación de progenitores neuronales a nDA y aumenta la muerte celular. En el caso de una sobreexpresión del gen, se ha observado una ligera neurodegeneración de las nDA en la SNpc, pero sin alteración de los niveles de dopamina ni en la actividad locomotriz.	(Blesa y Przedborski, 2014; Chen <i>et al.</i> , 2012; Milosevic <i>et al.</i> , 2009; Stoddard-Bennett y Reijo Pera, 2019).	
	PINK1	Ratones	Reducción gradual de los niveles de dopamina y baja actividad locomotriz. No se ha observado la formación de cuerpos de Lewy o degeneración nigroestriatal.	(Gispert <i>et al.</i> , 2009).
	<i>Drosophila melanogaster</i>	Mutaciones en el gen PINK1 han mostrado defectos en la habilidad para volar, anomalías en el complejo I mitocondrial derivando a niveles de ATP reducidos.	(Obeso <i>et al.</i> , 2017; Vanhauwaert y Verstreken, 2015).	
	PARKIN	Ratones	No se observan alteraciones en el comportamiento de los animales, a pesar de la ligera disminución de liberación de dopamina que ocurre.	(Kitada <i>et al.</i> , 2009; Stoddard-Bennett y Reijo Pera, 2019).
	DJ-1	Ratones	Disminución en la capacidad motora. Reducción de dopamina liberada en el estriado, pero no en la SNpc	(Kitada <i>et al.</i> , 2009; Stoddard-Bennett y Reijo Pera, 2019).

Tabla 6. Comparación de diferentes modelos experimentales de la EP. *Syn* (α -sinucleína); EP (enfermedad de Parkinson), MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina), nDA (neuronas dopaminérgicas), 6-OHDA (6-hidroxidopamina), SNpc (sustancia nigra pars compacta), TH (tirosina hidroxilasa).

1.8.2. Modelos genéticos

Los modelos genéticos tienen la función de simular los mecanismos relacionados con las formas genéticas de la EP. Es necesario mencionar que solo alrededor del 5-10% de los pacientes diagnosticados de EP son de origen genético. En este caso, los fenotipos patológicos y de comportamiento en los modelos murinos suelen ser diferentes a los presentados por los humanos, estudiado principalmente la función de los genes α -syn, LRRK2, PINK1, PARKIN y DJ-1 (Blesa y Przedborski, 2014) (Tabla 6). Se pueden clasificar en 3 enfoques diferentes: knock-out, sobreexpresión y transgénicos. Sin embargo, los modelos en *Drosophila melanogaster*,

Caenorhabditis elegans y murinos no muestran las deficiencias motoras de manera representativa para el estudio clínico humano aunque su relevancia se basa en el estudio de la forma genética de la EP, enfocándose en genes específicos relacionados con la enfermedad (Grandi *et al.*, 2018).

El gen α -syn codifica la proteína α -sinucleína, componente principal de los cuerpos de Lewy presentes en la EP. Se ha demostrado que ratones transgénicos presentan una disminución en los niveles de TH y dopamina, lo que afecta a su comportamiento (Blesa y Przedborski, 2014). En modelos experimentales en ratas se han evaluado factores virales con α -sinucleína, obteniéndose neurodegeneración dopaminérgica, por lo que son un modelo ideal para probar nuevas estrategias neuroprotectoras (Decressac *et al.*, 2012).

El gen LRRK2 es necesario para la supervivencia neuronal, siendo su edición génica la más común en los modelos de EP de tipo genético. En modelos en ratones se ha observado escaso o nulo daño en la función de las nDA en la SNpc (Blesa y Przedborski, 2014). En cambio, en ratones knock-out se ha logrado producir acúmulos de α -sinucleína e inhibir la diferenciación de progenitores neuronales a nDA, así como aumentar la muerte celular (Stoddard-Bennett y Reijo Pera, 2019). En el caso de los modelos por sobreexpresión del gen se ha observado una ligera neurodegeneración de las nDA en la SNpc, pero sin alteración de los niveles de dopamina ni de la actividad locomotriz (Chen *et al.*, 2012).

Modelos desarrollados en ratones sin el gen PINK1, que es esencial para la supervivencia neuronal bajo estrés oxidativo (Stoddard-Bennett y Reijo Pera, 2019), han puesto de manifiesto que se produce una reducción gradual en los niveles de dopamina acompañada de una baja actividad locomotriz, sin la formación de cuerpos de Lewy ni degeneración nigroestriatal (Gispert *et al.*, 2009). Por otra parte, los modelos basados en *Drosophila melanogaster* con mutaciones en el gen PINK1, han dado como resultado defectos en la habilidad para volar y anomalías en el complejo I mitocondrial (Vanhouwaert y Verstreken, 2015; Obeso *et al.*, 2017).

En el caso de los estudios realizados con ratones sin el gen de PARKIN, no se han podido demostrar alteraciones en el comportamiento de los animales, a pesar de que se produce una ligera disminución de la liberación de dopamina. Finalmente, modelos en ratones con mutaciones en el gen DJ-1, necesario para la resistencia frente al estrés oxidativo, demuestran una disminución en la capacidad motora, reducción de la dopamina liberada en el estriado, pero no en la SNpc (Kitada *et al.*, 2009; Stoddard-Bennett y Reijo Pera, 2019).

1.8.3. Modelo de lesión inducida con lipopolisacárido (LPS)

El modelo de lesión con lipopolisacárido (LPS) se ha estudiado menos y se basa en provocar una respuesta neuroinflamatoria similar a la que se produce en la EP como inductora de la muerte celular (Hirsch y Hunot, 2009). Aunque la 6-OHDA y el MPTP también pueden provocar una respuesta inflamatoria, ésta es de mucha menor intensidad y, sobre todo, no es la causante principal de la muerte neuronal, sino más bien una consecuencia que perpetúa la neurotoxicidad. En el modelo de LPS, la causa de la muerte neuronal es la propia neuroinflamación.

El LPS es una endotoxina de las bacterias gram negativas que activa la microglía a través del receptor toll-like 4, lo que desencadena la producción de citoquinas y quimioquinas inflamatorias. Puede ser inyectado estereotáxicamente en la sustancia nigra, tracto prosencefálico medio o directamente en el estriado. Cuando se inyecta en la sustancia nigra, produce activación microglial y pérdida sostenida de neuronas dopaminérgicas en tan solo 24 horas (Iravani *et al.*, 2005), junto con una reducción mantenida y prolongada de la concentración de DA de aproximadamente un 60% (Herrera *et al.*, 2000). Cuando se inyecta en el estriado, la pérdida de neuronas dopaminérgicas es más paulatina (Hunter *et al.*, 2009).

1.8.4. Modelos preclínicos de terapia celular

Actualmente los tratamientos más utilizados en la EP son farmacológicos y se basan fundamentalmente en la administración de levodopa junto con inhibidores de la dopadescarboxilasa, pero tienen la desventaja de perder su efectividad con el progreso de la neurodegeneración, además de ocasionar efectos secundarios importantes (Chen *et al.*, 2019).

En situaciones extremas se puede recurrir a la realización de intervenciones quirúrgicas y a la estimulación profunda del cerebro, aunque se trata de procedimientos complejos, que pueden ocasionar hemorragia, infección y efectos secundarios neuropsiquiátricos (Fukaya y Yamamoto, 2015).

Otra posibilidad es realizar la generación de neuronas dopaminérgicas (nDAs) a partir de células troncales (CT) para su trasplante, y que, aunque se encuentran en fase de investigación, representan un gran avance para el futuro tratamiento mediante terapias celulares de enfermedades

como la EP. Su objetivo es que las nDAs implantadas puedan sobrevivir y formar conexiones en el cerebro de los pacientes, con la consiguiente mejoría clínica (Lindvall y Björklund, 2004). Sin embargo, llevar a la práctica clínica esta estrategia aún requiere de investigación profunda y desarrollo, así como la estandarización de factores críticos para la eficacia y seguridad del procedimiento, como la selección de pacientes, la colocación del injerto, su composición celular y regulación inmunológica (Park *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2019).

Algunas de las fuentes de tejido que se han utilizado para la obtención de nDAs incluyen tejido mesencefálico ventral fetal humano (hfVM), médula adrenal, bulbo olfatorio, cuerpo carotídeo, células troncales embrionarias, células troncales neurales (NSC), células troncales mesenquimales, células troncales pluripotentes inducidas (iPSC) (Pardal y López-Barneo, 2012). En estudios realizados con hfVM se han obtenido mejoras considerables en la rigidez, inestabilidad postural, alteraciones en la marcha, bradicinesia y expresión facial, pero no en el temblor (Chen *et al.*, 2019).

Además del desarrollo de otros métodos, el trasplante de hfVMs, que pueden ser diferenciadas hacia nDAs, ha dado como resultado tasas elevadas de recuperación histológica y funcional, sin efectos secundarios graves (Arenas, 2005). En ensayos clínicos realizados en humanos, en los que los pacientes recibieron trasplantes de manera bilateral en el putamen, se demostró que los injertos pueden sobrevivir a pesar del avance de la EP y el continuo tratamiento farmacológico, reinervando el estriado, restableciendo la liberación controlada de dopamina e integrándose en el circuito nigrostriatal (Lindvall y Björklund, 2004). Sin embargo, este procedimiento presenta complicaciones quirúrgicas, además de la dificultad técnica de disección del tejido fetal, resultando en una combinación de poblaciones celulares con alta mortalidad, sin mencionar la limitada disponibilidad de tejido fetal, complicaciones éticas y discinesias postoperatorias (Lindvall, 2016).

Por lo que se refiere a las iPSC, presentan la ventaja de generar nDA específicas de cada paciente sin conflictos éticos e inmunológicos, además de su alta diversidad de origen, aunque aún presentan problemas de mutagenicidad, causan daños en la integridad del genoma y favorecen la formación de teratomas (Xiao *et al.*, 2016).

2. TOLCAPONA

2.1. Introducción

La Tolcapona es un inhibidor potente, selectivo y reversible de la COMT, indicada en combinación con levodopa/benserazida o levodopa/carbidopa en el tratamiento de pacientes con enfermedad de Parkinson idiopática sensibles a levodopa y con fluctuaciones motoras, que no responden o son intolerantes a otros inhibidores de la COMT (<http://www.aemps.gob.es>, 2021).

Hay que tener en cuenta que la levodopa sigue siendo la terapia de referencia para los síntomas motores característicos de la EP (Rascol *et al.*, 2002). Cuando se administra con un inhibidor de la dopamina descarboxilasa (DDCI), la levodopa sigue siendo el tratamiento más eficaz para los síntomas motores cardinales de la EP (Rajput *et al.*, 1997). Sin embargo, el uso a largo plazo de levodopa está limitado por fluctuaciones motoras y discinesias, que pueden ser incapacitantes para los pacientes y difíciles de controlar con los tratamientos actuales, y también por pérdida de eficacia.

Las complicaciones motoras de la levodopa son relativamente comunes y ocurren en un porcentaje significativo de los pacientes al año de iniciarse el tratamiento (Van Laar, 2003). Cada vez hay más pruebas de que se pueden administrar agonistas de la dopamina en lugar de levodopa para controlar los síntomas motores de la enfermedad de Parkinson y reducir las complicaciones (Olanow *et al.*, 2001).

La levodopa atraviesa la barrera hematoencefálica después de la administración oral, donde es descarboxilada por la enzima dopa-decarboxilasa tanto a nivel periférico como central, para dar lugar a dopamina. La levodopa se administra típicamente con un DDCI para reducir el metabolismo periférico, reducir los efectos secundarios dopaminérgicos periféricos (hipotensión postural, náuseas) y aumentar la cantidad de levodopa que llega al cerebro. Cuando se administra de esta manera, del 5% al 10% de levodopa llega al cerebro. Cuando la descarboxilación está bloqueada, la levodopa se metaboliza predominantemente a 3-*O*-metildopa (3-OMD) por la catecol-*O*-metiltransferasa (COMT), una enzima selectiva y ubicua involucrada en el catabolismo de la levodopa (Leegwater-Kim y Waters, 2014). En el cerebro, la COMT metaboliza la levodopa en 3-OMD y la dopamina en ácido homovanílico (Rajput *et al.*, 1997). En la periferia, COMT participa en la conversión de levodopa en 3-OMD. Sobre la base de este mecanismo, se postuló

que la inhibición de la COMT daría como resultado una menor degradación de la levodopa y que, cuando se administraba con un DDCI, aumentaría la biodisponibilidad de la levodopa, su llegada a SNC y la continuidad de la estimulación de la dopamina. Como resultado, la dosis de levodopa requerida para la eficacia terapéutica podría reducirse, con lo que esta menor exposición a la levodopa debería retrasar o prevenir las complicaciones motoras.

Como se ha indicado, tolcapona es un inhibidor potente, selectivo y reversible de la COMT a nivel periférico (Napolitano *et al.*, 1999). Se diferencia de los otros dos inhibidores de COMT disponibles (entacapona y opicapona) por sus características de lipofilia, que le permiten atravesar con facilidad la barrera hematoencefálica y acceder al sistema nervioso central (Ceravolo *et al.*, 2002).

Pertenece a la segunda generación de inhibidores selectivos y reversibles de la COMT, y ha sido introducida en terapéutica en el año 1998 (Kurth y Adler, 1998). Es más potente y presenta una mayor duración de efectos que su predecesor entacapona. Debido a su acción la COMT mejora la eficacia de la levodopa y reduce las fluctuaciones motoras asociadas al tratamiento crónico. Cuando se administra tolcapona junto con levodopa y un inhibidor de la dopa decarboxilasa (carbidopa o benserazida), los niveles plasmáticos de levodopa son más sostenidos que los alcanzados cuando se administran solos (levodopa, inhibidor de dopa decarboxilasa), incrementándose la biodisponibilidad oral de la levodopa, lo que redundaría en una mejora de su eficacia en el tratamiento de la EP (Antonioni *et al.*, 2008).

El tratamiento con tolcapona reduce los períodos de activación y desactivación (on-off) en pacientes con fluctuaciones motoras, mejorando el tiempo de activación en pacientes con enfermedad estable (Truong, 2009).

Después de algunas preocupaciones iniciales sobre su seguridad, que llevaron a su retirada en 1998 por las autoridades sanitarias como consecuencia de la aparición de 3 casos de hepatitis fulminante, en abril de 2004 se anunció el fin de la suspensión de comercialización de este fármaco, por lo que ha vuelto a ser reintroducida en terapéutica desde ese momento.

Desde entonces, diversos estudios han demostrado que la tolcapona es segura si se administra y monitoriza la funcionalidad hepática del paciente a tratamiento con el fármaco (Müller, 2015; Artusi *et al.*, 2021).

La tolcapona produce los efectos secundarios dopaminérgicos esperados, que incluyen dolor de cabeza, náuseas, insomnio, así como diarrea; sin embargo, estos efectos secundarios son generalmente leves y, por regla general, no dan lugar a la interrupción del tratamiento (Truong, 2009).

El objetivo principal de la terapia con inhibidores de la COMT es aumentar la duración del efecto de cada dosis de levodopa y, por lo tanto, reducir el tiempo que los pacientes pasan en la fase "inactiva o en off". La tolcapona se puede usar para reducir el tiempo de inactividad, reducir la dosis de levodopa y tratar de mejorar modestamente el deterioro motor y la discapacidad (Deane *et al.*, 2004).

2.2. Estructura y características físico-químicas

La tolcapona, desde el punto de vista estructural, corresponde a la (3,4-dihidroxi-5-nitrofenil) -(4-metilfenil) metanona, con una fórmula empírica de $C_{14}H_{11}NO_5$ y un peso molecular de 273,24 g/mol.

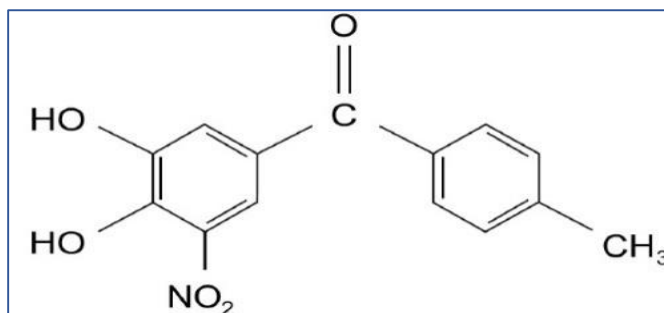


Figura 7. Estructura química de la tolcapona.

La tolcapona se presenta como un compuesto cristalino de color amarillo e inodoro. No es higroscópico. Es soluble en cloroformo, metanol, acetonitrilo y poco soluble en agua. Presenta un punto de fusión entre 146-148°C. Se debe conservar en envases herméticos, resistentes a la luz y almacenar entre 20°C y 25°C.

2.3. Mecanismo de acción y acciones farmacológicas

Como se ha indicado antes, la tolcapona es un inhibidor selectivo y reversible de la COMT de acción periférica y central, enzima responsable de catalizar la degradación de las catecolaminas biógenas (dopamina, adrenalina, noradrenalina) y que se encuentra en la hendidura sináptica de las neuronas dopaminérgicas. La COMT es la segunda vía metabólica más importante para la levodopa, por lo que su inhibición, mediante tolcapona, redundará en una mejor respuesta en la EP (Deane *et al.*, 2004).

El mecanismo de acción de la tolcapona se basa en la alteración de la farmacocinética de la levodopa, así como en la reducción del metabolito 3-OMD de la levodopa, prolongando ligeramente la semivida de la levodopa, de aproximadamente 2 horas a 3,5 horas (Davis *et al.*, 1995). Esto da como resultado una duplicación aproximada de la biodisponibilidad relativa de levodopa. Sin embargo, los valores de C_{max} o t_{max} de levodopa no se ven afectados. Los estudios en voluntarios sanos y pacientes con enfermedad de Parkinson han confirmado que el efecto máximo se produce a dosis de 100 mg a 200 mg de tolcapona. Los niveles plasmáticos de 3-OMD disminuyen de forma marcada y dependiente de la dosis con tolcapona, cuando se administra conjuntamente con levodopa/carbidopa o con levodopa/benserazida (Truong, 2009).

2.4. Interacciones

La tolcapona, como inhibidor de la COMT, aumenta la biodisponibilidad de la levodopa al administrarla conjuntamente. El consecuente aumento en la estimulación dopaminérgica puede conducir reacciones adversas, tales como aumento de la discinesia, náuseas, vómitos, dolor abdominal, hipotensión ortostática, estreñimiento, trastornos del sueño, alucinaciones (Stocchi y De Pandis, 2006).

Los efectos adversos de la tolcapona también se ven aumentados con inhibidores de la recaptación de noradrenalina, así como con el alcohol, ya que acentúan los efectos depresores dopaminérgicos (Ossig y Reichmann, 2013).

La tolcapona puede modificar la farmacocinética de los fármacos metabolizados por la COMT. No se ha observado ningún efecto sobre la farmacocinética de la carbidopa, sustrato de la COMT, sin embargo, sí se ha observado una interacción con la benserazida, dando lugar a un

aumento en los niveles de esta y de su metabolito activo. La magnitud del efecto es dependiente de la dosis de benserazida (Stocchi y De Pandis, 2006).

Dada su afinidad por el citocromo CYP2C9, la tolcapona puede interferir con fármacos cuyo aclaramiento dependa de esta vía metabólica, como tolbutamida y warfarina.

2.5. Aplicaciones Terapéuticas

La tolcapona está indicada en combinación con levodopa/benserazida o levodopa/carbidopa para el tratamiento de pacientes con EP idiopática sensibles a levodopa y con fluctuaciones motoras, que no responden o son intolerantes a otros inhibidores de la COMT (Ossig y Reichmann, 2013).

Debido al riesgo de daño hepático agudo que puede producir la tolcapona, no se debe considerar como un tratamiento de primera línea complementario a levodopa/benserazida o levodopa/carbidopa. Si no se observan beneficios clínicos considerables dentro de las 3 semanas posteriores al inicio del tratamiento, se debe interrumpir la administración de tolcapona (Deane *et al.*, 2004).

2.6. Características Biofarmacéuticas y Farmacocinéticas

Tolcapona presenta farmacocinética lineal, independiente de la administración de levodopa/carbidopa e independiente del sexo, la edad, el peso o la raza (Stocchi *et al.*, 2006). Tras su administración por vía oral, tolcapona se absorbe rápidamente, alcanzándose el t_{max} alrededor de las 2 horas. Presenta una semivida plasmática de eliminación corta, de aproximadamente 2-3 horas. La biodisponibilidad oral de tolcapona es del 65%, que se reduce entre un 10% y un 20% si se toma 1 hora antes ó 2 horas después de la comida (Stocchi y De Pandis, 2006).

La tolcapona presenta elevada unión a proteínas plasmáticas (99,9%), fundamentalmente a albúmina sérica. Se metaboliza casi por completo, siendo su vía metabólica principal la glucuronidación a un conjugado glucurónico inactivo. También sufre metilación por la COMT a 3-O-metil-tolcapona. Además, el metabolismo de tolcapona incluye la hidroxilación del grupo metilo para formar un alcohol primario, que posteriormente se oxida al ácido carboxílico, posiblemente a través del citocromo P450 3A4 y 2A6. La reducción a una amina y la posterior N-

acetilación se producen en menor medida. El metabolito glucurónido se excreta principalmente en la orina, aunque también parte se excreta en bilis. Solamente alrededor del 0,5% del fármaco se elimina sin alterar en orina (Cacabelos, 2017).

En pacientes con enfermedad hepática cirrótica moderada (Child-Pugh Clase B), el aclaramiento y el volumen de distribución de tolcapona se ven reducidos en hasta un 50% (Dingemans *et al.*, 1995; Jorga *et al.*, 1997).

2.7. Efectos Adversos

Las reacciones adversas más frecuentes son discinesia y otros efectos dopaminérgicos relacionados (Stocchi y De Pandis, 2006; Cacabelos, 2017). Además, se han descrito reacciones adversas, tales como:

- **Hepáticos:** Se ha descrito daño hepático grave, que incluye el fallo hepático fulminante, que llevaron a su retirada en 1998, aunque en 2004 se ha reintroducido en terapéutica. Otros efectos adversos hepáticos son el aumento de la alanina aminotransferasa y de la aspartato aminotransferasa. Las enzimas hepáticas deben monitorizarse cada 2 semanas durante el tratamiento con tolcapona. Se recomienda interrumpir el tratamiento si las enzimas hepáticas están elevadas por encima del límite superior de lo normal o si hay signos o síntomas clínicos que sugieran lesiones hepáticas, como ictericia o colestasis.
- **Gastrointestinales:** Incluyen náuseas (30-35%), anorexia (19-23%), diarrea (16-18%), vómitos (8-10%), estreñimiento (6-8%), xerostomía (5-6%), dolor abdominal (5-6%), dispepsia (3-4%), flatulencia (2-4%) y sequedad de boca.
- **Musculo-esqueléticos:** Entre los efectos adversos que afectan a los músculos y esqueleto se encuentran la distonía (19-22%), calambres musculares (17-18%), rigidez (2%), artritis (1-2%) y la hipertonía (1%).
- **Respiratorios:** infecciones del tracto respiratorio superior (5-7%), disnea (3%), y congestión nasal.

- **Genitourinarios:** como decoloración de la orina (2-7%), infección del tracto urinario (5%) y trastorno de la micción (1-2%).

- **Cardiovasculares:** dolor en el pecho (1-3%), hipotensión (2%), molestias en el pecho (1-2%), y síntomas ortostáticos.

- **Dermatológicos:** hemorragias cutáneas (1%), alopecia (1%), aumento de la sudoración. En ocasiones también se ha descrito la aparición de vitíligo.

- **Oncológicos:** aparición de tumores en la piel (<1%) y en el útero (<1%).



II. PLANTEAMIENTO

La enfermedad de Parkinson (EP) es el trastorno neurodegenerativo más prevalente después de la enfermedad de Alzheimer. A pesar de todos los avances de la neurología en los últimos tiempos, aún se desconocen las causas que desencadenan esta enfermedad, por lo que también se desconoce cómo prevenirla.

En la actualidad, no existe cura para la enfermedad, por lo que los tratamientos existentes se orientan al control de la sintomatología, que permita mantener en lo posible la mejor la calidad de vida de los pacientes.

Las semividas cortas de muchos fármacos, además de la distribución inespecífica y su toxicidad, han sido una fuerza impulsora importante para el desarrollo de nuevos sistemas de administración de fármacos. Estos sistemas pueden facilitar el acceso selectivo del agente terapéutico al lugar de acción, lo que resulta especialmente interesante cuando un ingrediente activo, debido a sus características farmacocinéticas, presenta una inadecuada biodistribución y causa toxicidad. Por ello, durante los últimos años ha surgido un interés creciente en el desarrollo de micro y nanosistemas para facilitar el acceso de fármacos al cerebro, que mejore las propiedades farmacológicas y terapéuticas de las formulaciones convencionales, tales como aumentar el intervalo de dosis y reducir sus efectos secundarios.

Entre los agentes terapéuticos que se emplean en el tratamiento de la EP se encuentran los inhibidores de la COMT, como es la tolcapona, agente que se administra por vía oral y tiene una semivida plasmática de eliminación corta, de unas 1,6-3,4 horas. Esta baja semivida de eliminación, junto con su distribución inespecífica, nos ha llevado al desarrollo de nuevos sistemas de liberación modificada.



III. OBJETIVOS

El objetivo general de esta Tesis Doctoral ha sido el desarrollo, caracterización *in vitro* y evaluación *in vivo*, en un modelo animal, de dos nuevos sistemas terapéuticos de liberación controlada de tolcapona; microesferas (MPs) y nanopartículas (NPs) biodegradables de PLGA, para su administración en el tratamiento de la EP. Dichas formulaciones podrían mejorar los tratamientos actuales.

Este objetivo general engloba los siguientes objetivos parciales:

1. Evaluación de la actividad neuroprotectora de la tolcapona en la línea celular de neuroblastoma humano, SKN-AS.
2. Desarrollo y caracterización de dos sistemas multiparticulares de tolcapona; micropartículas y nanopartículas. Selección de las formulaciones más adecuadas de acuerdo con el objetivo propuesto.
3. Elección del modelo animal de Parkinson para la realización de los estudios *in vivo* de las formulaciones seleccionadas.
4. Evaluación de las formulaciones seleccionadas en un modelo animal de Parkinson inducido por rotenona.



**IV. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD
NEUROPROTECTORA DE LA TOLCAPONA EN
CULTIVOS CELULARES**

1. INTRODUCCIÓN

La técnica de cultivos celulares se desarrolló por primera vez a principios del siglo XX, como un método para estudiar el comportamiento de las células animales *in vitro*. Los cultivos celulares son el producto de la colección de células de origen animal o humano, procedentes de diferentes órganos, colocadas en condiciones especiales propicias para su supervivencia y multiplicación, manteniendo por ello todas sus funciones metabólicas de una manera semejante a las que tenían en el huésped (Thorpe, 2007). En la actualidad, los cultivos celulares se han convertido en una herramienta imprescindible, tanto para la investigación básica como para la investigación aplicada, en el campo de las ciencias biomédicas, así como para determinados procesos industriales.

Una de las propiedades que pueden presentar los cultivos celulares es la capacidad de adherencia a superficies, lo que permite que las células crezcan, ya sea en monocapa o en suspensión. Esta capacidad de adhesión está asociada al tipo de célula de la cual derivan y depende del tipo de proteínas presentes en su superficie. Atendiendo a su adherencia, los cultivos celulares tradicionalmente se han clasificado en cultivos en suspensión y cultivos en monocapa.

Cultivos en suspensión. El crecimiento en suspensión lo presentan células capaces de proliferar sin necesidad de adherirse al sustrato; siendo por tanto, independientes del anclaje, como ocurre con las células hematopoyéticas, algunas líneas celulares transformadas que han perdido o disminuido la síntesis de proteínas de anclaje y no desarrollan el proceso de quiescencia, como es el caso de algunas líneas celulares transformadas artificialmente o de células procedentes de tumores (Lehr, 2002; Freshney, 2006; Merten, 2006).

Cultivos en monocapa. Muchas líneas celulares son anclaje-dependientes, es decir, no inician la proliferación hasta que se han adherido al sustrato. En el crecimiento en monocapa las células se adherirán al sustrato y en esa forma iniciarán la proliferación. La monocapa celular crece (confluencia) cubriendo la superficie del soporte hasta que se establece contacto entre las células, lo que causa que éstas detengan su crecimiento (quiescencia). Este tipo de cultivo de proliferación lo presentan la mayor parte de las células provenientes de cultivos primarios o de líneas celulares.

Las células que se desarrollan de esta manera son estables genéticamente y tienen una naturaleza diploide normal. Algunas líneas celulares tienen la capacidad de crecer monocapa o

suspensión (células de insecto, BHK21, hibridomas), sin embargo, son muy pocas las que tienen esta dualidad (Freshney, 2005).

Los cultivos de células adheridas a una superficie de crecimiento se han considerado en dos dimensiones (cultivos 2D). Sin embargo, los cultivos 2D no son capaces de reflejar la realidad *in vivo*. Por ello, surgen las técnicas de cultivo celular en 3D. En éstas, las células se distribuyen de forma más compleja y crecen en microambientes (3D), en los que la entrada y salida de desechos es continua.

Cultivos tridimensionales. En estos cultivos se busca mantener la arquitectura *in vivo* del tejido de origen. En el caso del epitelio, los sistemas tridimensionales permiten estudiar la proliferación, morfología, e interacciones intra e intercelulares. Asimismo, se puede evaluar el efecto de sustancias que pueden afectar tales interacciones. En este tipo de cultivo es posible mantener los tipos celulares diferenciados y por ello una buena réplica del tejido de origen, sin embargo, la propagación celular es dependiente de las características de la biomatriz o soporte (Visconti *et al*, 2010; Williams, 2009).

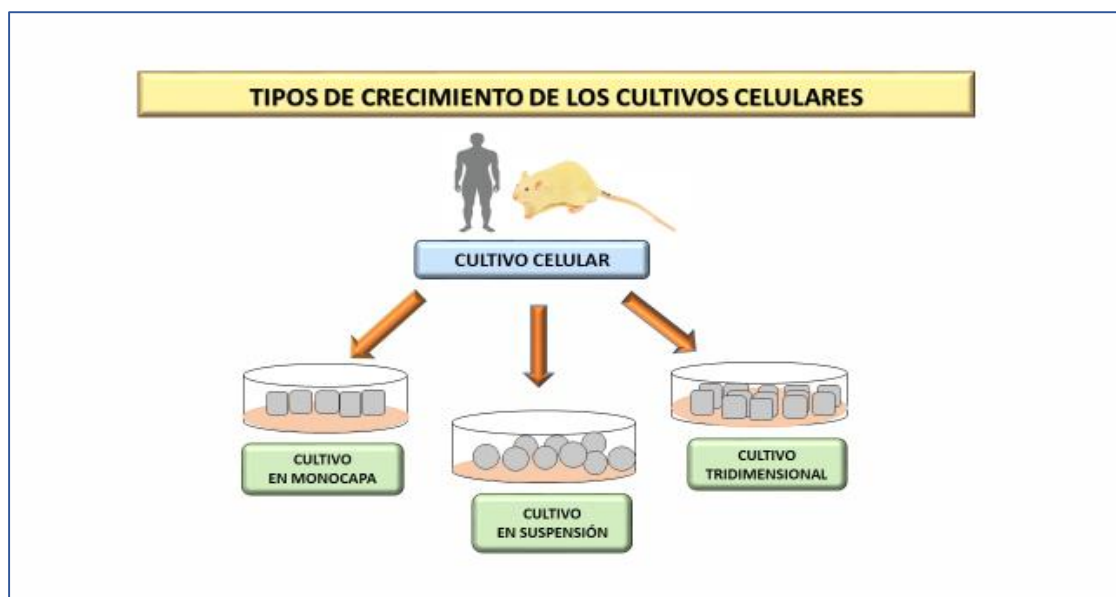


Figura 8. Tipos de cultivos celulares.

Atendiendo al origen, los cultivos se pueden clasificar en cultivos primarios y líneas celulares.

Cultivos primarios. Los cultivos primarios son aquellos cuyas células provienen de un tejido extraído de un órgano de un animal recién sacrificado. Estas células son consideradas como cultivo primario hasta que se subcultiven con éxito (sean transferidas, con o sin dilución, de un recipiente de cultivo a otro). Los cultivos primarios se caracterizan por estar constituidos por diferentes tipos de células, por lo que a veces pueden recibir el nombre de cocultivos, cuya morfología es predominantemente la de las células del órgano del que fueron aisladas, sus cromosomas tienen un número diploide, su crecimiento *in vitro* es limitado, y presentan inhibición por contacto generada por vías de señalización intra e intercelulares. Como están más cercanas a las células que las originaron, esto se ve reflejado en una mejor actividad y una funcionalidad similar a su ambiente natural.

Línea celular continua. Cuando el cultivo primario es sometido a procesos de transformación que le confieren capacidad ilimitada de multiplicación, recibe el nombre de “línea celular”. Las células que lo componen se diferencian genética y morfológicamente de las células de las cuales se originaron. Pueden provenir de tumores o de un proceso de transformación de un cultivo primario, por medio de una pérdida de regulación debido al subcultivo continuo o mediante transfección con oncogenes, o el tratamiento con agentes carcinogénicos. Este tipo de cultivo se caracteriza por no tener inhibición por contacto y porque, al crecer de manera indefinida, aumenta notablemente la masa celular del mismo a lo largo de las generaciones. Como característica negativa, se pierde la heterogeneidad celular de partida, y la población se hace uniforme y homogénea al predominar en el cultivo aquellos tipos celulares que tienen superior tasa de crecimiento. Las líneas celulares continuas pueden ser transfectadas con genes específicos para la producción de proteínas de interés, se les conoce como líneas celulares transformadas genéticamente (Freshney, 2005).

En la actualidad, las líneas celulares continuas son las más empleadas, fundamentalmente por la posibilidad de propagación, así como por las ventajas que presentan en la cuantificación, caracterización y repetibilidad de las muestras.

Las técnicas de cultivos celulares constituyen hoy en día una de las herramientas más utilizadas para la evaluación de la actividad de los fármacos. Estas técnicas permiten someter a las células a concentraciones definidas de un principio activo, asegurando su acceso directo a las mismas, lo que permite determinar de forma independiente y selectiva las concentraciones de fármaco capaces de producir un efecto neuroprotector. Esto resulta de gran interés en el desarrollo

de nuevos agentes terapéuticos para el tratamiento de procesos patológicos que cursan con neurodegeneración, tales como las formulaciones de liberación modificadas (microesferas y nanopartículas) de tolcapona (TC) objeto de esta tesis doctoral.

Este hecho, unido a que existen muchos modelos que imitan, mediante la utilización de neurotoxinas, la muerte selectiva neuronal que tiene lugar en la enfermedad de Parkinson, nos llevó a estudiar el efecto neuroprotector de la TC en la línea celular SKN-AS, y utilizando H₂O₂ como neurotóxica para producir la muerte celular.

Los organismos vivos se encuentran constantemente expuestos a especies reactivas de oxígeno (ROS) provenientes de radiaciones, fármacos o contaminación, habiéndose demostrado el papel del oxígeno en la respuesta a la estimulación de los factores de crecimiento involucrados en la regulación proliferativa. Sin embargo, si los niveles de moléculas oxidantes aumentan por encima de la capacidad de los sistemas enzimáticos antioxidantes, la célula se encuentra sometida a lo que se denomina estrés oxidativo, que puede conducir a modificaciones en proteínas, lípidos y en el ADN (Sayre *et al.*, 1997; Filiz *et al.*, 2008).

La neurotoxina empleada en nuestro estudio (H₂O₂) es captada por las células neuronales y, una vez en su interior, da lugar a la aparición de radicales libres. El incremento de las especies reactivas del oxígeno es originado por una disfunción metabólica mediada por la inhibición irreversible del complejo I de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (NADH-Coenzima Q oxidoreductasa), que conduce a disminución en los niveles de ATP, pérdida del potencial mitocondrial, alteración de la homeostasis del calcio y formación de ROS, lo que resulta finalmente en muerte celular (Cleeter *et al.*, 1992).

En consecuencia, la presencia de ROS y el daño oxidativo juegan un papel importante en procesos patológicos tales como; cáncer, diabetes y enfermedades neurodegenerativas (Halliwell y Whitemen, 2004).

La presencia de ROS induce la muerte celular a través de la vía de la apoptosis mitocondrial (Lee y Yang, 2010; Jellinger, 2001). Esto concuerda con investigaciones clínicas que dan evidencias de que la muerte celular programada es la responsable de la pérdida de la población neuronal propia de las enfermedades neurodegenerativas (Mochizuki *et al.*, 1997). Además, se cree que las neuronas son más susceptibles a ROS debido al aumento del metabolismo oxidativo

y al menor número de enzimas antioxidantes (Hamann y Shi, 2009). Por tanto, la supresión de la generación de ROS y la inhibición de la apoptosis pueden prevenir potencialmente la neurodegeneración.

2. CONDICIONES EXPERIMENTALES DE LOS ENSAYOS REALIZADOS EN CULTIVOS CELULAR

2.1. Puesta a punto y estabilización de la línea celular SKN-AS

La línea celular SKN-AS (ATCC CRL-2137) se obtiene a partir de un neuroblastoma humano. Estas células detienen su división y experimentan una diferenciación terminal cuando se tratan con el factor de crecimiento nervioso, lo que hace que esta línea sea un modelo útil para la diferenciación de células nerviosas.

Las células SKN-AS se cultivan en un medio de crecimiento DMEM (Gibco Dulbecco's Modified Eagle Medium) enriquecido con glucosa (6%), suero fetal bovino (10%) y un 1% de una mezcla de penicilina-estreptomicina, a 37°C en presencia de una atmósfera de CO₂ al 5% y un 95% de aire. Después de la incubación, se retira el medio de cultivo y se procede a la separación de las células mediante tripsinización y posterior centrifugación durante 10 minutos a 1500 rpm. A continuación, se siembran placas con 300.000 células/pocillo que se incuban durante 48 horas.

Todos los experimentos realizados con células *in vitro* se han llevado a cabo en un ambiente de asepsia proporcionado por una campana de flujo laminar.

2.2. Ensayos de viabilidad en células SKN-AS mediante el método MTT

El método MTT fue desarrollado por Mosmann en 1983 (Mosmann T, 1983) y modificado en 1986 por Denizot y Lang (Denizot y Lang, 1986). Es una técnica colorimétrica que mide la actividad del enzima succínico deshidrogenasa, situada en las mitocondrias celulares. Se basa en que la sal de tetrazolio, el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), de color amarillo, atraviesa las membranas celulares y es reducida por las reductasas de la cadena de transporte de electrones mitocondrial de las células vivas, formando unos gránulos de formazán azules oscuros que, posteriormente, se solubilizan en medio ácido. La valoración del formazán se

lleva a cabo mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 570 nm, lo que permite la cuantificación de la viabilidad celular (Alley *et al.*, 1988). Este método es muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular (Marshall *et al.*, 1995; Montejo *et al.*, 2010).

Los ensayos en las células SKN-AS se han realizado utilizando como agente neurotóxico H₂O₂. En una primera etapa, y con el fin de seleccionar la concentración de agente neurotóxico más idónea, capaz de producir neurotoxicidad, se ensayaron diferentes concentraciones de ésta; 100, 300, 500, 700 y 900 µM.

El posible efecto neuroprotector de la TC se ha determinado incubando las células SKN-AS con H₂O₂ a las concentraciones seleccionadas durante 24 horas, a las que se les incorporó distintas concentraciones de TC; 40, 50, 60, 80 y 100 µM. Posteriormente y, después de transcurridas 24 horas del tratamiento con TC, se eliminó el medio de cada pocillo, que fue sustituido por medio fresco sin suero, añadiendo a cada pocillo 10 µl de una solución de MTT (5 mg/ml) preparada en PBS. Después de incubación durante 2 horas a 37°C se añadió a cada pocillo 100 µl de una solución al 10% de dodecil sulfato sódico (SDS) preparada en ácido clorhídrico 0,01 N, y posteriormente, se procedió a agitar las muestras, que se incubaron durante otras 24 horas, determinándose la absorción por espectrofotometría a 570/630 nm.

La viabilidad celular en porcentaje se determinó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Viabilidad} = (\text{DO células tratadas} / \text{DO células control}) \times 100$$

donde DO es la densidad óptica.

Los resultados se expresan en porcentaje con respecto al control. Todos los ensayos se han realizado por triplicado.

2.3. Ensayos de viabilidad celular y producción de ROS (Especies Reactivas de Oxígeno) en células SKN-AS mediante citometría de flujo

La técnica de citometría de flujo se basa en hacer pasar las células de forma individual por un haz de luz generado por un láser. La interacción producida da lugar a la transmisión, dispersión y emisión de dicha luz, que es recogida por un detector, siendo entonces posible diferenciar distintas poblaciones celulares inducidas en las muestras.

La viabilidad celular se evalúa también por citometría de flujo, midiendo el aumento de la fluorescencia del marcador DCFH-DA (acetato de diclorodihidrofluoresceína), debido a la producción ROS generadas en las mitocondrias. Se trata de una de las técnicas más utilizadas para medir el estado Redox de las células (Eruslanov y Kusmartsev, 2010).

Las esterasas intracelulares se unen al DCFH-DA en los dos enlaces éster dando lugar a un compuesto relativamente polar H_2DCF , que no presenta fluorescencia pero que, tras acumularse intracelularmente, sufre oxidación, dando lugar a un compuesto con elevada fluorescencia (DCF). El estado Redox de las células se puede determinar, por tanto, mediante el incremento de la fluorescencia, que es proporcional a la concentración de ROS en las células (Royall y Ischiropoulos, 1993; Eruslanov y Kusmartsev, 2010).

La incubación de las células con la neurotoxina (H_2O_2) y, conjuntamente con diferentes concentraciones de TC (40, 50, 60, 80 y 100 μM), se ha realizado utilizando el protocolo indicado anteriormente, con el fin de determinar el posible efecto neuroprotector de TC.

Una vez incubadas las células (placas de pocillos con 300.000 células/pocillo), se tripsinizan, se retira el sobrenadante que se resuspende en 300 μl de DCFH-DA, a excepción de las muestras destinadas a la determinación de autofluorescencia que se realiza utilizando 300 μl de PBS. Posteriormente, las células se incuban durante 30 minutos a 37°C en oscuridad. Finalmente, se mide la fluorescencia empleando una sonda FL1 (530/30) y utilizando como longitud de onda de excitación 488 nm.

Para descartar células muertas, se realiza la contratinción con yoduro de propidio, midiendo la fluorescencia mediante una sonda FL3 con detección 650/LP, para la misma longitud de onda de excitación.

En este caso, los resultados obtenidos se expresan como viabilidad celular, en porcentaje de células vivas, y también como intensidad de fluorescencia.

2.4. Estudio del efecto de la Tolcapona en la línea celular SKN-AS mediante microscopia confocal

Después de la incubación de las células SKN-AS con la neurotoxina (H_2O_2) y con diferentes concentraciones de TC (40, 50, 60, 80 y 100 μM), se han visualizado mediante microscopia confocal con el fin de observar el posible efecto de la TC en los orgánulos citoplásmicos de dichas células, en concreto sobre las mitocondrias. Para ello, se ha utilizado para el marcado de las células MitoTracker® Mitochondrion-Selective Probes (Vitrogen, ThermoFisher Scientific), que contiene MitoTracker Red CMXRos, un colorante rojo fluorescente (X-rosamina) que tiñe las mitocondrias de las células vivas, dependiendo su acumulación del potencial de membrana. Esta sonda inicialmente se encuentra en forma reducida, por lo que no emite fluorescencia. Una vez que penetra en el interior de la mitocondria, es oxidada y retenida en su interior, emitiendo fluorescencia roja. La emisión máxima de fluorescencia tiene lugar a una longitud de onda de excitación de 579 nm y de emisión 599 nm. La fluorescencia de las células teñidas se visualiza mediante un microscopio confocal (Leica SP5 confocal laser scanning microscope, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). La preparación de las muestras se ha realizado de acuerdo con el protocolo de uso indicado por la empresa suministradora para el producto, adaptado a nuestras condiciones de trabajo.

Finalmente, hay que indicar que los ensayos en cultivos celulares se han realizado en la Unidad de Cultivos de Células Animales de la Universidad de Alcalá (Madrid).

2.5. Análisis estadístico

Todos los ensayos de viabilidad celular se han realizado por triplicado, expresando los resultados obtenido como media \pm error estándar de la media. Los datos se analizaron utilizando Statgraphics versión de 18x64 bits (Statgraphics Technologies, Inc., EE. UU.) mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido del test de Newman-Keuls, y considerando diferencias significativas para $p < 0,05$.

3. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD NEUROPROTECTORA DE LA TOLCAPONA EN LA LÍNEA CELULAR SKN-AS

3.1. Ensayos de viabilidad celular en la línea celular SKN-AS mediante el método MTT

Los resultados obtenidos al ensayar distintas concentraciones de neurotoxina (H_2O_2) en esta línea celular (SKN-AS), se muestran en las figuras 9 y 10. En la figura 9 se representan las absorbancias a 570/630 nm para el control y las distintas concentraciones de H_2O_2 ensayadas (100, 300, 500, 700 y 900 μM), mientras que en la figura 10 se muestran los porcentajes de viabilidad celular obtenidos en cada caso.

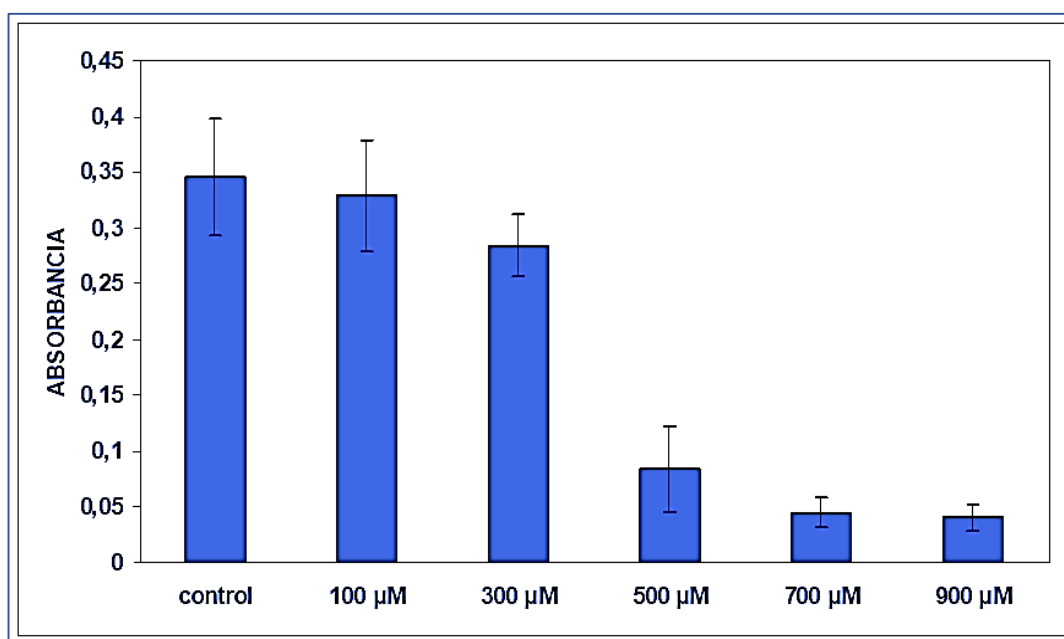


Figura 9. Valores medios de absorbancia (\pm D.E.) obtenidos en células SKN-AS para el control y las distintas concentraciones de H_2O_2 .

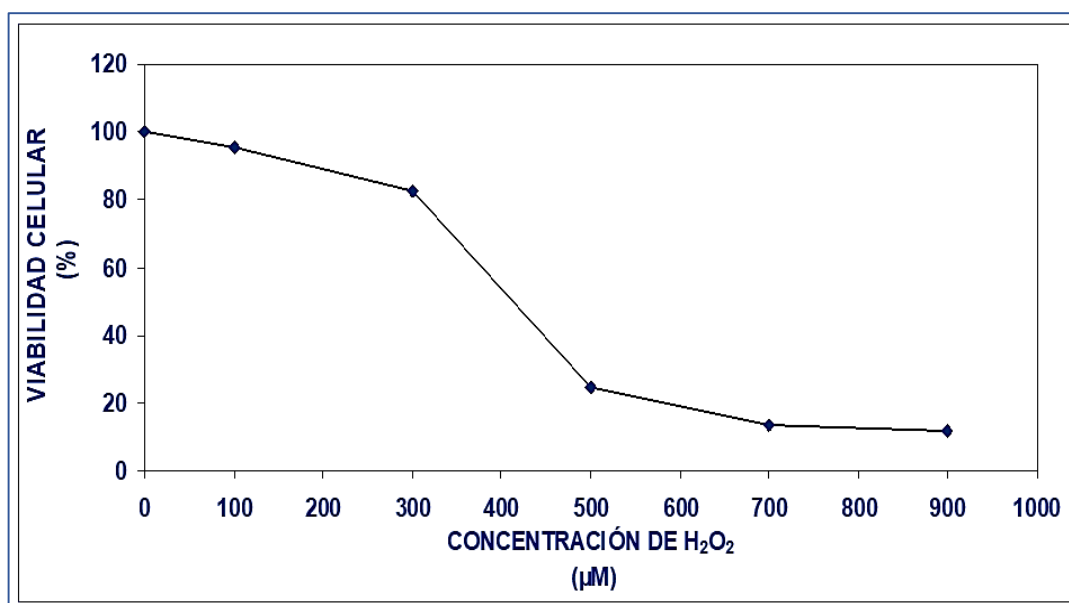


Figura 10. Valores medios de viabilidad celular (%) obtenidos en células SKN-AS para el control y las distintas concentraciones de H₂O₂, mediante el método del MTT.

A medida que aumenta la concentración de H₂O₂, se observa una disminución significativa en la viabilidad celular en comparación con el control, de manera que para una concentración de 300 μM se obtiene un porcentaje de viabilidad del 80±3,30% y, para la de 500 μM el valor medio de viabilidad es de tan sólo un 23±4,6%.

En función de estos resultados hemos seleccionado una concentración de 900 μM para realizar los estudios de neuroprotección con TC, ya que a dicha concentración se produce una muerte celular muy significativa.

En las figuras 11 a 16 se muestran imágenes obtenidas mediante microscopía invertida de contraste de fases de las células SKN-AS control y tras ser incubadas con las distintas concentraciones de H₂O₂.

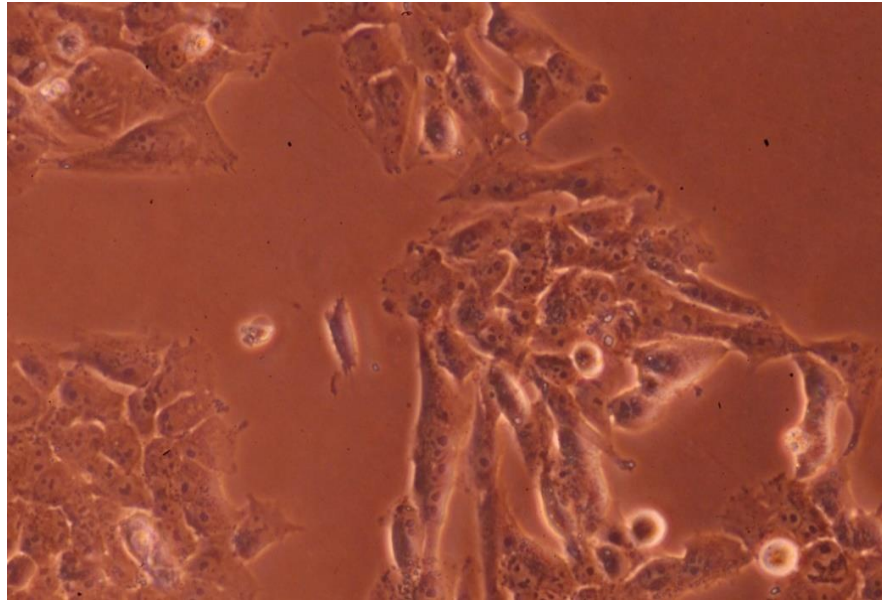


Figura 11. *Imagen obtenida por microscopía invertida de contraste de fases de células SKN-AS control (20x).*

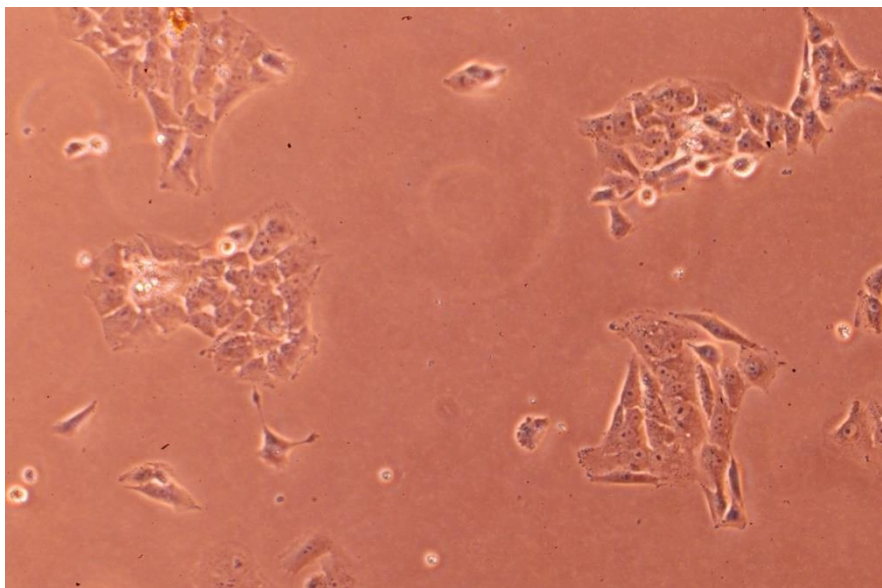


Figura 12. *Imagen obtenida por microscopía invertida de contraste de fases de células SKN-AS incubadas con una concentración de H₂O₂ de 100 μM (20x).*

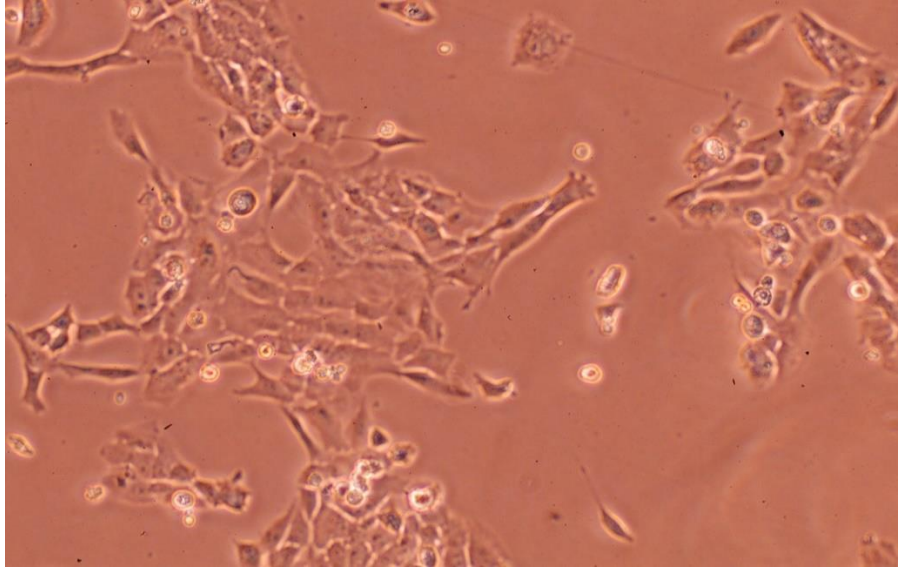


Figura 13. *Imagen obtenida por microscopía invertida de contraste de fases de células SKN-AS incubadas con una concentración de H₂O₂ de 300 μM (20x).*

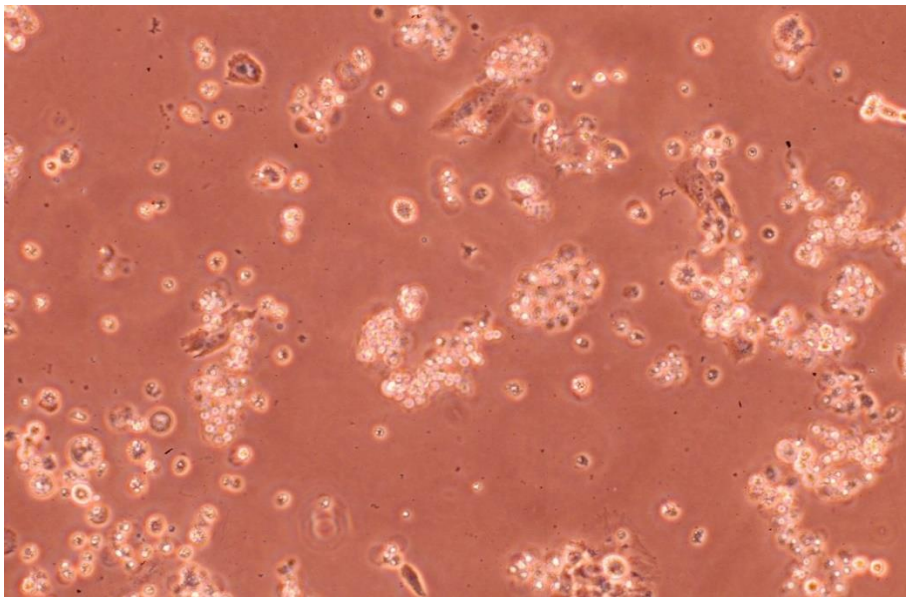


Figura 14. *Imagen obtenida por microscopía invertida de contraste de fases de células SKN-AS incubadas con una concentración de H₂O₂ de 500 μM (20x).*

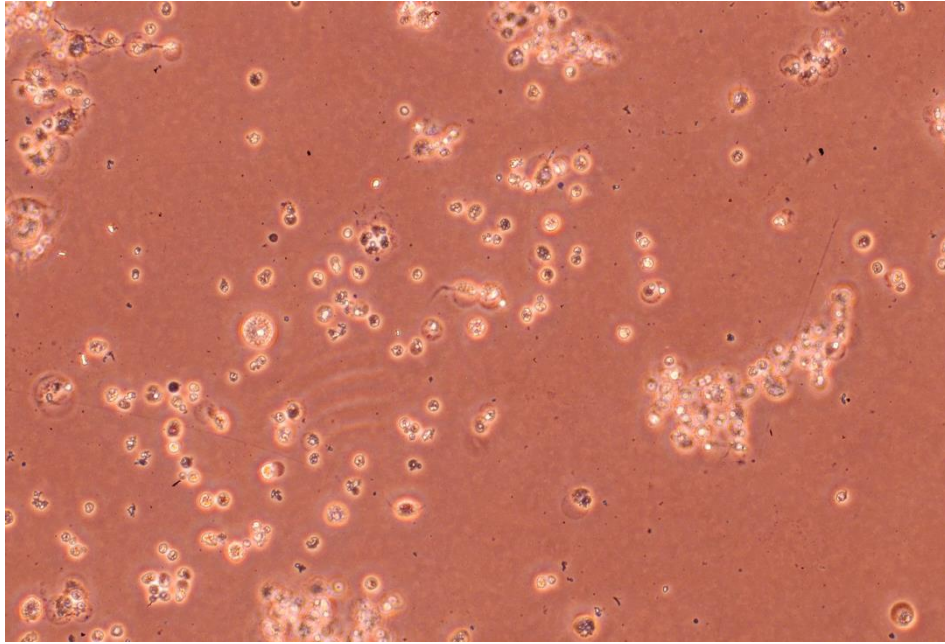


Figura 15. *Imagen obtenida por microscopía invertida de contraste de fases de células SKN-AS incubadas con una concentración de H₂O₂ de 700 μM (20x).*

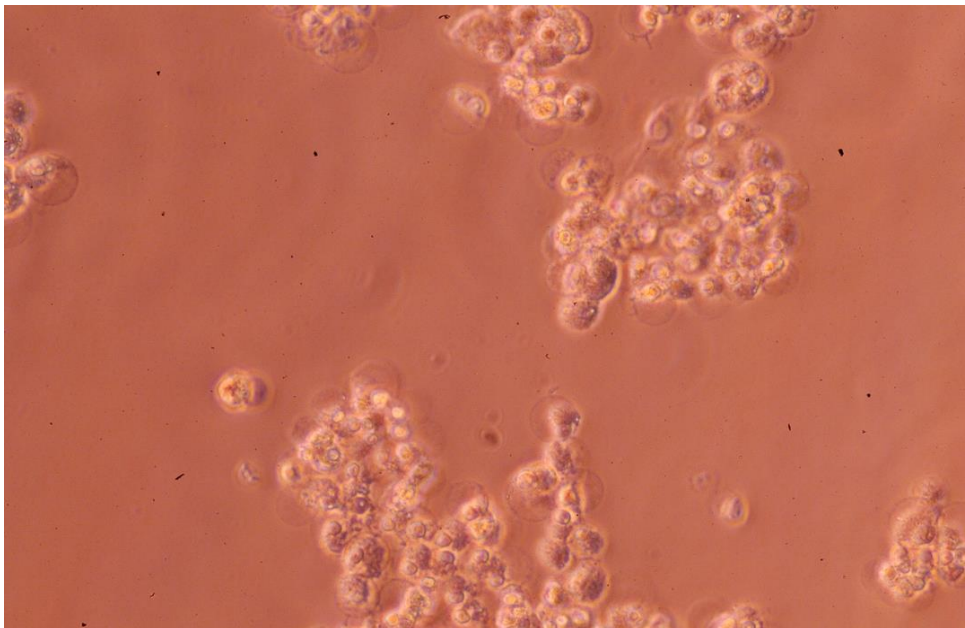


Figura 16. *Imagen obtenida por microscopía invertida de contraste de fases de células SKN-AS incubadas con una concentración de H₂O₂ de 900 μM (20x).*

A medida que aumenta la concentración de neurotoxina (H₂O₂), desde 100 μM hasta 900 μM, las células mostraron cambios morfológicos, que incluyen la pérdida de proyecciones

celulares y la aparición de células redondeadas que forman agregados, especialmente apreciables con las concentraciones más elevadas de la neurotoxina (500 μM a 900 μM). Este comportamiento es similar al observado por Zhang y col (Zhang *et al.*, 2017) al exponer la línea celular de neuroblastoma SK-N-SH a concentraciones crecientes de H_2O_2 . Además, los resultados son similares a los datos de viabilidad celular obtenidos, ya que los descensos más acusados en la viabilidad celular se manifestaban para las concentraciones de H_2O_2 comprendidas entre 500 μM y 900 μM .

3.2. Ensayos de viabilidad celular y producción de ROS (Especies Reactivas de Oxígeno) en células SKN-AS mediante citometría de flujo

Las neuronas son más susceptibles al daño oxidativo que otros tipos de células, debido a su alto consumo de oxígeno y baja capacidad antioxidante. De ahí que la pérdida de neuronas por estrés oxidativo, juegue un papel clave en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Destee *et al.*, 2009), ya que la acumulación de ROS conduce a daño celular (Rodrigo *et al.*, 2013).

En nuestro estudio hemos investigado el papel neuroprotector de la TC en células SKN-AS tratadas con H_2O_2 .

En la figura 17 se muestran los resultados de viabilidad celular obtenidos por citometría de flujo, expresados en porcentaje de células vivas. Los resultados correspondientes a la producción de ROS, expresados como intensidad media de fluorescencia, se recogen en la figura 18.

En función de los resultados obtenidos se comprueba que el porcentaje de células vivas decrece significativamente con la concentración de neurotoxina ensayada, de manera que pasa de un 92,12% en células control a un 36,79% en las células tratadas con H_2O_2 . La exposición de las células al H_2O_2 exógeno produce una sobreproducción de ROS, lo que resulta en peroxidación de los lípidos de la membrana y alteración de la integridad celular (Jiang *et al.*, 2009). La incubación con concentraciones crecientes de TC supone una recuperación de la viabilidad celular, de manera que se alcanzan valores similares a los obtenidos para las células control. Así, para las concentraciones de TC de 80 μM y 100 μM , se obtienen porcentajes de supervivencia celular del 88,62% y 89,30%, respectivamente, lo que demuestra el efecto neuroprotector producido por este agente terapéutico. Por tanto, se demuestra que el tratamiento con TC es capaz de revertir la apoptosis inducida por H_2O_2 .

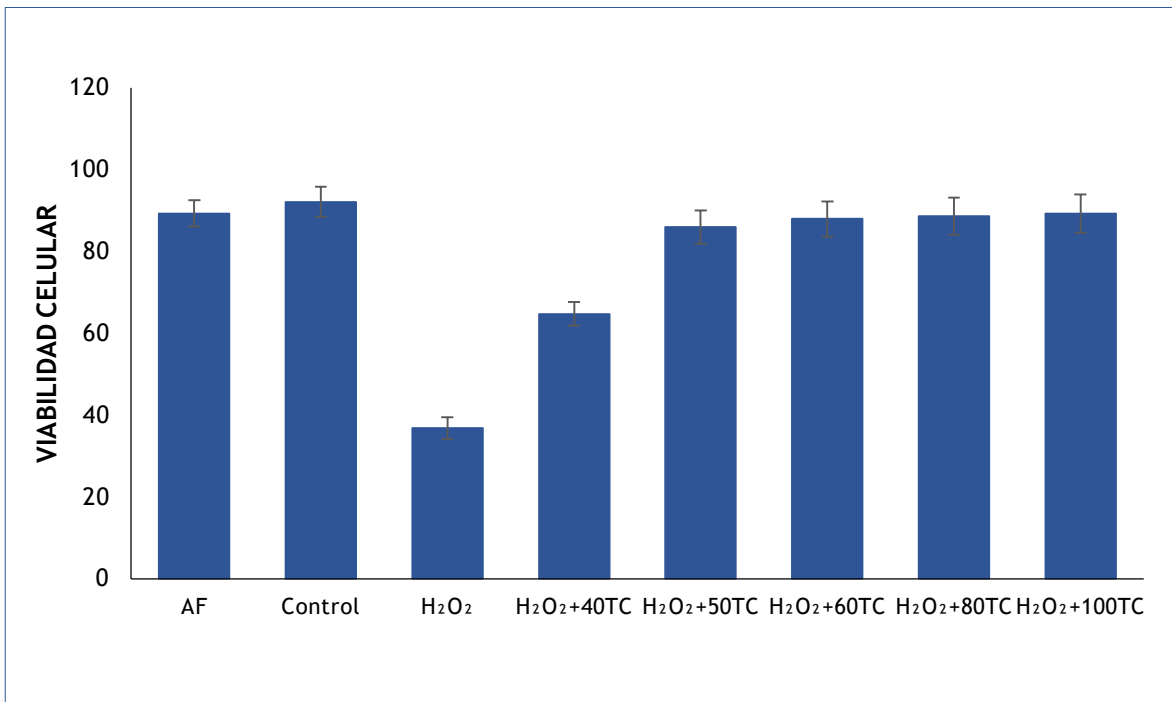


Figura 17. Valores medios de viabilidad celular (%) (\pm D.E.) de intensidad de fluorescencia obtenidos en la línea celular SKN-AS para el control, control con H₂O₂ y las distintas concentraciones de TC (μ M), mediante citometría de flujo. Autofluorescencia (AF).

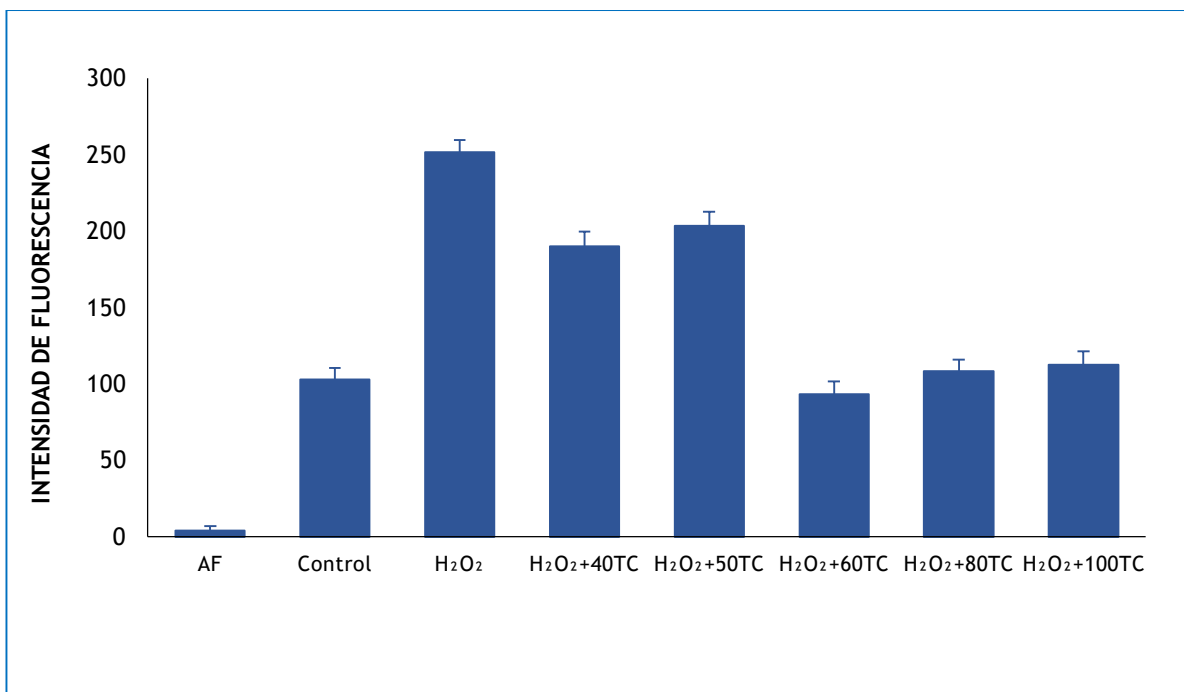
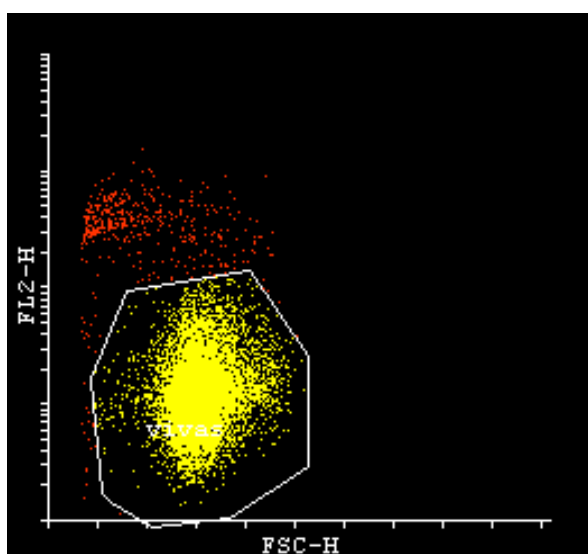


Figura 18. Valores medios de intensidad de fluorescencia (DE) obtenidos en la línea celular SKN-AS para el control, control con H₂O₂ y las distintas concentraciones de TC (μ M), mediante citometría de flujo. Autofluorescencia (AF).

Por lo que se refiere a los resultados de intensidad de fluorescencia obtenidos, se confirma la actividad oxidativa de la neurotoxina utilizada (H_2O_2), ya que la intensidad media de fluorescencia aumenta de 102,93 (control) a 251,64 (control+ H_2O_2), indicando que los niveles de ROS intracelular son elevados. Con las concentraciones de 40 μM y 50 μM de TC se produce un aumento significativo de la actividad oxidativa de las células respecto al control. Sin embargo, a concentraciones más elevadas de TC (60, 80 y 100 μM), se obtienen valores de intensidad de fluorescencia similares al de las células control, lo que confirma el efecto neuroprotector de la TC a dichas concentraciones.

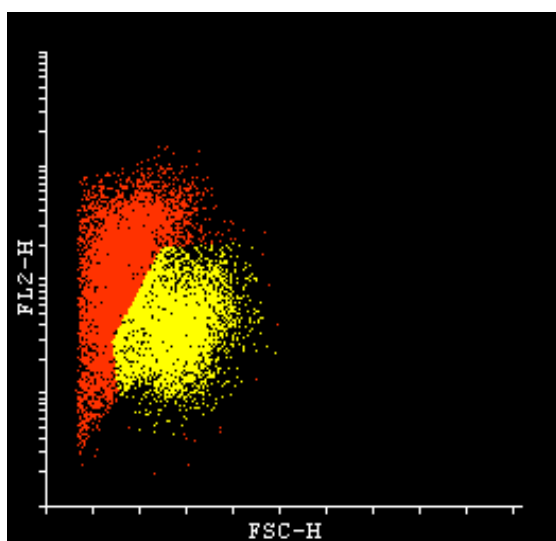
A continuación, en las figuras 19 a 25, se muestran a modo de ejemplo los resultados para cada una de las condiciones de estudio; células control, incubación de las células SKN-AS con la neurotoxina (H_2O_2) y las correspondientes a la incubación conjunta de las células con la neurotoxina y las distintas concentraciones de TC ensayadas (40, 50, 60, 80, 100 μM), respectivamente, expresados como intensidad de fluorescencia de la población de células vivas analizadas en cada caso (en las ventanas analizadas) con respecto al total y sus resultados tabulados. Como se puede observar en las imágenes obtenidas, el tratamiento de la línea celular SKN-AS provoca tanto un incremento en la población de células muertas con respecto al control.

Sin embargo, la incorporación de neurotoxina (H_2O_2) y TC a concentraciones de 80 y 100 μM , imágenes similares al control, donde se puede observar una reducida población de células muertas. Nuestros resultados están en concordancia con los obtenidos por otros autores que indican que el H_2O_2 inducía la muerte celular por apoptosis en varias líneas celulares (Chen *et al.*, 2016; Jin *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2016, Zhang *et al.*, 2017).



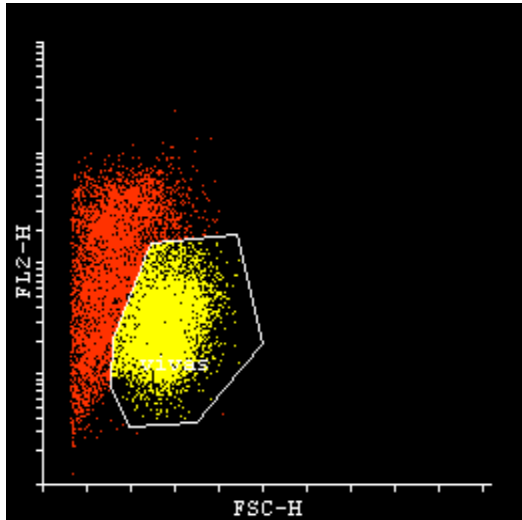
Control	
	Ventana
Total	100%
Vivas	94,76%

Figura 19. Intensidad de fluorescencia y datos tabulados, obtenidos por citometría de flujo, de la población de células SKN-AS control (ventana analizada).



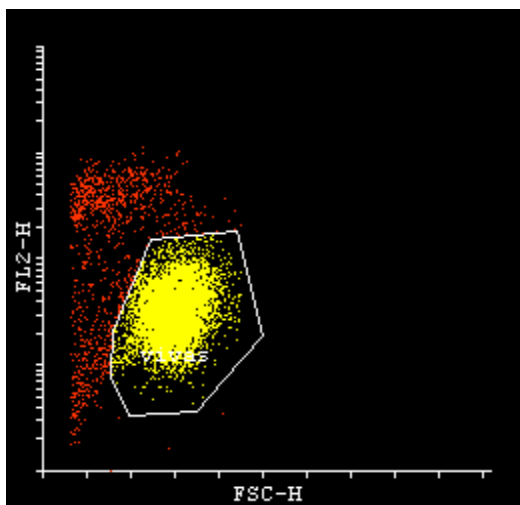
H ₂ O ₂	
	Ventana
Total	100%
Vivas	37,58%

Figura 20. Intensidad de fluorescencia y datos tabulados, obtenidos por citometría de flujo, de la población de células SKN-AS tratadas con H₂O₂ (ventana analizada).



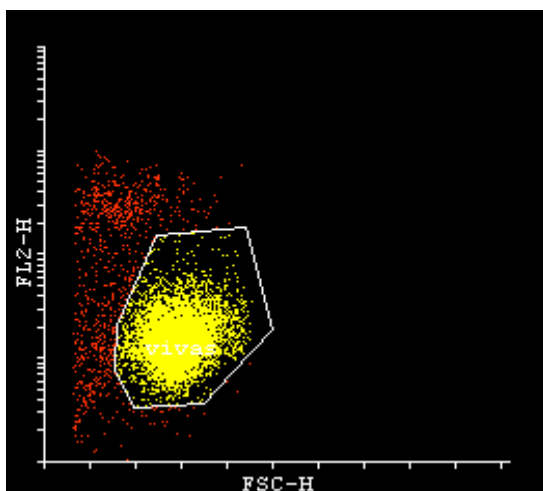
H₂O₂ + 40 μM TCP	
	Ventana
Total	100%
Vivas	60,38%

Figura 21. Intensidad de fluorescencia y datos tabulados, obtenidos por citometría de flujo, de la población de células SKN-AS tratadas con H₂O₂ y en incubación conjunta con 40 μM de TC (ventana analizada).



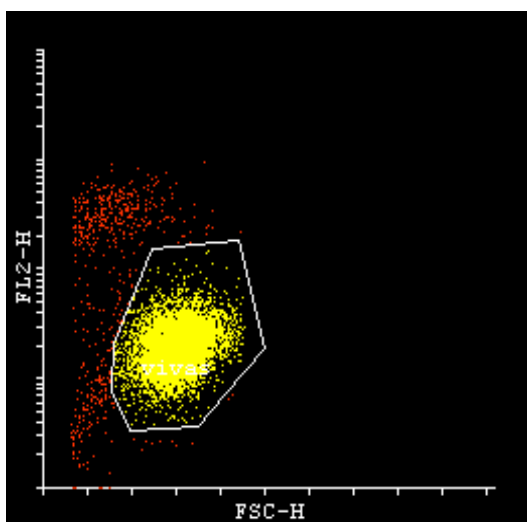
H₂O₂ + 50 μM TC	
	Ventana
Total	100%
Vivas	87,53%

Figura 22. Intensidad de fluorescencia e histograma, obtenidos por citometría de flujo, de la población de células SKN-AS tratadas con H₂O₂ μM y en incubación conjunta con 50 μM de TC (ventana analizada).



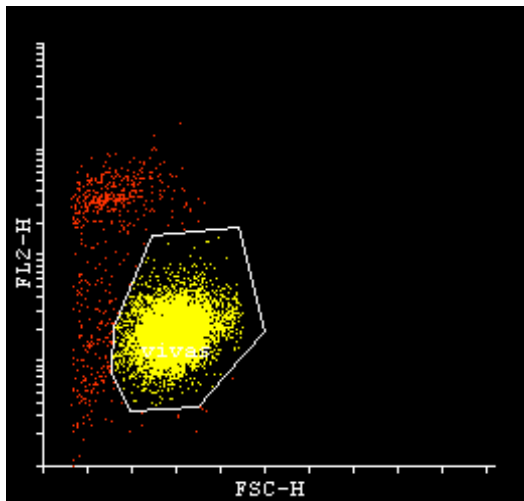
H ₂ O ₂ + 60 μM TC	
	Ventana
Total	100%
Vivas	89,92%

Figura 23. Intensidad de fluorescencia y datos tabulados, obtenidos por citometría de flujo, de la población de células SKN-AS tratadas con H₂O₂ y en incubación conjunta con 60 μM de TC (ventana analizada).



H ₂ O ₂ + 80 μM TC	
	Ventana
Total	100%
Vivas	93,28%

Figura 24. Intensidad de fluorescencia y datos tabulados, obtenidos por citometría de flujo, de la población de células SKN-AS tratadas con H₂O₂ y en incubación conjunta con 80 μM de TC (ventana analizada).



H₂O₂ + 100 μM TC	
	Ventana
Total	100%
Vivas	92,76%

Figura 25. Intensidad de fluorescencia y datos tabulados, obtenidos por citometría de flujo, de la población de células SKN-AS tratadas con H₂O₂ y en incubación conjunta con 100 μM de TC (ventana analizada).

Los resultados obtenidos demuestran y confirman el efecto neuroprotector de TC a las concentraciones ensayadas, especialmente cuando se tratan las células con concentraciones de 80 μM y 100 μM.

Los histogramas muestran la intensidad de expresión de un marcador versus el número de eventos. El desplazamiento de la curva hacia la derecha indica mayor expresión del marcador, mientras que la altura del pico indica la frecuencia de las células capturadas.

En la figura 26 se muestran, a modo de ejemplo, los histogramas de intensidad de fluorescencia correspondientes a uno de los ensayos, y para cada una de las condiciones de estudio.

En la figura 26a, 26b, 26c y 26d se muestran los resultados obtenidos para las células control, para la incubación de las células SKN-AS con la neurotoxina (H₂O₂), para incubación conjunta de las células con la neurotoxina y a las concentraciones de 80 y 100 μM de TC, Como se puede observar en las imágenes obtenidas, el tratamiento de la línea celular SKN-AS con H₂O₂ provoca un desplazamiento hacia la derecha del histograma con respecto al control, lo que refleja una mayor expresión de los niveles de ROS. Sin embargo, la incorporación de neurotoxina (H₂O₂)

y TC a concentraciones de 80 y 100 μM , reduce las expresiones de los niveles de ROS, que resultaron ser similares al control (Figura 26e).

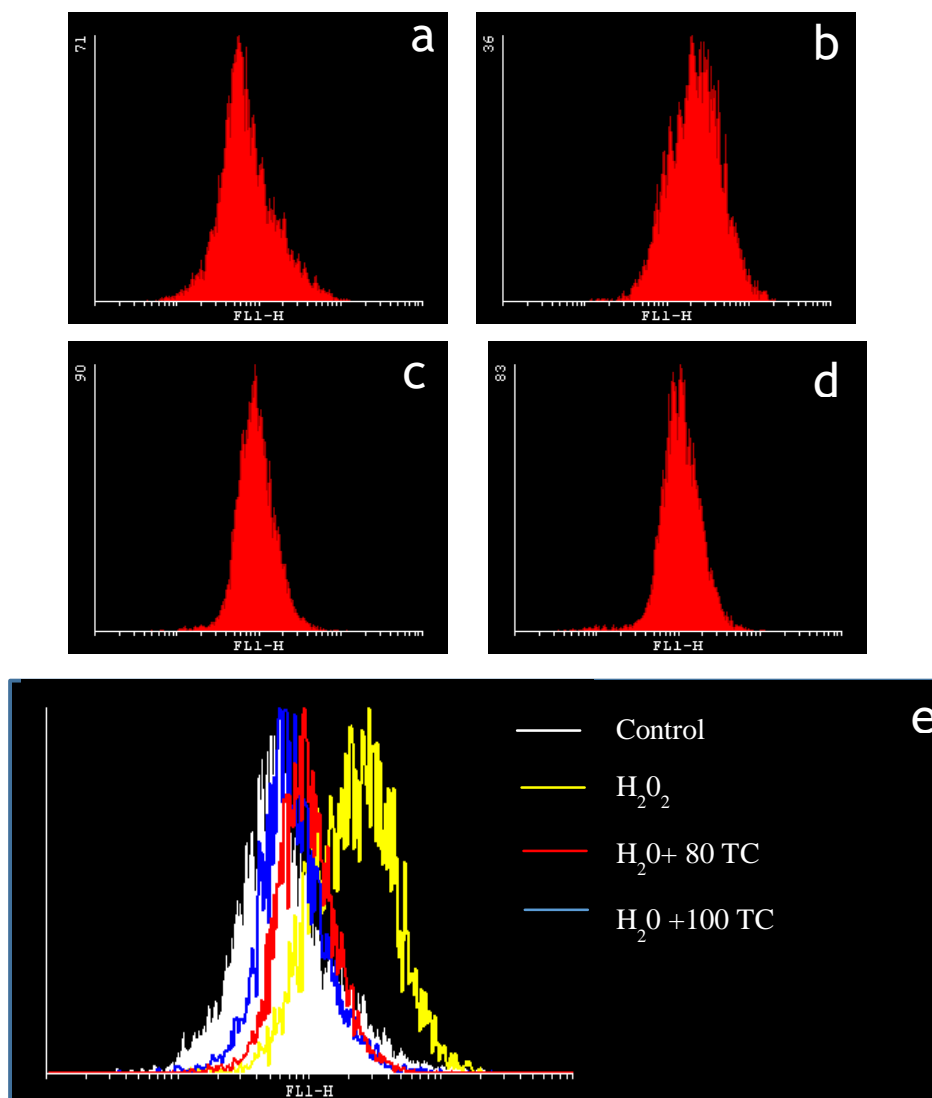


Figura 26. Histogramas de intensidad de fluorescencia, obtenidos por citometría de flujo, de las siguientes poblaciones de células SKN-AS: control (a), tratadas con H_2O_2 (b) y en incubación conjunta con 80 y 100 μM de TC (c y d, respectivamente) y dichos histogramas solapados (e).

Por último, en las figuras 27 a 31 se muestran las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal de las células SKN-AS control, tratadas con H_2O_2 y con concentraciones de TC de 40 μM , 80 μM y 100 μM .

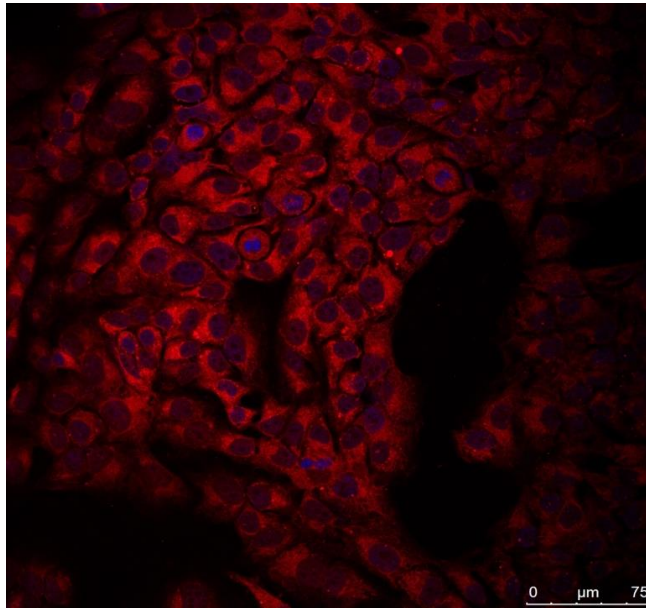


Figura 27. *Imagen obtenida mediante microscopía confocal de células SKN-AS (mitocôndrias) sin tratar (control).*

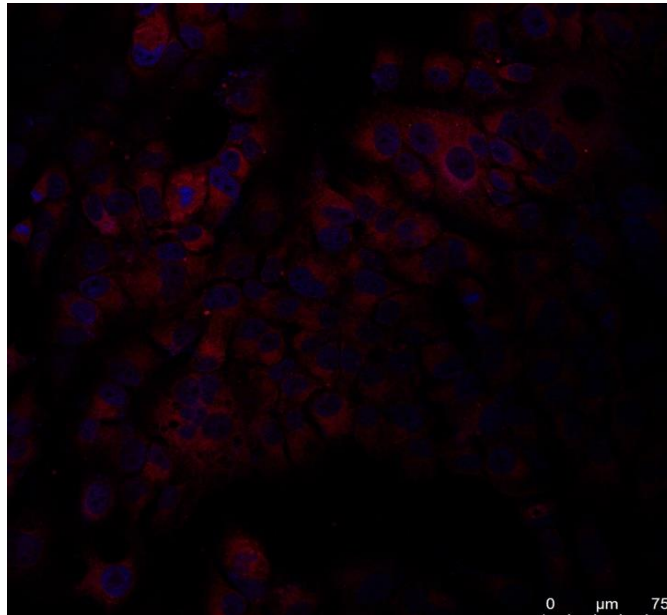


Figura 28. *Imagen obtenida mediante microscopía confocal de células SKN-AS (mitocondrias) tratadas con H₂O₂.*

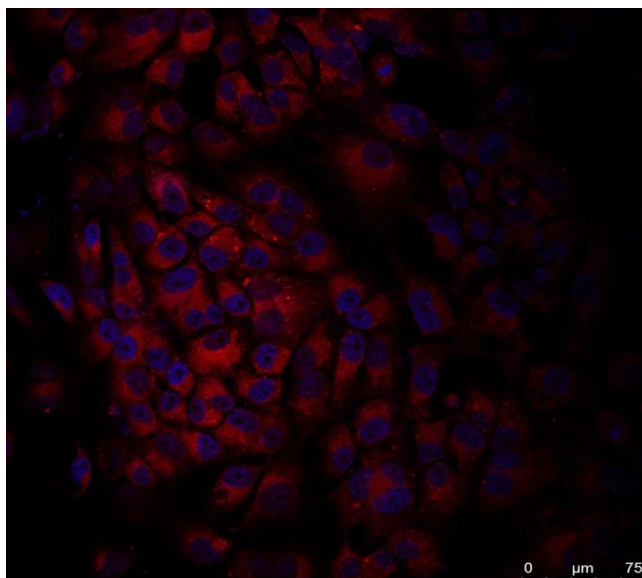


Figura 29. *Imagen obtenida mediante microscopía confocal de células SKN-AS (mitocondrias) tratadas con H_2O_2 y una concentración de $40 \mu M$ de TC.*

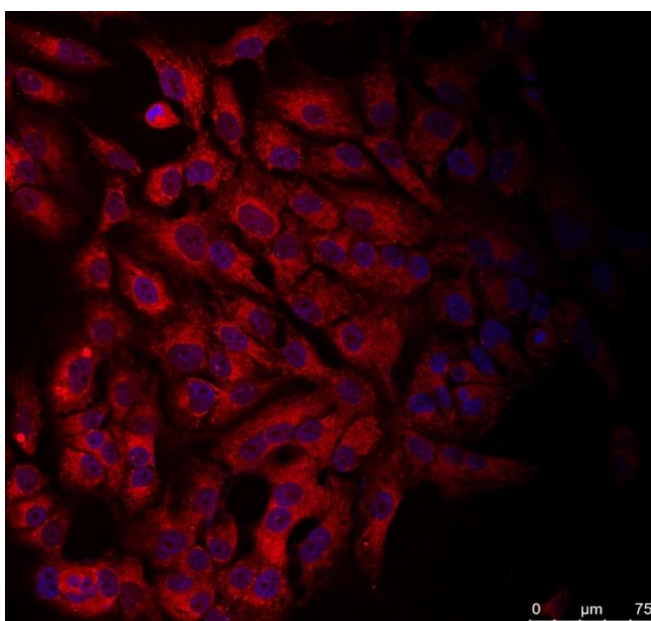


Figura 30. *Imagen obtenida mediante microscopía confocal de células SKN-AS (mitocondrias) tratadas con H_2O_2 y una concentración de $80 \mu M$ de TC.*

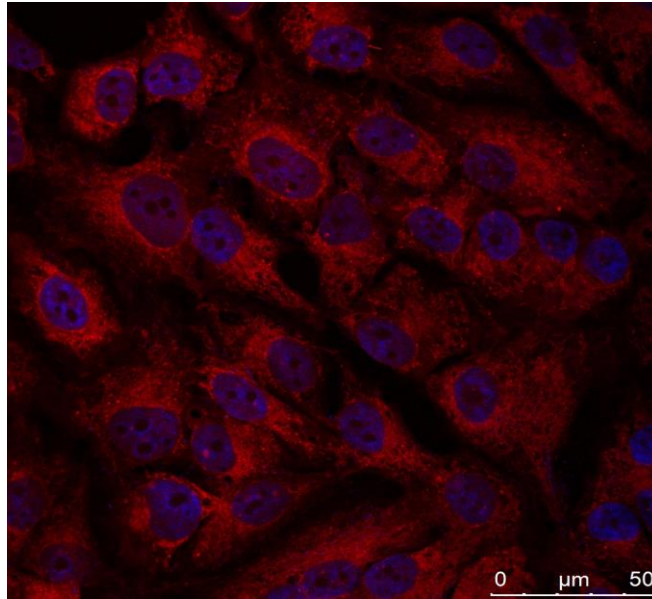


Figura 31. *Imagen obtenida mediante microscopía confocal de células SKN-AS (mitocondrias) tratadas con H₂O₂ y una concentración de 100 µM de TC.*

Se trata de imágenes de mitocondrias de células SKN-AS, y en ellas se puede observar que las mitocondrias activas presentan coloración roja y los núcleos, coloración azul, de manera que tras su incubación con la neurotoxina (H₂O₂), el número de células que muestran las mitocondrias coloreadas de rojo disminuye significativamente, en comparación con las células control, lo que es representativo de muerte celular. Por el contrario, al tratar las células con TC (40 µM, 80 µM y 100 µM), va aumentando progresivamente la cantidad de mitocondrias activas, signo evidente del efecto neuroprotector de la TC, sobre todo cuando se utiliza a las concentraciones más elevadas.



**V. DESARROLLO DE SISTEMAS
MULTIPARTICULARES DE TOLCAPONA:
MICROPARTÍCULAS Y NANOPARTÍCULAS**

1. ELABORACIÓN DE MICROPARTÍCULAS DE PLGA CARGADAS CON TOLCAPONA

Las micropartículas de TC se han obtenido mediante la técnica de extracción- evaporación del disolvente a partir de una emulsión O/A (Fernández *et al.*, 2011). Para ello, se disuelven 400 mg del polímero PLGA (ácido poli-láctico-co glicólico) 50:50 Resomer[®] RG 502, en 1,5 ml de diclorometano (DCM), bajo agitación constante durante 2-3 min.

A esta solución se le añade una cantidad fija de TC (70-120 mg) (Tabla 7) y se agita durante 2 min, hasta obtener una mezcla homogénea. La dispersión formada se añade a 10 ml de PVA al 1% y se homogeneiza con ayuda de un politrón a una velocidad de 5.000 rpm durante 3 min, hasta formar la emulsión. Una vez obtenida la emulsión, se transfiere a un vaso de precipitados que contiene 50 ml de solución de polivinilpirrolidona (PVP) al 0,1%, que se mantiene bajo suave agitación durante 3 horas a temperatura ambiente, hasta la completa evaporación del disolvente orgánico.

Una vez que las microesferas están maduras, se filtran a través de membranas de 0,45 μm y se lavan con agua Milli-Q. Finalmente, se congelan para su posterior liofilización durante 24 h, con el fin de eliminar la humedad residual (Figura 32).

Las diferentes formulaciones obtenidas por este procedimiento (MP-TC1 a MP-TC4) (Tabla 7) se han preparado por cuadruplicado.

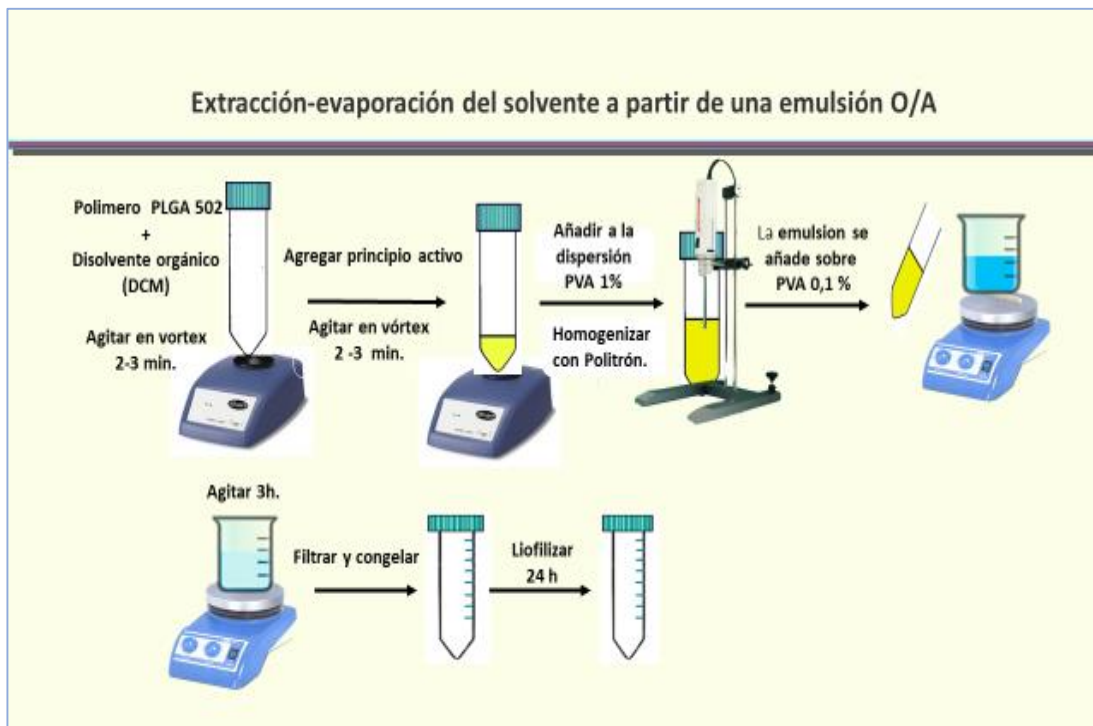


Figura 32. Método de elaboración de las micropartículas de tolcapona por la técnica de extracción- evaporación del solvente a partir de una emulsión O/A

Formulación	Cantidad de TC (mg)	Rendimiento medio del proceso±DE (%)	EE±DE (%)	Tamaño medio de partícula±DE (nm)	Índice de polidispersión	Span
<i>MP-TC1</i>	70	62,33 ± 15,10	73,92 ± 10,17	27,73 ± 2,59 μm	0,24	0,63
<i>MP-TC2</i>	80	78,30 ± 11,96	79,63 ± 3,55	23,05 ± 3,53 μm	0,31	0,68
<i>MP-TC3</i>	100	84,58 ± 5,75	83,17 ± 4,82	16,35 ± 2,83 μm	0,38	0,65
<i>MP-TC4</i>	120	87,69 ± 7,04	85,13 ± 2,08	17,00 ± 3,22 μm	0,28	0,68
<i>NP-TC1</i>	6	55,78 ± 16,87	56,16 ± 4,65	197,39 ± 43,19 nm	0,33	0,66
<i>NP-TC2</i>	8	75,28 ± 5,73	55,99 ± 21,41	202,08 ± 48,70 nm	0,38	0,61
<i>NP-TC3</i>	10	70,35 ± 14,19	53,69 ± 9,09	182,59 ± 23,94 nm	0,41	0,60
<i>NP-TC4</i>	12	73,29 ± 4,50	46,16 ± 5,99	210,20 ± 7,92 nm	0,29	0,63

Tabla 7. Formulaciones de TC elaboradas y sus características. TC (tolcapona), EE (eficacia de encapsulación), DE (desviación estándar)

2. ELABORACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLGA CARGADAS CON TOLCAPONA

Se han preparado nanopartículas (NPs) de PLGA cargadas con TC mediante el método de nanoprecipitación. Se ha seleccionado este procedimiento porque requiere menos aporte de energía externa que otros y nos permite usar acetona, que presenta menor toxicidad que otros solventes (Katiyar *et al.*, 2016).

En la optimización de la formulación se han preparado formulaciones con distintas cantidades de TC: 6 a 12 mg (Tabla 7). En todos los casos, se utilizan 50 mg de PLGA 502 (Tabla 7). Para ello, la TC y el polímero se disuelven en 4 ml de acetona bajo agitación en vortex durante 2 min. A continuación, la disolución formada se añade a 12 ml de PVA al 0,5%, con agitación continua durante 15 min para obtener las NPs. Posteriormente, se procede a la eliminación de la acetona utilizando un rotavapor durante 2 h a 25°C y 70 mBar de presión (Buchi Rotavapor-R, BÜCHI Labortechnik AG, Suiza). La suspensión resultante se lava tres veces con agua destilada y se centrifuga (Avanti J-301, Beckman Coulter Inc., EE.UU.) a 15.000 rpm durante 30 min para eliminar todo el PVA. Finalmente, la dispersión obtenida se liofiliza durante 24 horas, utilizando sacarosa al 3% como crioprotector (Flexi-Dry MP™, FTS® Systems, EE. UU.) (Figura 33).

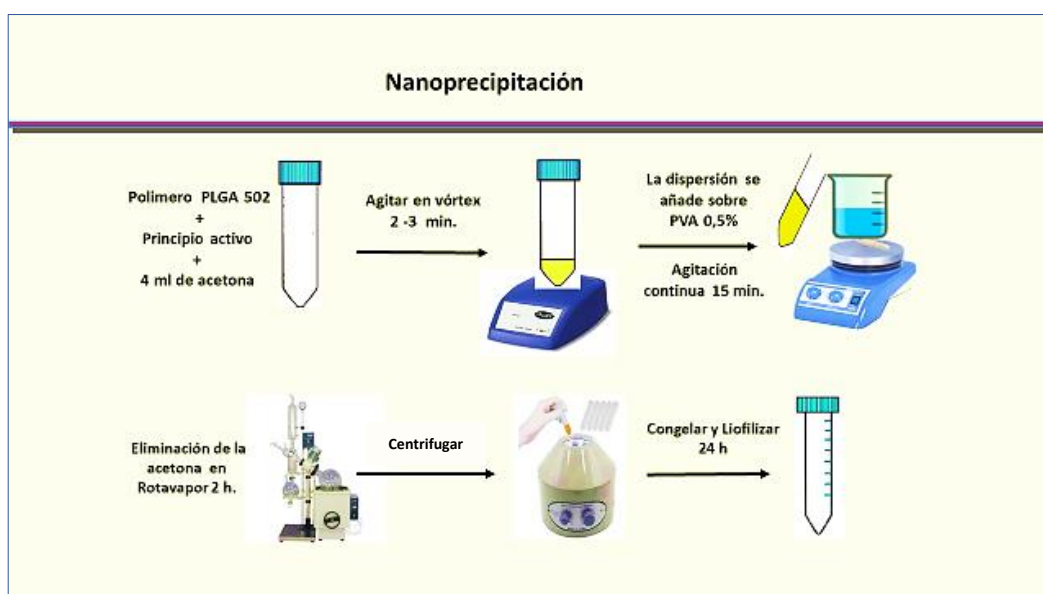


Figura 33. Método de elaboración de las nanopartículas de TC por la técnica de nanoprecipitación. TC: tolcapona.

3. CARACTERIZACIÓN DE LAS MICROPARTÍCULAS Y NANOPARTÍCULAS DE TOLCAPONA

3.1. Caracterización morfológica y distribución del tamaño de partícula

La morfología de los MPs y NPs se ha analizado mediante microscopía electrónica de barrido de emisión (SEM) (JEOL JEM 6335F, Jeol Ltd., Japón). Para ello, las muestras se recubrieron con una fina capa de oro coloidal aplicada en un evaporador de vacío catódico antes de la observación por SEM a 20 KV.

El diámetro medio y la distribución del tamaño de las partículas (MPs, NPs) se determinó a 25°C mediante difracción láser utilizando un analizador de tamaño de partículas Microtrac-S3500 (Microtrac S3500, Microtrac Inc., EE. UU.). Las muestras liofilizadas se suspendieron en agua Milli-Q y se sonicaron durante 30 segundos antes de cada determinación para evitar la formación de aglomerados. Los resultados se expresan como diámetros medios y sus correspondientes desviaciones estándar (\pm DE) (Tabla 7).

Alteraciones en la metodología de elaboración de los sistemas micro y nanoparticulados pueden dar lugar a cambios en el tamaño final de las partículas. Para evaluar si la técnica empleada es adecuada conviene determinar la dispersión de la distribución de tamaños de las formulaciones, por ello se calcula el valor de span y el índice de polidispersión (IP).

Para calcular los valores de span de cada una de las distribuciones obtenidas se ha empleado la siguiente ecuación:

$$\text{Span} = (\text{Percentil 90} - \text{Percentil 10}) / (\text{Percentil 50})$$

Valores de span elevados indican una distribución heterogénea; un valor de span se considera adecuado cuando es inferior a 1, lo que significa que la población es monodispersa.

El IP nos indica la anchura y distribución de tamaños moleculares, y es la relación entre el promedio en peso y en número. Para el cálculo del IP se emplea la siguiente ecuación:

$$\text{IP} = \text{SD} / (\text{Tamaño medio})$$

Valores de IP comprendidos entre 0,1-0,5 indican una población monodispersa, mientras que valores superiores a 0,7 reflejan una amplia distribución de tamaños y, por tanto, una muestra polidispersa.

3.2. Determinación del rendimiento del proceso y la eficacia de encapsulación

La determinación del rendimiento del proceso (%) se realizó a partir de la relación entre el peso total de las MPs o NPs obtenidos y el peso total del ingrediente activo (TC) y de polímero utilizado.

El rendimiento del proceso se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento \%} = \frac{\text{mg MPs o NPs obtenidas}}{(\text{mg ingrediente activo} + \text{mg polímero utilizado en la preparación})} \times 100$$

La eficacia de encapsulación (EE%) se calcula a partir de la relación entre la cantidad de TC que realmente ha sido encapsulada en las MPs o NPs y la cantidad de fármaco utilizado en su preparación, mediante la siguiente ecuación:

$$\text{EE (\%)} = \frac{(\text{cantidad de TC encapsulada en las MPs o NPs (mg)})}{(\text{cantidad inicial de TC utilizada en la preparación de MPs o NPs (mg)})} \times 100$$

El rendimiento de encapsulación también se puede expresar como mg de ingrediente activo/100 mg de MPs o NPs.

Para determinar la cantidad de TC incorporada a las MPs o NPs se procede de la siguiente manera: se pesan 10 mg de MPs o NPs, a las que se añade 1 ml de DCM para romperlas y posteriormente, 16 ml de etanol para lograr la completa precipitación del polímero.

A continuación, la muestra se centrifuga (Universal 32, Hettich, Alemania) a 3.000 rpm durante 5 minutos, el sobrenadante se extrae y se filtra a través de un filtro de tamaño de poro de 0,45 µm. Las muestras se analizan mediante HPLC.

3.2.1. Cuantificación de la tolcapona por HPLC

Para la cuantificación de TC se utilizó la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) previamente descrita por Heizmann et al. (Heizmann *et al.*, 1999) adaptada a nuestras condiciones experimentales. Para ello, se utilizó un cromatógrafo HPLC Waters con una bomba modelo 510, un detector UV modelo 1490 E, un muestreador automático 717 y un software Empower Login HPLC System Manager (Waters, EE. UU.). Se utilizó una columna Mediterranean C18 (5 μm , 250 mm x 4 mm) (Teknokroma S. Coop., Barcelona, España). La fase móvil utilizada está constituida por tampón fosfato: acetonitrilo (30:70, v/v). El tampón de fosfato (0,05 M) se preparó a partir de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) ajustado a pH 2 con ácido fosfórico. La fase móvil antes del uso se pasa a través de filtros de membrana de nylon de 0,45 μm y se desgasifica. La fase móvil se impulsó a un flujo constante de 1 ml/min y el volumen de inyección ha sido de 20 μL . Para el análisis se utilizó una longitud de onda de 268 nm y la sensibilidad se ajustó a 0,250 aufs. Todos los análisis se realizaron a $25,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

El método fue lineal dentro del rango de concentraciones 0,5-20 $\mu\text{g/mL}$, con límite de detección de 0,12 $\mu\text{g/mL}$ y límite de cuantificación 0,36 $\mu\text{g/mL}$. Mediante la utilización de este método no se observaron interferencia entre la TC y el polímero PLGA.

3.3. Determinación del potencial Zeta

El potencial zeta de las NPs se determinó utilizando un anemómetro láser-Doppler Malvern Zetasizer (Malvern Instruments, EE.UU.). Las determinaciones se realizaron suspendiendo las NPs en un medio acuoso a 25°C . El voltaje efectivo utilizado fue de 150 V.

Para las determinaciones del potencial zeta se pesaron 5 mg de cada formulación, se colocaron en un matraz, se diluyeron con 50 mL de agua destilada y se mantuvieron en un sonicador durante 5 min.

Posteriormente, las muestras se introdujeron en una celda capilar (Cell Enhances Capillary®, Malvern Instruments, EE.UU.). El potencial zeta se determinó en las formulaciones de NPs seleccionada.

3.4. Estudios de cesión de Tolcapona *in vitro*

Se han realizado estudios de cesión *in vitro* de la TC a partir de las formulaciones de MPs y NPs seleccionadas. Para ello, se suspendieron una cantidad de MPs o NPs (20 mg) en 3 ml en tampón fosfato salino (PBS) a pH 7,4 y lauril sulfato sódico (LSS) al 1%, con el fin de mantener las condiciones *sink*.

Las muestras se introducen en un baño de agua termostatzado (Memmert, Alemania) a $37\pm 0,2^{\circ}\text{C}$ y bajo agitación constante (100 golpes/min). A intervalos de tiempo predeterminados se extrajo todo el volumen de sobrenadante, se filtró a través de filtros de con tamaño de poro de $0,45\ \mu\text{m}$ y se reemplazó con el mismo volumen de medio fresco.

Los estudios de cesión se prolongaron durante 40 días para las MPs y 34 días para las NPs. La cuantificación de TC liberada a los distintos tiempos se realizó mediante espectototometría a una longitud de onda de 266 nm. Los estudios de liberación *in vitro* se realizaron por cuadruplicado.

El método de espectrofotometría ha sido puesto a punto y validado por nuestro grupo de investigación, siendo lineal dentro del rango de concentración $0,5\text{-}18\ \mu\text{g/mL}$ ($r = 0,9996$), con límite de detección de $0,26\ \mu\text{g/mL}$ y límite de cuantificación $0,43\ \mu\text{g/mL}$.

Mediante la utilización de este método no se observaron interferencias entre la TC y el polímero PLGA 502. Por lo que puede ser empleado para la cuantificación de TC liberada a partir de las micro y nanopartículas en los estudios de cesión *in vitro*.

4. RESULTADOS OBTENIDOS EN EL DESARROLLO DE SISTEMAS MULTIPARTICULARES DE TOLCAPONA: SELECCIÓN DE LAS FORMULACIONES

En este trabajo se han elaborado dos nuevos sistemas biodegradables de liberación controlada de TC (MPs y NPs de PLGA). PLGA es un copolímero de ácido poliláctico (PLA) y ácido poliglicólico (PGA), siendo el polímero más popular entre los disponibles debido a su biocompatibilidad y biodegradabilidad, utilización en clínica, características de degradación favorables y su capacidad para ser utilizado en sistemas de liberación controlada de fármacos. Es un polímero aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) (Makadia *et al.*, 2011) y la Agencia Europea del Medicamento (EMA) para su uso en productos farmacéuticos administrados a humanos por vía oral y parenteral (Yun-Seok *et al.*, 2010) y en suspensión (Freiberg y Zhu, 2004).

En una primera etapa, se han preparado diferentes formulaciones de MPs de PLGA cargadas con TC. Las cantidades de TC empleada en la preparación de las MPs osciló entre 70 y 120 mg (Tabla 7; formulaciones de MP-TC1 a MP-TC4).

Los valores medios del rendimiento del proceso para todas las MPs de PLGA cargadas con TC variaron de $62,33 \pm 15,10\%$ a $87,69 \pm 7,04\%$ (Tabla 7). La eficacia de encapsulación aumentó a medida que la cantidad de TC aumentó de 70 a 120 mg. El valor más elevado se obtuvo con la formulación elaborada con 120 mg de TC ($85,13 \pm 2,08\%$) (Tabla 7). En el desarrollo de MPs es deseable obtener una elevada capacidad de carga del fármaco, lo que permitirá reducir la cantidad de MPs y de polímero a administrar.

Todas las MPs elaboradas presentaron diámetros medios bajos, inferiores a 40 μm (Tabla 7). El tamaño medio de las partículas resultó ser menor en aquellas MPs preparadas con una mayor relación ingrediente activo: polímero (formulaciones MP-TC3 and MP-TC4).

En nuestro caso, y de acuerdo con los resultados obtenidos, hemos seleccionado la formulación MP-TC4 para continuar el estudio, ya que es la formulación que presenta valores más elevados de eficacia de encapsulación y un tamaño de partícula adecuado. La figura 34 muestra, a modo de ejemplo, una microfotografía del lote 2 de la formulación MP-TC4 y su correspondiente distribución de tamaño de partícula.

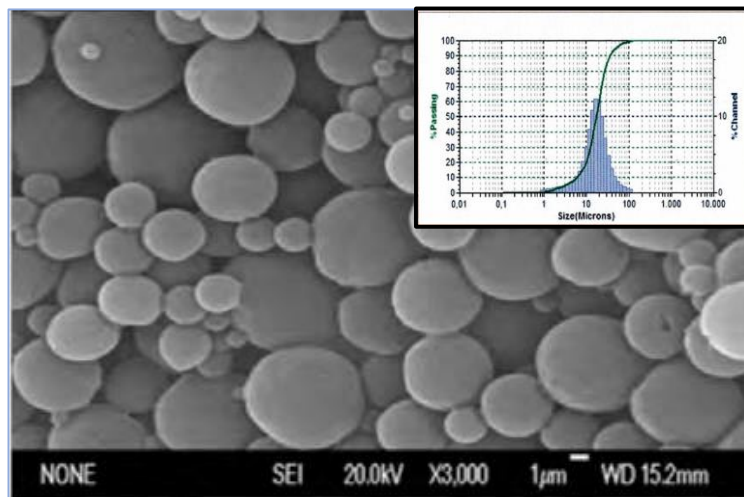


Figura 34. Microfotografía obtenida por SEM para el lote 2 de la formulación MP-TC4.

Se han preparado también, diferentes formulaciones de NPs de PLGA cargadas con TC, utilizando para su elaboración distintas cantidades del ingrediente activo: 6 a 12 mg (Tabla 7, formulaciones NP-TC1 a NP-TC4).

La eficacia media de encapsulación para las diferentes formulaciones elaboradas osciló entre un 46,16% y un 56,16%. La cantidad de TC incorporada por 10 mg de MPs aumenta a medida que lo hace la cantidad de TC (6 a 10 mg). Sin embargo, este aumento no se observó cuando se utilizó 12 mg. En este caso dicha cantidad fue similar a la obtenida cuando se utilizan 10 mg en la preparación de las NPs (0,88 mg/10 mg de NPs vs 0,89 mg/10 mg de NPs). Tal como se ha indicado previamente, es deseable la obtención de una elevada incorporación del ingrediente activo en las NPs para minimizar la cantidad de NPs y polímero a administrar.

El tamaño de las partículas y la distribución del tamaño son una de las características más importantes de las NPs, ya que condicionan su distribución *in vivo* y su toxicidad. Además, pueden influir en la carga del fármaco, así como en sus perfiles de liberación y en su estabilidad.

Los diámetros medios de las NPs medidos por la dispersión dinámica de la luz obtenidos fueron del orden de los 200 nm (Tabla 7), por lo que resultan adecuados para mejorar el acceso del nanosistema al cerebro. Diversos estudios han demostrado que las NPs poliméricas elaboradas con polímeros biodegradables como PLGA, y con tamaños de partícula de alrededor de 250 nm, son capaces de llegar a diferentes áreas del cerebro (Hillaireau y Couvreur, 2009; Suchlfart *et al.*, 2012).

Para todas las formulaciones desarrolladas, el índice de polidispersidad fue inferior a 0,5 y el valor de span inferior a 0,7, lo que indica poblaciones homogéneas del tamaño de las partículas (Tabla 7) (Marcianes *et al.*, 2017). La figura 35 muestra, a modo de ejemplo, una microfotografía del lote 3 de la formulación NP-TC3, junto con su correspondiente distribución del tamaño de las partículas. Teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos, se ha seleccionado la formulación NP-TC3 para continuar el estudio.

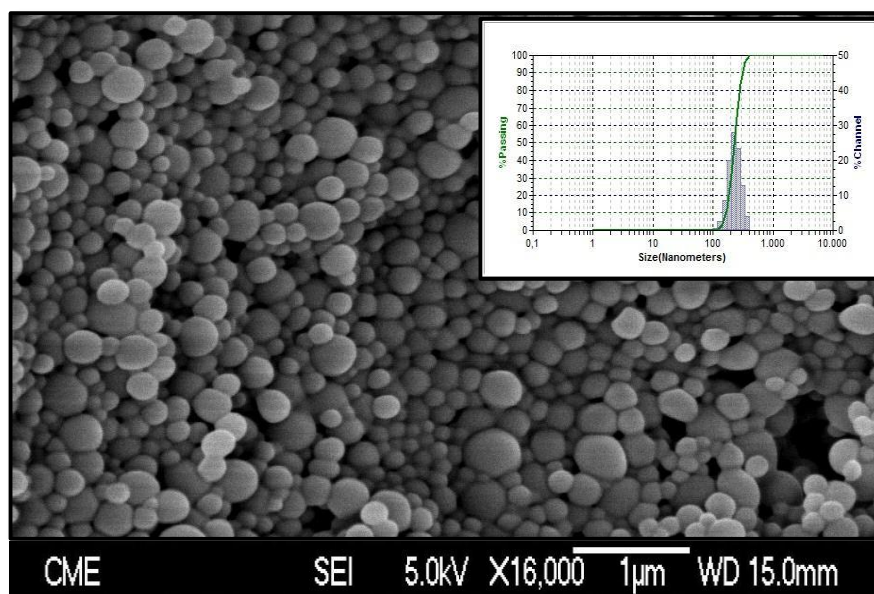


Figura 35. Microfotografías obtenidas por SEM para el lote 2 de la formulación NP-TC3.

En las tablas 8 y 9 se muestran los porcentajes cedidos acumulados de TC para las formulaciones seleccionadas cargadas con TC (MP-TC4 y NP-TC3).

Tiempo (días)	% Cedido Exp. 1	% Cedido Exp. 2	% Cedido Exp. 3	% Cedido Exp. 4	% Cedido Media \pm DE
0,042	15,10	14,07	15,45	13,23	14,46 \pm 1,01
1	20,57	21,71	19,01	17,46	19,69 \pm 1,85
3	24,29	24,61	24,01	23,14	24,01 \pm 0,63
6	32,62	29,63	30,27	30,01	30,63 \pm 1,35
9	36,18	38,64	35,81	35,16	36,45 \pm 1,52
12	44,91	43,33	43,00	43,49	43,68 \pm 0,84
15	64,58	63,52	63,26	62,93	63,57 \pm 0,71
18	70,97	73,12	71,18	70,46	71,43 \pm 1,17
21	78,85	80,92	76,58	75,23	77,89 \pm 2,51
24	82,24	85,89	80,61	79,67	82,10 \pm 2,74
27	90,36	91,25	91,65	85,81	89,77 \pm 2,69
30	97,87	98,09	95,43	90,56	95,49 \pm 3,50
33	99,00	99,83	98,17	97,17	98,54 \pm 1,14
36	99,85	99,76	98,49	99,24	99,34 \pm 0,62
39	99,96	99,97	99,03	99,72	99,67 \pm 0,44
42	99,98	100,00	99,66	99,99	99,91 \pm 0,54

Tabla 8. Porcentajes cedidos individuales acumulados ($n=4$) y valores medios \pm DE de TC para la formulación MP-TC4.

Tiempo (días)	% Cedido Exp. 1	% Cedido Exp. 2	% Cedido Exp. 3	% Cedido Exp. 4	% Cedido Media \pm DE
0,042	17,14	17,60	16,90	17,1	17,19 \pm 0,3
1	45,9	46,62	46,12	46,69	46,33 \pm 0,38
3	58,12	59,04	58,68	58,48	58,58 \pm 0,38
5	72,31	72,86	72,15	72,14	72,37 \pm 0,34
7	77,7	78,17	77,35	77,29	77,63 \pm 0,4
9	84,01	84,38	83,35	83,61	83,84 \pm 0,45
11	87,19	87,7	86,46	86,66	87,00 \pm 0,56
13	90,62	91,03	89,92	90,13	90,43 \pm 0,5
15	92,71	93,23	91,94	93,21	92,77 \pm 0,6
17	94,21	94,73	93,42	94,17	94,13 \pm 0,54
19	95,35	95,93	94,84	95,35	95,37 \pm 0,45
21	96,44	97,01	95,97	96,51	96,48 \pm 0,43
23	97,46	98,04	97,06	97,44	97,50 \pm 0,4
25	98,38	98,92	97,98	98,21	98,37 \pm 0,32
27	99,18	99,56	98,74	98,90	99,10 \pm 0,32

Tabla 9. Porcentajes cedidos individuales acumulados ($n=4$) y valores medios \pm DE de TC para la formulación NP-TC3.

La figura 36 recoge los perfiles de liberación de la TC obtenidos en los estudios de cesión para la formulación MP-TC4. Para estas MPs de PLGA, la liberación del fármaco encapsulado se produce a través de la difusión y/o la erosión del biopolímero PLGA. La velocidad de difusión depende del coeficiente de difusión del fármaco en el medio y del coeficiente de reparto del fármaco y los medios que debe atravesar (Kamaly *et al*, 2016). Además, la formación de poros en la superficie de las partículas conduce a una liberación más rápida del ingrediente activo, al favorecerse la erosión de la superficie de las MPs (Park *et al.*, 1992).

En nuestro caso, y para las formulaciones de micropartículas desarrolladas, la liberación inicial o burst fue baja, de alrededor el 15% en la primera hora. Una liberación inicial alta a menudo no es deseable, ya que podría suponer la aparición de efectos no deseados como consecuencia de toxicidad local causada por una alta concentración de fármaco liberada rápidamente. Además, esta elevada cesión inicial podría suponer la necesidad de acortar los intervalos de dosificación, con sus inconvenientes.

La liberación inicial está condicionada por diferentes parámetros físicos-químicos relacionados con el fármaco, con la formulación, así como con el proceso de obtención del sistema multiparticular (Huang y Brazel, 2001). Así, la migración del fármaco durante el proceso de secado de las partículas puede crear una distribución heterogénea del fármaco, favoreciendo su liberación a tiempos cortos. En nuestro caso, la liberación inicial fue seguida por una liberación más lenta, durante aproximadamente 12 días. Durante este tiempo, el fármaco (TC) se liberó de acuerdo con una cinética de orden cero, alcanzándose una cesión del 45%. Alrededor del día 15 se observó una rápida liberación debido a la erosión del polímero.

Posteriormente, el fármaco se liberó hasta el día 30 prácticamente con cinética de orden cero. A dicho tiempo, el porcentaje liberado de TC fue de aproximadamente el 90%. La lenta liberación de la TC a partir de las MPs podría deberse a las características hidrofóbicas de la matriz polimérica que dificultaría la difusión de agua al interior de las partículas, reduciendo así la velocidad de degradación del polímero (Klose *et al.*, 2008).

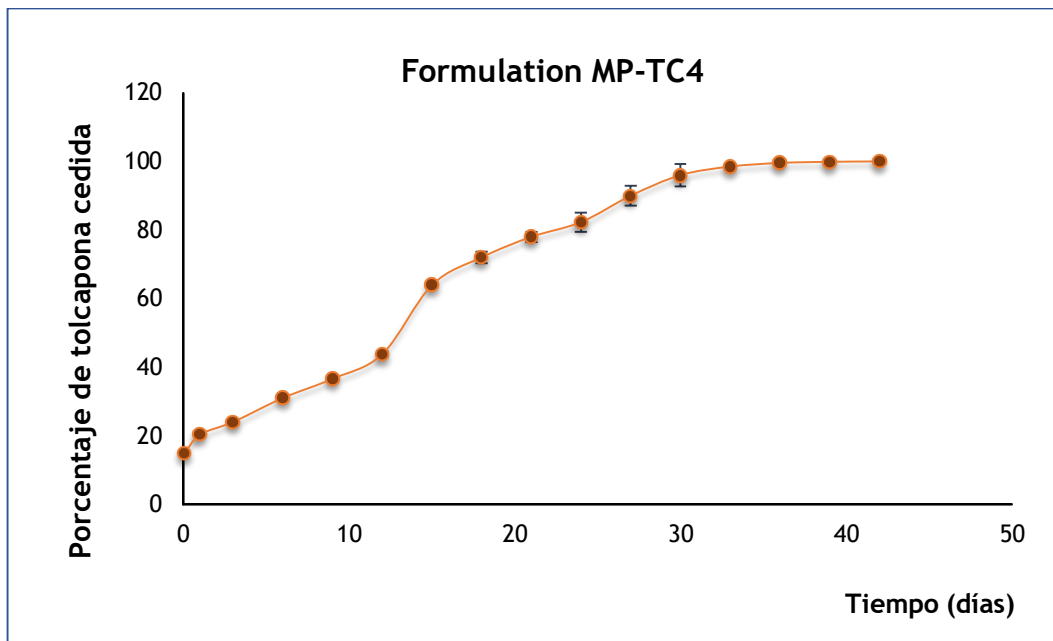


Figura 36. *Perfiles medios de liberación de la tolcapona ($\pm DE$) a partir de la formulación MP-TC4.*

La figura 37 muestra los perfiles medios de liberación de la TC obtenidos en los ensayos de cesión de la formulación de NPs seleccionadas (NP-TC3). La liberación del fármaco también se ve afectada por el tamaño de las partículas.

Las partículas más pequeñas, como las NPs, tienen una relación superficie-volumen mayor que las MPs; por lo tanto, la mayor parte del fármaco asociado con partículas pequeñas estaría cerca de la superficie de la partícula, lo que conduciría a una liberación más rápida del fármaco. En nuestro caso, se obtiene una liberación inicial (efecto burst) del orden del 20% dentro de las primeras 24 h, seguida de una liberación de acuerdo a una cinética de orden cero durante los siguientes 10 días, con una constante media de liberación de orden cero de $4,13 \pm 0,17 \mu\text{g} / \text{h} / 10 \text{ mg NPs}$. A dicho tiempo se ha liberado aproximadamente el 83%.

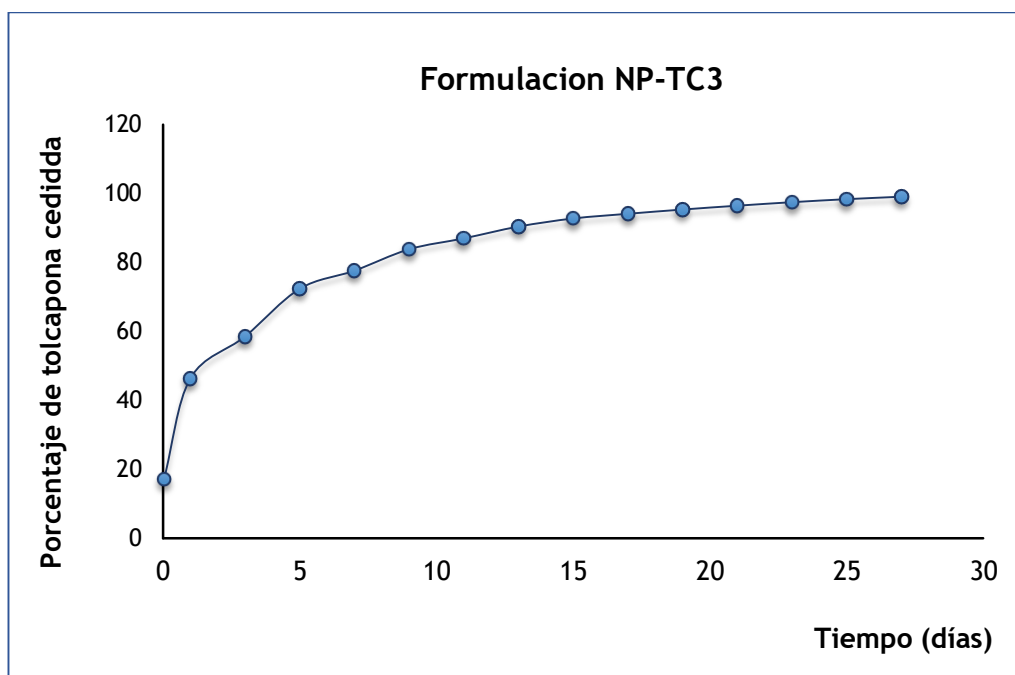



Figura 37. Perfiles medios de liberación de la tolcapona ($\pm DE$) a partir de la formulación NP-TC3.

El potencial zeta de una nanopartícula es de gran interés debido a que caracteriza sus propiedades de carga superficial. Refleja el potencial eléctrico de las partículas y depende de la composición de la partícula y del medio en el que se dispersa. Se ha demostrado que NPs con un potencial zeta comprendido entre +30 mV y -30 mV son estables en suspensión ya que se evita su agregación (Singh y Lillard, 2009; Velasco-Rodríguez *et al.*, 2012). Además, el potencial zeta de las NPs condiciona su paso a través del BHE. Las NPs con carga positiva pueden interactuar con las superficies de las células cargadas negativamente, lo que representa una ventaja, aunque provoca una respuesta inmune más fuerte. Por otro lado, las partículas cargadas negativamente a bajas concentraciones no alteran la BHE (Lockman *et al.*, 2004). En nuestro caso, el valor del potencial zeta para la formulación seleccionada (NP-TC3) fue negativo de $-26,32 \pm 0,48$ mV debido probablemente a la ionización de los grupos carboxílicos del PLGA, que confieren una carga negativa en la superficie. De hecho, se ha indicado que NPs preparadas con PLGA 502 presentan un potencial zeta negativo del orden de -33 mv (Fonseca *et al.*, 2002). Dicho valor asciende al cargar las nanopartículas con TC, debido probablemente a la modificación de la superficie como consecuencia de la de incorporación del fármaco.



**VI. ELECCIÓN DEL MODELO ANIMAL DE
PARKINSON PARA EVALUAR LAS
FORMULACIONES SELECCIONADAS
(MP-TC3 Y NP-TC4)**

1. MODELOS ANIMALES UTILIZADOS EN LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

Actualmente se utilizan diversos modelos animales de EP para ayudar a comprender la patogénesis de este trastorno neurodegenerativo, así como para evaluar el potencial de nuevos tratamientos desarrollados para la enfermedad (Wang *et al.*, 2012; Negro *et al.*, 2016, Barcia *et al.*, 2017; Hernández-Baltazar *et al.*, 2017, Nistico *et al.*, 2011). Por ello, y con el fin de seleccionar el modelo más adecuado para evaluar las formulaciones seleccionadas (MP-TC4 y NP-TC3), se ha realizado una revisión de los principales modelos experimentales de EP (Le *et al.*, 2014). Dentro de los agentes utilizados en los modelos animales de Parkinson se encuentra el uso de neurotoxinas y de plaguicidas (Cicchetti *et al.*, 2009; Bové *et al.*, 2011). En la revisión realizada se abordaron los modelos que utilizan estos agentes, y su relevancia para el estudio y conocimiento de la enfermedad de Parkinson, centrándonos en la aplicación de estos modelos experimentales en el desarrollo de sistemas de liberación controlada de administración de fármacos para el tratamiento de la EP. Los resultados de dicha revisión nos han permitido publicar un artículo titulado “Application of neurotoxin-and pesticide-induced animal models of Parkinson's disease in the evaluation of new drug delivery systems” en la revista *Acta Pharmaceutica* (Casanova *et al.*, 2022).

En el caso de la EP, un modelo animal ideal debe reproducir los signos clínicos y patológicos típicos de esta enfermedad, tales como la pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas, la aparición de inclusiones de cuerpos de Lewy (LB) en el cerebro, y la existencia de síntomas de movimiento capaces de revertirse con L-dopa (Uversky, 2004).

Las neurotoxinas que más se utilizan en los modelos animales de EP son la 6-OHDA y el MPTP (Blandini *et al.*, 2012). Estos agentes generalmente desarrollan una degeneración nigroestriatal sustancial, así como síntomas motores que se asemejan a los que ocurren en la EP humana. En el desarrollo y la evaluación de nuevos sistemas de administración de fármacos para la EP, la 6-OHDA es la más utilizada. Ejerce un daño selectivo, lo que facilita la evaluación, sin embargo, se tiene que inyectar intracerebralmente.

MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina) es otra neurotoxina de uso frecuente. A diferencia de la 6-OHDA, MPTP tiene la capacidad de cruzar la BHE facilitando así su administración. Su mecanismo de acción ha sido ampliamente estudiado, y el modelo MPTP en monos se considera el estándar de oro para pruebas preclínicas de nuevos enfoques terapéuticos

para la EP (Garbayo et al., 2016). Sin embargo, la falta de instalaciones y la experiencia de los investigadores con modelos realizados en monos es uno de sus principales inconvenientes.

En cuanto a los modelos animales de EP basados en plaguicidas, los agentes habitualmente empleados son la rotenona, el paraquat y el maneb. La rotenona (RT) en administración sistémica accede principalmente a estructuras mitocondriales, causando estrés oxidativo y apoptosis de las neuronas dopaminérgica del SNpc. Además, el modelo con rotenona puede causar la formación de inclusiones de α -sinucleína, así como déficits motores similares a los que ocurren en la EP. El modelo animal de RT es uno de los más utilizados para inducir síntomas parkinsonianos en animales de experimentación debido a las siguientes características:

- Reproduce la mayoría de los trastornos motores y las características histopatológicas de la EP, incluidos los cuerpos de Lewy y algunas afecciones asociadas con la acumulación de α -sinucleína (α -Syn) (Mulcahy *et al.*, 2011; Xiong *et al.*, 2013).
- La RT y otros pesticidas son potentes inhibidores mitocondriales y su uso se asocia a una alta incidencia de EP en humanos, principalmente en áreas rurales/ agrícolas.
- La RT es un compuesto lipofílico y, como tal, puede atravesar barreras biológicas sin usar de transportadores (Mulcahy *et al.*, 2011).

El paraquat también se cree que causa degeneración dopaminérgica al inducir estrés oxidativo, sin embargo, después de administración crónica, este agente no es capaz de producir depleción de dopamina en el cuerpo estriado o claros déficits motores.

La revisión bibliográfica realizada nos ha permitido concluir que, cuando se evalúan nuevos sistemas terapéuticos para el tratamiento del Parkinson, los modelos más utilizados son los que emplean 6-OHDA y RT. Si bien, ninguno de los modelos animales basados en el uso de neurotoxinas o de pesticidas es capaz de imitar exactamente las características neuropatológicas que ocurren en EP humano. Este hecho, unido a la experiencia de nuestro grupo investigador (Negro *et al.*, 2016, Barcia et al., 2017) nos llevó a la selección del modelo animal de Parkinson inducido con RT para continuar nuestros estudios.

A continuación, se incluye el artículo de revisión publicado, previamente descrito como parte de esta memoria experimental.

Application of neurotoxin- and pesticide-induced animal models of Parkinson's disease in the evaluation of new drug delivery systems

YAQUELYN CASANOVA
SOFIA NEGRO
EMILIA BARCIA*

Department of Pharmaceutics and Food
Technology, School of Pharmacy
Universidad Complutense de Madrid
Madrid, Spain

Parkinson's disease (PD) is the second most prevalent neurodegenerative disease after Alzheimer's disease. It is characterized by motor symptoms such as akinesia, bradykinesia, tremor, rigidity, and postural abnormalities, due to the loss of nigral dopaminergic neurons and a decrease in the dopamine contents of the caudate-putamen structures. To this date, there is no cure for the disease and available treatments are aimed at controlling the symptoms. Therefore, there is an unmet need for new treatments for PD. In the past decades, animal models of PD have been proven to be valuable tools in elucidating the nature of the pathogenic processes involved in the disease, and in designing new pharmacological approaches. Here, we review the use of neurotoxin-induced and pesticide-induced animal models of PD, specifically those induced by rotenone, paraquat, maneb, MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) and 6-OHDA (6-hydroxydopamine), and their application in the development of new drug delivery systems for PD.

Keywords: Parkinson's disease, rotenone, paraquat, maneb, MPTP, 6-OHDA, animal model, controlled drug delivery

Accepted January 13, 2021
Published online February 15, 2021

INTRODUCTION

Parkinson's disease (PD) is the second most prevalent neurodegenerative disorder after Alzheimer's disease. It is a chronic and progressive disease that mainly involves dopamine depletion in the central nervous system (CNS). It is characterized by the early death of dopaminergic neurons in the *substantia nigra pars compacta* (SNpc) and the accumulation of Lewy bodies, which are abnormal intracellular aggregates containing proteins, such as α -synuclein and ubiquitin (1, 2). This deficiency of dopamine in the basal ganglia causes movement disorders resulting in the typical symptoms of the disease, such as akinesia, bradykinesia, rigidity, resting tremor and postural abnormalities. Moreover, PD is also associated with several non-motor symptoms, such as olfactory dysfunction, cognitive impairment, psychiatric symptoms, sleep disorders, neurodegenerative dysfunction, pain and fatigue, among others (3).

* Correspondence; e-mail: ebarcia@ucm.es

Diagnosis of the disease is currently based on medical history, physical and neurological examination of the subject and the presence of certain symptoms. The latest advances in diagnosis (functional imaging, neuropsychological tests) can help the diagnosis based on a suspicion related to the clinical evaluation of the symptoms and signs present in the patient (4, 5). Currently, there are no biological markers that allow for a quick and accurate diagnosis of PD. For instance, the clinical criteria used by the UK Parkinson Disease Society Brain Bank, which are commonly used, have a diagnostic accuracy of only 80 % at the early stages of PD (6). Therefore, functional imaging is necessary to confirm the clinical diagnosis and understand the underlying pathophysiology. The definitive diagnosis is the presence of SNpc degeneration and Lewy pathology in the postmortem examination (7).

Treatment of PD is only symptomatic since there is no cure for the disease, with many of the drugs aiming to increase dopamine concentrations or directly stimulate dopamine receptors. The American Academy of Neurology recommends initiating one of the following available drug therapies once the patient has developed symptoms of functional disability (8). Since dopamine does not cross the blood-brain barrier BBB and direct infusion into the brain is not possible in human subjects, the clinical management of PD is usually performed by means of the administration of dopamine agonists, the dopamine precursor L-DOPA, catechol-*O*-methyltransferase (COMT) inhibitors and monoamine oxidase B (MAO-B) inhibitors, *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor inhibitors, anticholinergics, alone or in combination. Dopaminergic therapy is highly effective in bradykinesia and stiffness in which dopamine and levodopa agonists help reduce disease progression and disability. Tremor responds to anticholinergic drugs such as trihexyphenidyl, but with a poor and inconsistent response to dopamine replacement therapy (9, 10).

With the need for new drugs and more effective treatments, several models have been developed to mimic features resembling those of human PD in experimental animals, and in order to design and evaluate drug molecules that favor neuroprotection and decrease neuronal cell death as occurs in PD. In this work, we present a review of the main experimental models of PD based on the use of pesticides or neurotoxins, and their relevance for the study and knowledge of the disease, with a special focus on the application of these experimental models in the development of controlled drug delivery systems for the treatment of PD.

In recent years, new drug delivery systems are being developed to improve the efficacy of the pharmacological treatments of PD. In this regard, the design of controlled delivery systems is of great interest as they can maintain constant drug levels for prolonged periods of time, which allows reducing the frequency of administration and improve patient compliance, among other benefits. They can be either biodegradable or non-biodegradable depending upon the nature of the polymer or material used for their fabrication. Among controlled drug delivery systems, the hydrogels and polymeric or lipid microparticles (MPs) and nanoparticles (NPs) seem to be the most effective in providing neuroprotection and facilitating the delivery of drugs and small molecules to the brain. *E.g.*, lipid-based nanocarriers are very interesting for the development of nanosystems destined to reach the CNS after intranasal administration.

MODELS BASED ON PESTICIDES

Pesticides are substances of natural or synthetic origin used to exterminate, prevent, and control any unwanted pest or organism and can be classified as insecticides, herbicides and fungicides (11). In the late 1980s, several epidemiological studies found an increased

risk of developing PD in populations exposed to pesticides, herbicides and industrial compounds (12). A recent study performed by Belvisi *et al.* (13) indicated that in five out of eight studies reviewed (14–18) greater risk of developing PD was associated with such substances but in the other three studies (19–21) no significant association was found between occupational exposure to pesticides and PD. These opposite results could be explained by the cohort sizes and follow-up duration of the different studies which were not comparable. Therefore, correlations between agrochemical exposure in populations and increased risk of developing PD have been difficult to conclude due to a lack of details on exposure to particular agents. Nevertheless, the emphasis has been made on rotenone, paraquat and maneb, as possible environmental causes of PD.

Rotenone

Rotenone (RT) is an organic pesticide extracted from the roots of some tropical plants of the genera *Lonchocarpus* and *Derris*. Chemically it is the (2*R*,6*aS*,12*aS*)-1,2,6,6*a*,12,12*a*-hexahydro-2-isopropenyl-8,9-dimethoxychromeno[3,4-*b*]furo(2,3-*H*)chromen-6-one (Table I). Due to its high liposolubility, it can pass through biological barriers and cell membranes (22). RT was firstly used as a causative agent of PD in 1985 when Heikkilä *et al.* (23) injected this mitochondrial complex I inhibitor directly into the brain of rats. They demonstrated that at a concentration of 5 mmol L⁻¹, approximately five hundred thousand times greater than its maximal inhibitory concentration (CI₅₀), RT was able to eliminate dopaminergic neurons. This contribution opened a new field of research since PD was related to systemic mitochondrial defects. In this respect, various research groups began to work with the systemic administration of mitochondrial toxins such as rotenone to investigate PD. Ferrante *et al.* (24), reported that the administration of rotenone (10–18 mg kg⁻¹ per day) produced non-specific brain lesions and peripheral toxicity in rats. Betarbet *et al.* (25) demonstrated that the administration of RT (2–3 mg kg⁻¹ per day) to rats for 33 days caused selective nigrostriatal dopaminergic degeneration which could be associated behaviorally with hypokinesia and rigidity. They also found fibrillar cytoplasmic inclusions containing ubiquitin and α -synuclein proteins in nigral neurons of RT treated rats.

It was also reported that systemic administration of RT may reproduce other features of PD in experimental animal models such as the alterations of the retina, loss of testosterone and sleep disorders (26–28). Other studies performed in mice have demonstrated that the selective toxicity of RT can be related to inhibition of the NADH gene dehydrogenase ubiquinone proteins Fe-S4 (NDUFS4) which encode the mitochondrial complex I which is inhibited by RT. Other underlying mechanisms have also been reported for RT, such as depolymerization of microtubules and accumulation of reactive oxygen species (ROS) in mesencephalon cultures (29).

In summary, the RT model is one of the most frequently used models for inducing parkinsonian symptoms in experimental animals due to the following characteristics:

(i) RT model reproduces most of the motor disorders and histopathological features of PD, including Lewy bodies and some conditions associated with α -synuclein (α -Syn) accumulation (30, 22),

(ii) RT and other pesticides are potent mitochondrial inhibitors associated with a high incidence of sporadic PD in humans mainly in rural/agricultural areas,

(iii) RT is a lipophilic compound and, as such, can pass through biological barriers without relying on transporters (22).

However, RT has some drawbacks such as high photoreactivity and systemic (cardiovascular) toxicity which leads to significant mortality rates (~30 % of the animals), regardless of the administration route (25). This toxicity makes it necessary to use a large number of animals to assure the statistical significance of the results obtained when performing behavioral, biochemical and histological analysis. Moreover, due to its low water solubility selection of the appropriate vehicle and the administration route is more complex (31). Another drawback, as indicated previously, is that RT also causes non-PD-related symptoms such as cardiovascular effects (32).

RT is usually dissolved in polar vehicles with the incorporation of surfactant agents such as carboxymethyl cellulose (CMC) or naturally occurring oils (sunflower, castor oil). The incorporation of dimethylsulfoxide (DMSO) can minimize the use of surfactants or even prevent it (33). Regarding the route of administration, RT can be given either subcutaneously, intraperitoneally, orally or intracerebrally with the selection of the dose depending on the administration route and the type of treatment chosen (acute or chronic) (34).

Controlled-release systems using the rotenone model. – Some of the new controlled-release systems have been recently evaluated in RT-induced animal models of PD. For example, rasagiline mesylate (RM) is a potent, selective and non-reversible MAO-B inhibitor that exhibits neuroprotective effects and it's currently used as monotherapy in early PD. However, due to its short elimination half-life (1.5–3.5 h), RM must be given orally in daily doses. Kanwar *et al.* (35) encapsulated RM in polycaprolactone microspheres (MPs) in order to expand the dosing intervals, taking into consideration that patients with PD develop dysphagia, *i.e.* difficulty in swallowing. The new formulation was evaluated in Sprague-Dawley rats after stereotaxic administration of RT [6 mg in 2 mL DMSO:PEG (1:1)]. The administration of the RM-loaded formulation improved several behavioral (locomotor activity, grip strength) and biochemical (lipid peroxidation, reduced glutathione, *etc.*) parameters. Non-significant differences were found between the daily administration of RM in solution and the polymeric MPs given once a month, which makes this approach very interesting for treating PD patients with dysphagia. Fernandez *et al.* (36) also developed a new formulation consisting of RM-loaded MPs using poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA) as a biodegradable polymer. The system was assayed in the RT model of PD induced in Wistar rats. Daily *i.p.* doses of RT (2 mg kg⁻¹) induced neuronal and behavioral changes similar to those occurring in PD. Once an advanced stage of PD was achieved, animals received RM in saline (1 mg kg⁻¹ per day) or encapsulated within PLGA MPs (amount of microspheres equivalent to 15 mg kg⁻¹ RM given on days 15 and 30). After 45 days, RM showed a robust effect on all analytical outcomes (brain histology, immunochimistry, behavioral testing) with non-statistically significant differences found between the administration of RM in solution or encapsulated within polymeric MPs.

Many of the experimental applications of the RT model found in the literature are related to the evaluation of dopaminergic agonists, a therapeutic strategy to provide continuous dopamine (DA) receptor stimulation. Most DA agonists show low bioavailability due to extensive first-pass metabolisms after oral administration, thereby implying the need for the daily administration of various doses. This fact makes them good candidates for the development of controlled delivery systems. With this aim, Barcia *et al.* (37) developed ropinirole (RP) PLGA nanoparticles (NPs) to improve the access of RP to the CNS. The RT model was induced in Wistar rats at a dose of 2 mg kg⁻¹ per day given *i.p.* Once

neurodegeneration was established (15 days), animals received RP in saline (1 mg kg^{-1} per day for 35 days) or RP-loaded PLGA NPs (amount of NPs equivalent to 1 mg kg^{-1} per day, every 3 days for 35 days). Brain histology and immunochemistry Nissl-staining, glial fibrillary acidic protein (GFAP) and tyrosine hydroxylase (TH) immunohistochemistry, and behavioral testing (catalepsy, akinesia, rotarod and swim test) showed that RP NPs were able to revert PD like symptoms of neurodegeneration in the RT-induced model.

Negro *et al.* (38) developed RP-loaded PLGA MPs and assayed the formulation in the RT model induced in Wistar rats. After 15 days of daily *i.p.* doses of RT (2 mg kg^{-1}), animals received RP in saline (1 mg kg^{-1} per day for 45 days) or RP-loaded PLGA MPs at two dose levels (amount of MPs equivalent to 7.5 or 15 mg kg^{-1} RP given on days 15 and 30). All the outcomes analyzed (brain histology, immunochemistry, and behavioral testing) showed that animals receiving RP either daily in solution or every two weeks encapsulated within the MPs reverted the PD symptoms, with the best results obtained in animals receiving the RP microspheres at the highest dose level.

Patel *et al.* (39) have developed nanocarriers (microemulsions, ME) of RP for transdermal application which are considered highly efficient as colloidal soft nanocarriers in dermal and transdermal drug delivery systems. In this study and in order to achieve sustained and controlled permeation of RP through the skin, ME was converted into a ME-based gel (MEG) using a biocompatible gelling agent. The system was assayed in Sprague-Dawley rats after *s.c.* administration of RT (2 mg kg^{-1} per day) for 11 days. Chronic administration of RT caused the destruction of dopaminergic neurons resulting in motor dysfunctions (rigidity, slower movement, and inability to move). Administration of the MEG developed for RP (2.16 mg kg^{-1} per day *via* transdermal route) improved the motor function by 76 %, whereas the marketed tablet suspension of RP (2.16 mg kg^{-1} per day *via* oral route) showed only 5 % restoration of the normal function. Moreover, the new transdermal delivery system successfully restored the catalase and superoxide dismutase levels which were significantly reduced by RT administration.

Resveratrol (RSV) has recently drawn attention since it is considered a red wine-derived polyphenol with cardioprotective and neuroprotective effects. In this regard, Palle and Neerati (40) developed RSV-loaded nanoparticles (NPs) by temperature-controlled antisolvent precipitation. The new therapeutic system was evaluated for its neuroprotective effects in the RT-induced model in Wistar rats. For this, the administration of RT (2 mg kg^{-1} , *s.c.*) for 35 days produced motor deficits, decreased rearing behavior, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress in the animals. Oral administration for 35 days of RSV-loaded NPs (40 mg kg^{-1}) 30 min before the administration of RT showed better efficacy than the oral administration of RSV in solution (40 mg kg^{-1}) in attenuating the RT-induced behavioral, biochemical and histological alterations observed in the animals.

Accumulation of α -Syn protein, mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and neuronal cell death are among the main pathological hallmarks of PD. In this regard, the combination of piperine and curcumin may have potential interest due to their beneficial cognitive and antioxidant properties. However, the access of drugs to the brain is limited by the BBB. To overcome this passage, Kundu *et al.* (41), designed a new delivery system consisting of dual drug curcumin and piperine co-loaded glyceryl monooleate NPs (CPNPs) coated with various surfactants to improve their passage to the brain. The new system was evaluated in the RT-induced mouse model of PD after oral administration of RT (30 mg kg^{-1}) for 28 days. CPNPs were given orally at an equivalent dose of 200 mg kg^{-1}

every alternate day, 30 min before the administration of RT. The results obtained showed that the new formulation was able to cross the BBB, rescue the RT-induced motor coordination impairment, and restrained dopaminergic neuronal degeneration in the PD animal model.

The sapogenin (camelliagenin) isolated from *Camellia oleifera* seeds has demonstrated antioxidative, anti-inflammatory and analgesic activities which could be related to its neuroprotective effects. In this regard, Yang *et al.* (42) synthesized iron-sapogenin NPs. The neuroprotective effects of the formulation were evaluated in RT-induced neurodegeneration in Kunming mice injected *s.c.* with RT (50 mg kg⁻¹ per day) for 6 weeks and treated by *i.v.* injection of the iron-sapogenin complex at three dose levels (25, 50 and 100 mg kg⁻¹ for 7 days). Behavioral disorders were attenuated by the delivery system and increased superoxide dismutase activity, tyrosine hydroxylase expression, dopamine and acetylcholine levels in the brain were increased in a dose-dependent manner. Iron-sapogenin NPs showed significantly better effects than the sapogenin alone.

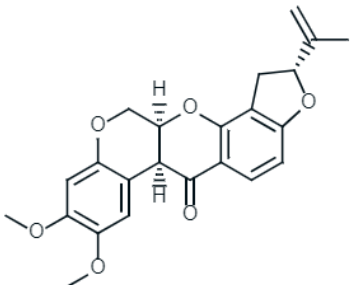
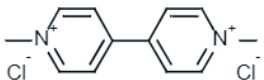
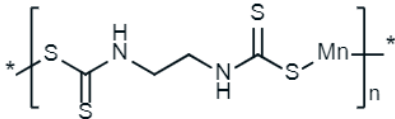
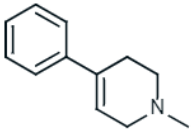
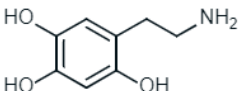
The occurrence of ocular manifestations in many neurodegenerative diseases, including PD, emphasizes the strong connection between the brain and the retina. PD patients often suffer from visual symptoms such as reduced visual acuity, low contrast sensitivity, and disturbed color vision. Normando *et al.* (43) used the RT-induced rodent model of PD to investigate retinal manifestations in PD. In this study, RT was injected *i.p.* to Dark Agouti rats at a dose of 2.5 mg kg⁻¹ per day for 60 days. The retinal evaluation was assessed by optical coherence tomography (OCT), and by longitudinal *in vivo* imaging with detection of apoptosing retinal cells (DARC). The results obtained showed increased apoptosis of retinal ganglion cells with a transient swelling of the retinal layers after 20 days of initiating RT. By day 60, histological neurodegenerative changes in the *substantia nigra* and *striatum* were observed suggesting that retinal changes precede the “traditional” pathological manifestations of PD. The efficacy of a novel rosiglitazone (RG) liposomal formulation was evaluated in this PD model. For this, RT was administered for 10 days, followed by a single *i.p.* injection of liposome-encapsulated rosiglitazone (1 or 1.4 mL kg⁻¹). Administration of this new liposomal formulation resulted in greater neuroprotective effects both in the retina (day 20) and brain (day 60) than daily administration of the free drug. Moreover, DARC and OCT measures in the retina were good predictors of therapeutic efficacy in the brain.

Paraquat

Paraquat (PQ) (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridyl dichloride) is a quaternary nitrogen herbicide (Table I) frequently used in agriculture for broadleaf weed control due to its low cost, rapid action and a broad spectrum of activity (44). It was first introduced to the market in the '60s; however, its use is currently banned in many countries, including the 27 countries of the European Union, due to its toxicity on plants, animals and humans.

A study performed in 1985 by Barbeau *et al.* (45) showed that PQ caused a significant reduction in dopamine concentrations resulting in behavioral changes similar to those induced by MPP⁺ (1-methyl-4-phenylpyridinium). The pathophysiological mechanism of PQ resembles that of the MPP⁺ cation since PQ as a divalent cation (PQ²⁺) can undergo the redox pathway in microglia, resulting in a monovalent cation (PQ⁺) accompanied by the production of superoxide that results in oxidative stress and cytotoxicity. PQ⁺ is also

Table I. Chemical structure and mechanism of action of pesticides and neurotoxins used in animal models of Parkinson's disease

Model	Chemical structure	Mechanism of action
Rotenone		Inhibition of NADPH and mitochondrial complex I
Paraquat		ASK1 kinase activation triggers neuronal DA apoptosis
Maneb		Inhibition of glutamate transport and disruption of DA absorption and release
MPTP		Formation of free radicals and inhibition of NADPH dehydrogenase
6-OHDA		Formation of free radicals and H ₂ O ₂

recognized by the dopamine transporter (DAT) causing accumulation in dopaminergic neurons which in turn generates superoxide and reactive dopamine species leading to dopaminergic neurotoxicity (46).

PQ can cross the BBB affecting the dopaminergic system as is transported into dopaminergic neurons *via* the dopamine transporter (47). Systemic administration of PQ in C57BL/6 mice resulted in a reduction of dopaminergic neurons, degeneration of the dopaminergic fibers of the *striatum* and a decrease in ambulatory activity, with the neurotoxicity exerted by PQ associated with its ability to induce the formation of free radicals, facilitate fibrillation of α -synuclein and cause cell death by apoptosis. Other studies also showed that PQ produces an increase in reactive oxygen species level, aggregations of α -synuclein, the formation of Lewy bodies and neuroselective lesions in the SNpc, features resembling those encountered in human PD (46, 48). PQ also activates other molecular signaling pathways including an increase in NADPH oxidase expression, depletion of oxidized glutathione, and Jun N-terminal kinase (JNK) activation (49).

Table H. Characteristics of the pesticide-neurotoxin-induced models of Parkinson's disease

Model	Behavioral symptom	Nigrostriatal damage	Synuclein aggregation/Lewy body formation	Drawback
RT	Decreased motor activity in rodents.	Loss of DA neurons accompanied by reduced DA innervation in striatum.	Synuclein aggregation in DA neurons.	Substantial morbidity and mortality.
PQ/MB	Not clear motor deficit.	Moderate neuron loss and DA deficiency in the nigro-striatal projection; neurons in other regions may be affected.	No inclusions present, but increased synuclein immunoreactivity in DA neurons of the SNpc.	Not extensively tested. Effects in other neurotransmitter systems.
MPTP	Motor impairments in primates. Less obvious in acute rodent models.	Loss of DA neurons depending on dosing, reaching 95% in acute high-dose conditions. Reduced DA levels in striatum with midbrain DA neuron loss.	Few cases of synuclein aggregation in primates. Increased synuclein immunoreactivity in rodents.	Non-progressive model of cell death. Inclusions are rare.
6-OHDA	Rotational behavior after unilateral injection.	Loss of DA innervation at injection site (striatum).	No inclusions found.	Intracerebral injection, very little synuclein involvement.

MB – maneab, PQ – paraquat

Different studies have confirmed the ability of PQ to destroy nigral dopaminergic neurons in animal models (mice, rats) (50, 51). One important feature of PQ toxicity is that it exhibits high selectivity for SNpc dopaminergic neurons which in turn results in almost 50 % loss after multiple injections (52). It has also been demonstrated the relationship between age and PQ neurotoxicity as older animals (mice, rats) exhibit enhanced vulnerability to this pesticide (53). However, doubts have been raised in recent studies regarding the effects of systematic PQ administration since it does not produce dopamine depletion in the *striatum* or evident motor deficits (54).

Currently, PD models induced with PQ are mainly developed either with the divalent cation (PQ²⁺) or the stable form (PQ⁺). PQ²⁺ is not transported *via* DAT but is converted to PQ⁺ through redox cycling (55).

In most of the studies that evaluate the neurotoxicity of PQ, the agent is administered by *i.p.* once weekly for several weeks. One particular feature of the PQ model is that it can be used alone or in combination with other agents such as maneb, as concurrent exposure to both chemicals in adult mice has resulted in marked DA fiber loss, altered DA turnover and decreased locomotor activity (56, 57).

Controlled-release systems using paraquat model. – Srivastav *et al.* (58) have recently synthesized biocompatible piperine-coated gold nanoparticles (AuNPspiperine) to specifically target PQ-induced metabolic complications both in *Drosophila melanogaster* and SH-SY5Y (human neuroblastoma) cells. Piperine, a natural alkaloid found in *Piper longum* and *Piper nigrum*, exerts potential antiparkinsonian activity due to its anti-inflammatory and antioxidative properties (59) also being able to counter motor dysfunctions and dopamine depletion (60). The authors found that in the *in vitro* model tested AuNPspiperine were able to maintain the mitochondrial membrane potential thereby protecting the cells against PQ-induced toxicity. Moreover, in PQ-treated flies, the new controlled delivery system was able to suppress oxidative stress and mitochondrial dysfunction leading to inhibition of apoptotic cell death. AuNPspiperine also improved locomotor function and life span in PQ exposed flies.

Maneb

Maneb (MB) is a fungicide in the form of a polymeric complex of manganese with anionic ligand ethylene-bis(dithiocarbamate) (Table I). It is used either as a contact pesticide to treat seeds or for direct application to emerging soil crops. MB exacerbates the toxicity of other agents such as PQ in mouse models, just as other dithiocarbamates disrupt the function of the ubiquitin-proteasome system, a system that is believed to be involved in genetic and idiopathic forms of PD (11).

In vitro studies have shown that the neurotoxicity exerted by MB is related to inhibition of the enzymatic activity of mitochondrial complex III and oxidation of catecholamines. Moreover, systemic administration of both PQ and MB can induce a synergistic decrease of DA in the *striatum*, degeneration of SNpc and motor dysfunction (57).

Berry *et al.* (48), in a literature review, indicated that the study performed by Thiruchelvam *et al.* (57), in C57BL/6 male mice injected *i.p.* with PQ (0.3 mg kg⁻¹) or MB (1 mg kg⁻¹), showed that exposure to these pesticides during the postnatal period produced permanent

Table III. Controlled-release systems developed for the treatment of PD and evaluated with pesticide or neurotoxin-induced animal models of PD

Animal model	Controlled-release system	Drug	Results	Ref.
	Microparticles	Rasagiline	Rasagiline-loaded PLGA microparticles showed a robust effect on all analytical outcomes (brain histology, immunohistochemistry, and behavioral testing) evaluated in rotenone-treated Wistar rats.	36
	Nanoparticles	Ropinirole	Brain histology and immunohistochemistry (Nissl-staining, glial fibrillary acidic protein (GFAP) and tyrosine hydroxylase (TH) immunohistochemistry), and behavioral testing (catalepsy, akinesia, rotarod and swim test) showed that ropinirole-loaded PLGA nanoparticles efficiently reverted PD-like symptoms of neurodegeneration in rotenone-treated Wistar rats.	37
	Microemulsions in transdermal system	Ropinirole	Ropinirole-loaded PLGA microemulsions given every two weeks were able to revert PD-like symptoms induced by rotenone in Wistar rats.	38
	Nanoparticles	Resveratrol	Ropinirole microemulsion via transdermal route improved the motor function by 76% when compared to the oral administration of the drug to rotenone-treated Sprague-Dawley rats. The transdermal delivery system also successfully restored catalase and superoxide dismutase levels.	39
Rotenone	Nanoparticles	Resveratrol	Resveratrol-loaded nanoparticles showed better efficacy than the drug given orally in solution in attenuating the rotenone-induced behavioral, biochemical and histological alterations observed in rotenone-treated Wistar rats.	40
	Nanoparticles	Curcumin and piperine	Curcumin-piperine co-loaded glyceryl mono-oleate nanoparticles were able to cross the BBB and rescue the rotenone-induced motor coordination impairment, and restrained dopaminergic neuronal degeneration in rotenone-treated mice.	41
	Nanoparticles	Iron-sapogenin	Iron-sapogenin nanoparticles showed better efficacy than sapogenin alone in reverting behavioral disorders induced by rotenone in rotenone-treated Kunming mice. Increased superoxide dismutase activity, tyrosine hydroxylase expression, and dopamine and acetylcholine levels in the brain were also obtained.	42
	Liposomes	Rosiglitazone	Rosiglitazone liposomes produced greater neuroprotective effects both in the retina and brain of rotenone-treated Dark Agouti rats than daily administration of the free drug. DARC (detection of apoptosing retinal cells) and OCT (optical coherence tomography) measures in the retina were good predictors of therapeutic efficacy in the brain.	43
MPTP	Microparticles	Glial cell line-derived neuro-trophic factor (GDNF)	GDNF-loaded PLGA 503H microparticles administered within the putamen achieved sustained levels of the neurotrophic factor in the brain, which were able to improve both motor and dopaminergic function in MPTP-treated <i>Macaca fascicularis</i> non-human primates.	75

Table III. Controlled-release systems developed for the treatment of PD and evaluated with pesticide or neurotoxin-induced animal models of PD

Animal model	Controlled-release system	Drug	Results	Ref.
	Microparticles	Rasagiline	Rasagiline-loaded PLGA microparticles showed a robust effect on all analytical outcomes (brain histology, immunohistochemistry, and behavioral testing) evaluated in rotenone-treated Wistar rats.	36
	Nanoparticles	Ropinirole	Brain histology and immunohistochemistry (Nissl-staining, glial fibrillary acidic protein (GFAP) and tyrosine hydroxylase (TH) immunohistochemistry), and behavioral testing (catalepsy, akinesia, rotarod and swim test) showed that ropinirole-loaded PLGA nanoparticles efficiently reverted PD-like symptoms of neurodegeneration in rotenone-treated Wistar rats.	37
	Microparticles	Ropinirole	Ropinirole-loaded PLGA microparticles given every two weeks were able to revert PD-like symptoms induced by rotenone in Wistar rats.	38
	Microemulsions in transdermal system	Ropinirole	Ropinirole microemulsion via transdermal route improved the motor function by 76 % when compared to the oral administration of the drug to rotenone-treated Sprague-Dawley rats. The transdermal delivery system also successfully restored catalase and superoxide dismutase levels.	39
Rotenone	Nanoparticles	Resveratrol	Resveratrol-loaded nanoparticles showed better efficacy than the drug given orally in solution in attenuating the rotenone-induced behavioral, biochemical and histological alterations observed in rotenone-treated Wistar rats.	40
	Nanoparticles	Curcumin and piperine	Curcumin-piperine co-loaded glyceryl mono-oleate nanoparticles were able to cross the BBB and rescue the rotenone-induced motor coordination impairment, and restrained dopaminergic neuronal degeneration in rotenone-treated mice.	41
	Nanoparticles	Iron-sapogenin	Iron-sapogenin nanoparticles showed better efficacy than sapogenin alone in reverting behavioral disorders induced by rotenone in rotenone-treated Kunming mice. Increased superoxide dismutase activity, tyrosine hydroxylase expression, and dopamine and acetylcholine levels in the brain were also obtained.	42
	Liposomes	Rosiglitazone	Rosiglitazone liposomes produced greater neuroprotective effects both in the retina and brain of rotenone-treated Dark Agouti rats than daily administration of the free drug. DARC (detection of apoptosing retinal cells) and OCT (optical coherence tomography) measures in the retina were good predictors of therapeutic efficacy in the brain.	43
MPTP	Microparticles	Glial cell line-derived neuro-trophic factor (GDNF)	GDNF-loaded PLGA 503H microparticles administered within the putamen achieved sustained levels of the neurotrophic factor in the brain, which were able to improve both motor and dopaminergic function in MPTP-treated <i>Macaca fascicularis</i> non-human primates.	75

Animal model	Controlled-release system	Drug	Results	Ref.
	Nanoparticles	Dopamine	Dopamine-loaded PLGA nanoparticles significantly recovered neurobehavioral changes and increased dopamine levels and its metabolites and a reduction of dopamine-D2 receptor supersensitivity in the <i>striatum</i> of parkinsonian rats.	93
	Microparticles	L-DOPA/benserazide	L-DOPA/benserazide-loaded PLGA microparticles improved motor function and ameliorated the expression of L-DOPA induced dyskinesia in 6-OHDA-treated Sprague-Dawley rats.	95
	Nanoemulsion gel in a trans-dermal system	Ropinirole	Ropinirole nanoemulsion gel restored the biochemical markers of oxidative stress (glutathione antioxidant enzymes, thiobarbituric acid reactive substances, and catalase activity) in 6-OHDA-treated Wistar rats.	96
	Microparticles	Rotigotine	Rotigotine-loaded PLGA microparticles showed high and stable plasma and striatal drug levels for up to two weeks and exhibited steady efficacy in 6-OHDA-treated Sprague-Dawley rats.	99
	Solid lipid nanoparticles	Apomorphine	Apomorphine nanoparticles increased the bioavailability and distribution of the drug in the striatum, which resulted in a significant improvement of lesions induced by 6-OHDA in rats.	100
6-OHDA	Microparticles	Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)	GDNF-loaded PLGA microparticles produced a consistent improvement in the behavior of 6-OHDA-treated Sprague-Dawley rats. More than 50% of the animals fully recovered from their rotational asymmetry with the response being accompanied by a higher fiber density in the GDNF treated <i>striatum</i> .	101
	Liposomes	Basic fibroblast growth factor (bFGF)	The bFGF liposomal formulation enhanced the neuroprotective effects of bFGF on dopaminergic neurons, improved the behavioral alterations induced by 6-OHDA in rats, increased the number of Nissl bodies, and ameliorated the loss of tyrosine hydroxylase (TH)-positive neurons.	102
	Nanoparticles	Basic fibroblast growth factor (bFGF)	bFGF in phospholipid-based gelatin nanoparticles stimulated dopaminergic function in surviving synapses and exerted neuroprotective effects after intranasal administration to 6-OHDA-treated rats.	103
	Microparticles	Vascular endothelial growth factor (VEGF) and GDNF	GDNF-loaded microspheres and VEGF and GDNF-coated microspheres improved the rotation behavioral test and resulted in higher levels of neuron repair and neuroregeneration in 6-OHDA-treated Sprague-Dawley rats.	104

and progressive alterations in the nigrostriatal DA system, that could be involved in the induction of neurodegenerative disorders.

MB is also able to potentiate both the MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) and the PQ effects (56, 61). In rodents, the combination of PQ and MB can elicit dopamine depletion in the *striatum*, selective dopaminergic cell loss, accumulation of α -synuclein and PD-like motor and non-motor symptoms. Moreover, a synergistic effect has been demonstrated after the administration of PQ (10 mg kg⁻¹) and MB (30 mg kg⁻¹) to mice twice a week for 6 weeks, a dosage regimen in which exacerbated parkinsonism was observed when compared to the administration of each compound alone (56).

However, with the use of MB as occurs with RT, the animal model has led to contradictory results, variable loss of striatal DA content and cell death (62). Therefore, research efforts are still needed to elicit the exact mechanisms by which PQ induces neurodegeneration.

To date, no articles have been found in the literature regarding the evaluation of controlled-release systems in MB-induced animal models of PD.

MODELS BASED ON NEUROTOXINS

Neurotoxin models remain the most popular models in PD animal studies with MPTP and 6-OHDA being the most frequently used. However, they lack the ability to mimic the pathological features of PD, as they only mimic the symptoms. These models only resemble the symptoms and motor dysfunctions occurring once severe dopamine depletion is reached (63).

MPTP

MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) (Table I) was first described as an agent causing parkinsonism in 1982, in California, when a group of drug addicts developed a severe acute stiffness syndrome which improved upon receiving levodopa and dopamine agonists (64).

Due to its lipophilicity, MPTP readily crosses the BBB. When in contact with monoamine oxidase B it transforms into 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺), which is the active compound that enters the dopamine neurons of the SNpc. Once inside, it blocks complex I of the mitochondrial electron transport chain causing a decrease in adenosine triphosphate (ATP) and accumulation of ROS, which in turn results in cell death (65). MPTP causes damage to the dopaminergic pathway which is easily reproducible in animal models. Moreover, when infused over a period of 30 days, it can induce the formation of ubiquitin and α -synuclein inclusions resembling the features of human PD (66).

It has also been postulated that the toxicity of MPTP through the MPP⁺ entity may be dependent on the neuromelanin content since the affinity of MPP⁺ for neuromelanin is very high (24) and MPP⁺ can remain in the cytosol interacting with enzymes (67).

Induction of parkinsonian syndromes with MPTP is usually performed in rodents, dogs, cats and non-human primates. The effects of MPTP in mice vary with age, dose, route of administration and number and frequency of injections. It has been demonstrated

that the damage caused by MPTP at the mitochondrial level increases with age as brains of older mice accumulate more MPP⁺ than those of younger animals, which may contribute to greater sensitivity to MPTP toxicity.

Of the numerous studies performed with MPTP in mice, some have been based on the *s.c.* or *i.p.* administration of 10–30 mg kg⁻¹ per day for several days, depending on whether an acute or chronic model is being developed. For instance, for the acute model doses of MPTP ranging between 20–30 mg kg⁻¹ given the same day have been described, whereas, for the chronic model, two dosage regimens have been described: administration of daily doses of 30 mg kg⁻¹ for five consecutive days or daily doses of 4 mg kg⁻¹ for 20 days (68, 69).

The MPTP mouse model has some advantages over the one induced by 6-OHDA (6-hydroxydopamine) due to the fact that it does not require stereotaxic surgery for its administration. Moreover, it is also able to develop bilateral degeneration of the nigrostriatal tract resembling that found in human PD, and also mimic other known biochemical features such as decrease in striatal levels of DA and TH (tyrosine hydroxylase), increase of both striatal precursor protein preproenkephalin-A (PPE-A) and acetylcholine (ACh) levels, increase of extracellular glutamate levels and reduction of glutathione (GSH) in basal ganglia (70). The MPTP mouse model does, however, have some disadvantages over the 6-OHDA model, especially regarding reproducibility and the range of behavioral outcomes that can be obtained. Moreover, mice are less sensitive to MPTP than primates, therefore, requiring higher doses that can be lethal, due to the resulting peripheral neuro- or cardiotoxicity (71).

All primate species in which MPTP has been tested are sensitive to this neurotoxin, including squirrel, monkeys, baboons, macaques, marmosets and vervet monkeys. Repeated systemic administration of MPTP by *i.p.*, *s.c.*, *i.v.* or *i.m.* injections, with varying doses depending on species and route, are able to rapidly develop motor alterations resembling those found on human PD, such as bradykinesia, postural instability and rigidity (72), as well as non-motor symptoms such as cognitive deficits (73) and temporary autonomic disturbances (74).

Controlled-release systems using the MPTP model. – Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) is a potent neuroprotective agent currently considered as a promising candidate for the treatment of PD, due to its potent trophic effect on the dopaminergic system. However, GDNF is not able to cross the BBB and has a relatively short elimination half-life. For this, attempts have been made by Garbayo *et al.* (75) to design new controlled delivery systems to increase the stability and retention of neurotrophic factors such as GDNF aiming to improve the treatment of PD. In this study, GDNF-loaded microparticles were prepared by the solvent extraction-evaporation method using PLGA 503H as polymer. The new formulation was applied to *Macaca fascicularis* non-human primates that received weekly *i.v.* doses of MPTP (0.5 mg kg⁻¹) until the animals reached stable severe parkinsonian symptoms. Administration of the new drug delivery system was performed by stereotaxic surgery. The results obtained showed that a single administration of microencapsulated GDNF (25 mg) within the putamen achieved sustained levels of the neurotrophic factor in the brain, which were able to improve both motor and dopaminergic function. Moreover, in the SNpc GDNF was able to increase the number of dopaminergic neurons, regardless of the severity of neurodegeneration.

6-OHDA

6-Hydroxydopamine (6-OHDA) (Table I) is another neurotoxin widely used to induce parkinsonism in experimental animal models. It is a highly oxidizable DA analog that can be captured by the dopamine transporter, which in turn results in selective damage of dopaminergic neurons in the SNpc (76).

6-OHDA does not cross the BBB, therefore, making it necessary to perform its direct administration into the brain parenchyma. This represents one of the main drawbacks as specialized stereotaxic surgical instruments and training is required for its administration. Regarding the cytotoxicity exerted by 6-OHDA three mechanisms have been proposed: intra-extracellular self-oxidation of 6-OHDA resulting in the formation of hydroxyl, hydrogen peroxide and superoxide radicals, the appearance of hydrogen peroxide due to the monoamine oxidase, and inhibition of mitochondrial electron transport chain complexes I and IV [NADH dehydrogenase (complex I) and cytochrome c oxidase (complex IV)]. It is postulated that these events resemble those occurring in the PD brain, which supports the interest and validity of the 6-OHDA model. Moreover, as a result of these, ROS are produced, which in turn explains the oxidative stress leading to the cytotoxic effect of 6-OHDA. Recent studies have demonstrated that the administration of 6 µg of 6-OHDA in the dorsal *striatum* of rats is able to produce an increase in the oxidation level of proteins and lipoperoxidation products as a function of time (77), which could be due to mitochondrial oxidative stress leading to both neuroinflammation and cell death by apoptosis (78).

When trying to understand the *in vivo* effects and neurodegenerative mechanisms of 6-OHDA, injection of the neurotoxin can be performed into the medial forebrain bundle (79), the *substantia nigra* (80), or at the intrastriatal site (81–83). Bilateral lesions of the ascending forebrain dopaminergic system have been reported to induce severe aphagia, adipsia and akinesia, with the need for tube feeding of the animals (84). Intranigral lesions usually cause pain and massive degeneration of the injured nucleus, which hinders their use when evaluating the mechanisms involved in neurotoxicity and death, as a consequence of long-term oxidative stress.

On the other hand, the intrastriatal lesion model produces a progressive loss of dopaminergic neurons in the SNpc, resembling the nigrostriatal lesions found in PD after unilateral intracranial injection (85, 86) and bilateral injection (87). In the late '90s, Kirik *et al.* (88) established the optimal parameters when causing unilateral ventrolateral *striatum* lesions after injecting a 6-µg dose of 6-OHDA at three different *striatum* sites. The results obtained indicated that the effect of the intrastriatal injection depends on the site of injury and the dose given. In this study, 80 % reduction in striatal innervation and almost 90 % loss of the nigral dopaminergic neurons was observed.

The 6-OHDA model does not reproduce the presence of Lewy bodies (89). To overcome this drawback, α -Syn murine models have been developed, based on knockout models (90), gene expression models (91), or intracerebral injection of α -Syn (92). Although further research is needed, this is an interesting approach since this protein is a key component of Lewy bodies.

Since the 6-OHDA model reproduces several of the cellular alterations occurring in PD, it is a valuable model to study the cytotoxicity mechanisms involved and the cellular processes activated by oxidative stress (neuroinflammation and neuronal death).

Controlled-release systems using the 6-OHDA model. – When trying to increase the DA levels at the CNS, a novel approach is based on the use of DA encapsulated within polymeric nanoparticles (93). DA-loaded NPs were prepared with copolymer PLGA by means of the double emulsion solvent evaporation method. This formulation was evaluated in a 6-OHDA-induced rat model of PD, being able to successfully release the drug in the *striatum*. Systemic *i.v.* administration of DA-loaded NPs caused a significant increase of DA levels and its metabolites and a reduction of DA-D2 receptor supersensitivity in the *striatum* of parkinsonian rats. Moreover, the formulation significantly recovered neurobehavioral changes induced by 6-OHDA without causing any additional production of ROS, dopaminergic neuron degeneration, and structural changes in the *striatum* and SNpc when compared to 6-OHDA-lesioned rats.

Nowadays, L-DOPA is still considered the most effective drug in the treatment of PD. However, chronic administration of this agent usually results in L-DOPA-induced dyskinesia (LID), which has been related to its peak plasma concentration (94). To avoid this, Ren *et al.* (95) developed L-DOPA/benserazide-loaded PLGA microparticles which were administered to Sprague-Dawley rats in which PD was induced by stereotactic administration of 6-OHDA. Subcutaneous administration of the microparticulate formulation improved motor function and ameliorated the expression of L-DOPA-induced dyskinesia (LID).

As previously indicated, ropinirole (RP), a dopamine agonist, stimulates striatal DA receptors being effective both as monotherapy and in combination therapy with levodopa. However, RP has low oral bioavailability and short elimination half-life which results in frequent dosing. Continuous delivery of RP from a transdermal system may avoid these drawbacks and help prevent or delay the onset of L-DOPA-related motor complications due to continuous dopaminergic stimulation. In this regard, Azeem *et al.* (96) developed a nanoemulsion gel for RP transdermal delivery. The new formulation was evaluated in a PD animal model induced in Wistar rats after stereotaxic administration of 10 mg 6-OHDA in 2 μL of 0.1 % in ascorbic acid-saline. The efficacy of the nanoemulsion was tested by analyzing three biochemical markers of oxidative stress (glutathione antioxidant enzymes, thiobarbituric acid reactive substances and catalase activity) with the results demonstrating that the new formulation was able to effectively restore the biochemical changes induced by 6-OHDA.

Rotigotine (Ro) is a non-ergoline agonist of DA D3/D2/D1 receptors indicated for the treatment of both early and advanced PD. Giladi *et al.* (97), developed a transdermal patch for early PD that delivered the drug in patients at a constant rate for 24 h providing continuous plasma concentrations. However, there are some important side-effects related to the use of skin patches such as variability in the absorption rates from different skin areas and possible irritation after long-term application of the transdermal device (98). As PD patients require long-term treatments it would be interesting to develop a sustained-release preparation of Ro to achieve continuous dopaminergic stimulation for long periods of time. For this purpose, Wang *et al.* (99), encapsulated Ro within PLGA microparticles (RoMPs) by an oil-in-water emulsion solvent evaporation technique and evaluated the delivery system in 6-OHDA-lesioned Sprague-Dawley rats ($4 \mu\text{g} \mu\text{L}^{-1}$ 6-OHDA in 0.9 % saline, containing 0.04 % ascorbic acid) in comparison with pulsatile L-DOPA administration. The pharmacokinetic study performed after intramuscular administration of RoMPs showed high and stable plasma and striatal drug levels for up to two weeks. Moreover, the micro-

particulate Ro formulation exhibited steady efficacy which lasted for 2 weeks without any significant differences found between RoMPs treatment and pulsatile L-DOPA.

Tsai *et al.* (100) encapsulated apomorphine, a DA receptor agonist, in solid lipid nanoparticles (SLNs) in order to improve its very low oral bioavailability (< 2 %). The brain regional distribution of the nanoparticles was also evaluated. For this, pharmacokinetic studies were carried out in rats. Drug bioavailability was increased with NPs in respect to a reference solution. Apomorphine distribution in the *striatum*, the predominant site of its therapeutic action, also increased when using the solid-lipid nanoparticles (SLN). The anti-parkinsonian activity of apomorphine was evaluated in rats with 6-OHDA induced lesions. Animals treated with orally administered SLNs presented a significant improvement when compared to those treated with the drug formulated in solution.

Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) is studied for the treatment of neurodegenerative disorders of basal ganglia origin such as PD. Garbayo *et al.* (101) investigated the neurorestorative effects of controlled GDNF delivery when given as GDNF-loaded PLGA microparticles, which were prepared by a solvent extraction/evaporation method. The new delivery system was assessed in Sprague-Dawley rats that previously were stereotaxically injected with a total dose of 20 µg 6-OHDA dissolved in 10 µL of saline with 0.1 % ascorbic acid. The results demonstrated the efficacy of GDNF-loaded PLGA microparticles which resulted in a consistent improvement in behavior 6 weeks after stereotaxic injection of the delivery system. Moreover, 60 % of the animals treated with new formulation fully recovered from their rotational asymmetry 8 weeks after treatment, a response that was accompanied by a higher fiber density in the GDNF treated *striatum*.

Regarding lipid-based nanocarriers, Yang *et al.* (102) developed basic fibroblast growth factor (bFGF)-loaded liposomes for intranasal administration due to the neuroprotective effects of bFGF. The liposomal formulation was evaluated in a PD model induced in rats by 6-OHDA administration. The authors demonstrated that the new liposomal formulation was able to deliver bFGF to the *striatum* and SNPc of rats and enhanced the neuroprotective effects of bFGF on dopaminergic neurons. Moreover, the bFGF liposomal formulation markedly improved the behavioral alterations induced by 6-OHDA, increased the number of Nissl bodies, and ameliorated the loss of tyrosine hydroxylase (TH)-positive neurons.

Zhao *et al.* (103) formulated bFGF in phospholipid-based gelatin nanoparticles destined to target the CNS also *via* intranasal administration. Hemi-parkinsonism was generated in rats by stereotaxic injection of 10 µL 6-OHDA solution in the right-side *striatum*. After administration, the integrity of the nasal mucosa was not affected. The results obtained showed that bFGF not only stimulated dopaminergic function in surviving synapses but also played a neuroprotective effect.

In another approach, vascular endothelial growth factor (VEGF), a potent angiogenic factor with survival effects in neuronal cultures, was microencapsulated either alone or in combination with GDNF (104), in order to evaluate the efficacy of the formulation in the advanced stages of PD. For this, Sprague-Dawley rats were injected with 6-OHDA (7.5 and 6 µg at two coordinates) to establish the PD model. The results showed that treatment with GDNF microspheres and with both VEGF and GDNF microspheres improved the rotation behavioral test, and resulted in higher levels of neurorepair and neuroregeneration.

Table II summarizes the characteristics of the pesticide and neurotoxin-induced animal models of PD. Finally, Table III summarizes different controlled-release systems developed for the treatment of PD and evaluated with pesticide or neurotoxin-induced animal models of PD.

CONCLUSIONS

Several animal models of PD are currently being used to help understanding the pathogenesis of this neurodegenerative disorder as well as to evaluate the potential of new treatments developed for the disease. Some of these models are based on the use of neurotoxins in which substantial nigrostriatal degeneration is generally developed, as well as motor symptoms resembling those occurring in human PD. Regarding the development and evaluation of new drug delivery systems for PD, 6-OHDA is the one most frequently used. Although it needs to be injected intracerebrally, it exerts great selectivity of damage facilitating damage assessment. In addition, the scientific evidence on this neurotoxin is very extensive. MPTP is another neurotoxin frequently used. Unlike 6-OHDA, MPTP has the ability to cross the BBB, thereby facilitating its administration. Its mechanism of action has been extensively studied, with the MPTP-monkey model being considered the gold standard for preclinical testing of new therapeutic approaches for PD. However, the lack of facilities and expertise of researchers with monkey models is one of its main drawbacks.

Regarding pesticide-based animal models of PD, the agents usually employed are rotenone, paraquat and maneb. Systemic administration of rotenone mainly targets mitochondrial structures thereby triggering oxidative stress causing apoptosis of the dopaminergic neurons of the SNpc. Moreover, the rotenone rat model can cause the formation of α -synuclein inclusions as well as motor deficits resembling those occurring in PD. Paraquat is also thought to cause dopaminergic degeneration by inducing oxidative stress, however, after chronic administration, this agent is not able to produce dopamine depletion in the *striatum* or clear motor deficits.

From this review, it has been found that when evaluating new drug delivery systems developed for PD, 6-OHDA and rotenone are the most frequently used agents. However, there is still a need for further research since none of the animal models based either on the use of neurotoxins or pesticides can exactly mimic the neuropathological features occurring in human PD.

Abbreviations, acronyms, symbols. – 6-OHDA – 6-hydroxydopamine, bFGF – basic fibroblast growth factor, COMT – catechol-*O*-methyltransferase, CPNPs – curcumin and piperine co-loaded glyceryl monooleate NPs, DA – dopamine, DARC – detection apoptosing retinal cells, DAT – dopamine transporter, GDNF – glial cell line-derived neurotrophic factor, GFAP – glial fibrillary acidic protein, LID – L-DOPA-induced dyskinesia, JNK – Jun *N*-terminal kinase, MAO-B – monoamine oxidase B, MB – maneb, ME – microemulsion, MEG – ME-based gel, MPP⁺ – 1-methyl-4-phenylpyridinium, MPs – microparticles, MPTP – 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, NDUFS4 – NADH dehydrogenase ubiquinone proteins Fe-S4, NMDA – *N*-methyl-D-aspartate, NPs – nanoparticles, OCT – optical coherence tomography, PD – Parkinson's disease, PLGA – poly(lactic-co-glycolic) acid, PPE-A – protein preproenkephalin-A, PQ – paraquat (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridyl dichloride), RM – rasagiline mesylate, RG – rosiglitazone, Ro – rotigotine, RoMPs – rotigotine microparticles, RP – ropinirole, RSV – resveratrol, RT – rotenone, SLNs – solid lipid nanoparticles, SNpc – *substantia nigra pars compacta*, TH – tyrosine hydroxylase, VEGF – vascular endothelial growth factor, α -Syn – alpha-synuclein

REFERENCES

1. J. M. Beitz, Parkinson's disease a review, *Front. Biosci.* **6** (2014) 65–74; <https://doi.org/10.2741/S415>
2. D. M. Radhakrishnan and V. Goyal, Parkinson's disease: A review, *Neurol. India* **66** (2018) 26–35; <https://doi.org/10.4103/0028-3886.226451>
3. L. V. Kalia and A. E. Lang, Parkinson's disease, *Lancet* **386** (2015) 896–912; [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61393-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61393-3)
4. F. J. Carod-Artal, H. M. Mesquita, S. Ziolkowski and P. Martinez-Martin, Burden and health-related quality of life among caregivers of Brazilian Parkinson's disease patients, *Park. Relat. Disord.* **19** (2013) 943–948; <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2013.06.005>
5. N. L. G. del Rey, A. Quiroga-Varela, E. Garbayo, I. Carballo-Carbajal, R. Fernández-Santiago, M. H. G. Monje, I. Trigo-Damas, M. J. Blanco-Prieto and J. Blesa, Advances in Parkinson's disease: 200 years later, *Front. Neuroanat.* **12** (2018) Article ID 113 (14 pages); <https://doi.org/10.3389/fnana.2018.00113>
6. K. A. Jellinger, Accuracy of clinical diagnosis of Parkinson disease: A systematic review and meta-analysis, *Neurology* **87** (2016) 237–238; <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000002876>
7. A. Iranzo, E. Tolosa, E. Gelpi, J. L. Molinuevo, F. Valldeoriola, M. Serradell, R. Sanchez-Valle, I. Vilaseca, F. Lomeña, D. Vilas, A. LLadó, C. Gaig and J. Santamaria, Neurodegenerative disease status and post-mortem pathology in idiopathic rapid-eye-movement sleep behaviour disorder: An observational cohort study, *Lancet Neurol.* **12** (2013) 443–453; [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70056-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70056-5)
8. J. M. Miyasaki, W. Martin, O. Suchowersky, W. J. Weiner and A. E. Lang, Practice parameter: Initiation of treatment for Parkinson's disease: An evidence-based review: Report of the quality standards subcommittee of the American Academy of Neurology, *Neurology* **58** (2002) 11–17; <https://doi.org/10.1212/WNL.58.1.11>
9. K. Seppi, D. Weintraub, M. Coelho, S. Perez-Lloret, S. H. Fox, R. Katzenschlager, E. M. Hametner, W. Poewe, O. Rascol, C. G. Goetz and C. Sampaio, The Movement Disorder Society disease evidence-based medicine review update: Treatments for the non-motor symptoms of Parkinson's, *Mov. Disord.* **26** (2011) 42–80; <https://doi.org/10.1002/mds.23884>
10. B. S. Connolly and A. E. Lang, Pharmacological treatment of Parkinson disease: A review, *JAMA* **311** (2014) 1670–1683; <https://doi.org/10.1001/jama.2014.3654>
11. J. M. Hatcher, K. D. Pennell and G. W. Miller, Parkinson's disease and pesticides: a toxicological perspective, *Trends Pharmacol. Sci.* **29** (2008) 322–329; <https://doi.org/10.1016/j.tips.2008.03.007>
12. M. Van der Mark, M. Brouwer, H. Kromhout, P. Nijssen, A. Huss and R. Vermeulen, Is pesticide use related to Parkinson disease? Some clues to heterogeneity in study results, *Environ. Health Perspect.* **120** (2012) 340–347; <https://doi.org/10.1289/ehp.1103881>
13. D. Belvisi, R. Pellicciari, G. Fabbrini, M. Tinazzi, A. Berardelli and G. Defazio, Modifiable risk and protective factors in disease development, progression and clinical subtypes of Parkinson's disease: What do prospective studies suggest?, *Neurobiol. Dis.* **134** (2020) 1–10; <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104671>
14. F. Tuchsén and A. Astrup Jensen, Agricultural work and the risk of Parkinson's disease in Denmark, 1981–1993, *Scand. J. Work Environ. Health* **26** (2000) 359–362; <https://doi.org/10.5271/sjweh.554>
15. H. Petrovitch, G. Webster Ross, R. D. Abbott, W. T. Sanderson, D. S. Sharp, C. M. Tanner, K. H. Masaki, P. L. Blanchette, J. S. Popper, D. Foley, L. Launer and L. R. White, Plantation work and risk of Parkinson disease in a population-based longitudinal study, *Arch. Neurol.* **59** (2002) 1787–1792; <https://doi.org/10.1001/archneur.59.11.1787>
16. I. Baldi, P. Lebailly, B. Mohammed-Brahim, L. Letenneur, J. F. Dartigues and P. Brochard, Neurodegenerative diseases and exposure to pesticides in the elderly, *Am. J. Epidemiol.* **157** (2003) 409–414; <https://doi.org/10.1093/aje/kwf216.A>

17. A. Ascherio, H. Chen, M. G. Weisskopf, E. O'Reilly, M. L. McCullough, E. E. Calle, M. A. Schwarzschild and M. J. Thun, Pesticide exposure and risk for Parkinson's disease, *Ann. Neurol.* 60 (2006) 197–203; <https://doi.org/10.1002/ana.20904>
18. M. G. Weisskopf, P. Knekt, E. J. O'Reilly, J. Lyytinen, A. Reunanen, F. Laden, L. Altshul and A. Ascherio, Persistent organochlorine pesticides in serum and risk of Parkinson disease, *Neurology* 74 (2010) 1055–1061; <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181d76a93>
19. A. L. Feldman, A. L. V. Johansson, G. Nise, M. Gatz, N. L. Pedersen and K. Wirdefeldt, Occupational exposure in Parkinsonian disorders: A 43-year prospective cohort study in men, *Park. Relat. Disord.* 17 (2011) 677–682; <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2011.06.009>
20. L. Kenborg, C. F. Lassen, F. Lander and J. H. Olsen, Parkinson's disease among gardeners exposed to pesticides – a Danish cohort study, *Scand. J. Work Environ. Health* 38 (2012) 65–69; <https://doi.org/10.5271/sjweh.3176>
21. M. Brouwer, T. Koeman, P. A. Van Den Brandt, H. Kromhout, L. J. Schouten, S. Peters, A. Huss and R. Vermeulen, Occupational exposures and Parkinson's disease mortality in a prospective Dutch cohort, *Occup. Environ. Med.* 72 (2015) 448–455; <https://doi.org/10.1136/oemed-2014-102209>
22. P. Mulcahy, S. Walsh, A. Paucard, K. Rea and E. Dowd, Characterisation of a novel model of Parkinson's disease by intra-striatal infusion of the pesticide rotenone, *Neuroscience* 181 (2011) 234–242; <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.01.038>
23. R. E. Heikkila, W. J. Nicklas, I. Vyas and R. C. Duvoisin, Dopaminergic toxicity of rotenone and the 1-methyl-4-phenylpyridinium ion after their stereotaxic administration to rats: Implication for the mechanism of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity, *Neurosci. Lett.* 59 (1985) 135–140; [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(85\)90580-4](https://doi.org/10.1016/0304-3940(85)90580-4)
24. R. J. Ferrante, J. B. Schulz, N. W. Kowall and M. F. Beal, Systemic administration of rotenone produces selective damage in the striatum and globus pallidus, but not in the substantia nigra, *Brain Res.* 753 (1997) 157–162; [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(97\)00008-5](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(97)00008-5)
25. R. Betarbet, T. B. Sherer, G. MacKenzie, M. Garcia-Osuna, A. V. Panov and J. T. Greenamyre, Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease, *Nat. Neurosci.* 3 (2000) 1301–1306; <https://doi.org/10.1038/81834>
26. J. T. Greenamyre, J. R. Cannon, R. Drolet and P. G. Mastroberardino, Lessons from the rotenone model of Parkinson's disease, *Trends Pharmacol. Sci.* 31 (2010) 141–142; <https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.12.006>
27. F. Pan-Montojo, O. Anichtchik, Y. Dening, L. Knels, S. Pursche, R. Jung, S. Jackson, G. Gille, M. G. Spillantini, H. Reichmann and R. H. W. Funk, Progression of Parkinson's disease pathology is reproduced by intragastric administration of rotenone in mice, *PLoS One* 5 (2010) Article ID 8762 (10 pages); <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008762>
28. Z. Liu, T. Li, D. Yang and W. W. Smith, Curcumin protects against rotenone-induced neurotoxicity in cell and drosophila models of Parkinson's disease, *Adv. Park. Dis.* 2 (2013) 18–27; <https://doi.org/10.4236/apd.2013.21004>
29. W. S. Choi, R. D. Palmiter and Z. Xia, Loss of mitochondrial complex I activity potentiates dopamine neuron death induced by microtubule dysfunction in a Parkinson's disease model, *J. Cell Biol.* 192 (2011) 873–882; <https://doi.org/10.1083/jcb.201009132>
30. N. Xiong, J. Xiong, M. Jia, L. Liu, X. Zhang, Z. Chen, J. Huang, Z. Zhang, L. Hou, Z. Luo, D. Ghoorah, Z. Lin and T. Wang, The role of autophagy in Parkinson's disease: Rotenone-based modeling, *Behav. Brain Funct.* 9 (2013) 13–25; <https://doi.org/10.1186/1744-9081-9-13>
31. W. Le, P. Sayana and J. Jankovic, Animal models of Parkinson's disease: A Gateway to therapeutics?, *Neurotherapeutics* 11 (2014) 92–110; <https://doi.org/10.1007/s13311-013-0234-1>
32. F. Cicchetti, J. Drouin-Ouellet and R. E. Gross, Environmental toxins and Parkinson's disease: what have we learned from pesticide-induced animal models?, *Trends Pharmacol. Sci.* 30 (2009) 475–483; <https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.06.005>


33. M. Inden, Y. Kitamura, M. Abe, A. Tamaki, K. Takata and T. Taniguchi, Parkinsonian rotenone mouse model: Reevaluation of long-term administration of rotenone in C57BL/6 mice, *Biol. Pharm. Bull.* **34** (2011) 92–96; <https://doi.org/10.1248/bpb.34.92>
34. M. Gómez-Chavarrín, R. Díaz-Pérez, R. Morales-Espinosa, J. Fernández-Ruiz, G. Roldán-Roldán, C. Torner and C. A. Torner Aguilar, Developmental effects of rotenone pesticide on rat nigro-striatal dopaminergic system, *Salud Mental* **36** (2013) 1–8; <https://doi.org/10.17711/SM.0185-3325.2013.001>
35. N. Kanwar, R. Bhandari, A. Kuhad and V. R. Sinha, Polycaprolactone-based neurotherapeutic delivery of rasagiline targeting behavioral and biochemical deficits in Parkinson's disease, *Drug Deliv. Transl. Res.* **9** (2019) 891–905; <https://doi.org/10.1007/s13346-019-00625-2>
36. M. Fernández, E. Barcia, A. Fernández-Carballido, L. Garcia, K. Slowing and S. Negro, Controlled release of rasagiline mesylate promotes neuroprotection in a rotenone-induced advanced model of Parkinson's disease, *Int. J. Pharm.* **438** (2012) 266–278; <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.09.024>
37. E. Barcia, L. Boeva, L. García-García, K. Slowing, A. Fernández-Carballido, Y. Casanova and S. Negro, Nanotechnology-based drug delivery of ropinirole for Parkinson's disease, *Drug Deliv.* **24** (2017) 1112–1123; <https://doi.org/10.1080/10717544.2017.1359862>
38. S. Negro, L. Boeva, K. Slowing, A. Fernandez-Carballido, L. Garcia-García and E. Barcia, Efficacy of ropinirole-loaded PLGA microspheres for the reversion of rotenone-induced Parkinsonism, *Curr. Pharm. Des.* **23** (2016) 3423–3431; <https://doi.org/10.2174/1381612822666160928145346>
39. P. Patel, A. Pol, S. More, D. R. Kalaria, Y. N. Kalia and V. B. Patravale, Colloidal soft nanocarrier for transdermal delivery of dopamine agonist: Ex vivo and in vivo evaluation, *J. Biomed. Nanotechnol.* **10** (2014) 3291–3303; <https://doi.org/10.1166/jbn.2014.1857>
40. S. Palle and P. Neerati, Improved neuroprotective effect of resveratrol nanoparticles as evinced by abrogation of rotenone-induced behavioral deficits and oxidative and mitochondrial dysfunctions in rat model of Parkinson's disease, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **391** (2018) 445–453; <https://doi.org/10.1007/s00210-018-1474-8>
41. P. Kundu, M. Das, K. Tripathy and S. K. Sahoo, Delivery of dual drug loaded lipid based nanoparticles across the blood-brain barrier impart enhanced neuroprotection in a rotenone induced mouse model of Parkinson's disease, *ACS Chem. Neurosci.* **7** (2016) 1658–1670; <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.6b00207>
42. Q. Yang, F. Fang, Y. Li and Y. Ye, Neuroprotective effects of the nanoparticles of zinc sapogenin from seeds of *Camellia oleifera*, *J. Nanosci. Nanotechnol.* **17** (2017) 2394–2400; <https://doi.org/10.1166/jnn.2017.13436>
43. E. M. Normando, B. M. Davis, L. De Groef, S. Nizari, L. A. Turner, N. Ravindran, M. Pahlitzsch, J. Brenton, G. Malaguarnera, L. Guo, S. Somavarapu and M. F. Cordeiro, The retina as an early biomarker of neurodegeneration in a rotenone-induced model of Parkinson's disease: Evidence for a neuroprotective effect of rosiglitazone in the eye and brain, *Acta Neuropathol. Commun.* **4** (2016) 1–15; <https://doi.org/10.1186/s40478-016-0346-z>
44. R. Nistico, B. Mehdawy, S. Piccirilli and N. Mercuri, Paraquat- and rotenone-induced models of Parkinson's disease, *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **24** (2011) 313–322; <https://doi.org/10.1177/039463201102400205>
45. A. Barbeau, L. Dallaire, N. T. Buu, J. Poirier and E. Rucinska, Comparative behavioral, biochemical and pigmentary effects of MPTP, MPP+ and paraquat in rana pipiens, *Life Sci.* **37** (1985) 1529–1538; [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(85\)90185-7](https://doi.org/10.1016/0024-3205(85)90185-7)
46. P. M. Rappold, M. Cui, A. S. Chesser, J. Tibbett, J. C. Grima, L. Duan, N. Sen, J. A. Javitch and K. Tieu, Paraquat neurotoxicity is mediated by the dopamine transporter and organic cation transporter-3, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108** (2011) 20766–20771; <https://doi.org/10.1073/pnas.1115141108>
47. K. Shimizu, K. Ohtaki, K. Matsubara, K. Aoyama, T. Uezono, O. Saito, M. Suno, K. Ogawa, N. Hayase, K. Kimura and H. Shiono, Carrier-mediated processes in blood-brain barrier penetration

- and neural uptake of paraquat, *Brain Res.* **906** (2001) 135–142; [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)02577-X](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)02577-X)
48. C. Berry, C. La Vecchia and P. Nicotera, Cell death and differentiation – Paraquat and Parkinson's disease, *Cell Death Differ.* **17** (2010) 1115–1125; <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.217>
49. S. Bastías-Candia, J. M. Zolezzi and N. C. Inestrosa, Revisiting the paraquat-induced sporadic Parkinson's disease-like model, *Mol. Neurobiol.* **56** (2019) 1044–1055; <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1148-z>
50. J. Peng, X. O. Mao, F. F. Stevenson, M. Hsu and J. K. Andersen, The herbicide paraquat induces dopaminergic nigral apoptosis through sustained activation of the JNK pathway, *J. Biol. Chem.* **279** (2004) 32626–32632; <https://doi.org/10.1074/jbc.M404596200>
51. K. Ossowska, J. Wardas, M. Śmiałowska, K. Kuter, T. Lenda, J. M. Wierońska, B. Zięba, P. Nowak, J. Dąbrowska, A. Bortel, A. Kwieciński and S. Wolfarth, A slowly developing dysfunction of dopaminergic nigrostriatal neurons induced by long-term paraquat administration in rats: An animal model of preclinical stages of Parkinson's disease?, *Eur. J. Neurosci.* **22** (2005) 1294–1304; <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04301.x>
52. K. Muthukumaran, S. Leahy, K. Harrison, M. Sikorska, J. K. Sandhu, J. Cohen, C. Keshan, D. Lopatin, H. Miller, H. Borowy-Borowski, P. Lanthier, S. Weinstock and S. Pandey, Orally delivered water soluble coenzyme Q10 (Ubisol-Q10) blocks on-going neurodegeneration in rats exposed to paraquat: Potential for therapeutic application in Parkinson's disease, *BMC Neurosci.* **15** (2014) 21–32; <https://doi.org/10.1186/1471-2202-15-21>
53. A. L. McCormack, J. G. Atienza, J. W. Langston and D. A. Di Monte, Decreased susceptibility to oxidative stress underlies the resistance of specific dopaminergic cell populations to paraquat-induced degeneration, *Neuroscience* **141** (2006) 929–937; <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.03.069>
54. R. M. Lopachin and T. Gavin, Response to “Paraquat: The red herring of Parkinson's disease research,” *Toxicol. Sci.* **103** (2008) 219–221; <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfn028>
55. J. R. Richardson, Y. Quan, T. B. Sherer, J. T. Greenamyre and G. W. Miller, Paraquat neurotoxicity is distinct from that of MPTP and rotenone, *Toxicol. Sci.* **88** (2005) 193–201; <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi304>
56. M. Thiruchelvam, E. K. Richfield, R. B. Baggs, A. W. Tank and D. A. Cory-Slechta, The nigrostriatal dopaminergic system as a preferential target of repeated exposures to combined paraquat and maneb: Implications for Parkinson's disease, *J. Neurosci.* **20** (2000) 9207–9214; <https://doi.org/10.1523/jneurosci.20-24-09207.2000>
57. M. Thiruchelvam, E. K. Richfield, B. M. Goodman, R. B. Baggs and D. A. Cory-Slechta, Developmental exposure to the pesticides paraquat and maneb and the Parkinson's disease phenotype, *Neurotoxicology* **23** (2002) 621–633; [https://doi.org/10.1016/S0161-813X\(02\)00092-X](https://doi.org/10.1016/S0161-813X(02)00092-X)
58. S. Srivastav, B. G. Anand, M. Fatima, K. P. Prajapati, S. S. Yadav, K. Kar and A. C. Mondal, Piperine-coated gold nanoparticles alleviate paraquat-induced neurotoxicity in *Drosophila melanogaster*, *ACS Chem. Neurosci.* **11** (2020) 3772–3785; <https://doi.org/10.1021/acscemneuro.0c00366>
59. A. O. Correia, A. A. P. Cruz, A. T. R. de Aquino, J. R. G. Diniz, K. B. F. Santana and P. I. M. Cidade, J. D. Peixoto, D. L. Lucetti, M. E. P. Nobre, G. M. P. da Cruz, K. R. T. Neves and G. S. de Barros Viana, Neuroprotective effects of piperine, an alkaloid from the *Piper* genus, on the Parkinson's disease model in rats, *J. Neurol. Ther.* **1** (2015) 1–8; <https://doi.org/10.14312/2397-1304.2015-1>
60. H. Liu, R. Luo, X. Chen, J. Liu, Y. Bi, L. Zheng and X. Wu, Tissue distribution profiles of three antiparkinsonian alkaloids from *Piper longum* L. in rats determined by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* **928** (2013) 78–82; <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.03.021>
61. S. Bastías-Candia, M. Di Benedetto, C. D'Addario, S. Candeletti and P. Romualdi, Combined exposure to agriculture pesticides, paraquat and maneb, induces alterations in the N/OFQ-NOPr

- and PDYN/KOPr systems in rats: Relevance to sporadic Parkinson's disease, *Environ. Toxicol.* **30** (2015) 656–663; <https://doi.org/10.1002/tox.21943>
62. R. M. Miller, G. L. Kiser, T. Kaysser-Kranich, C. Casaceli, E. Colla, M. K. Lee, C. Palaniappan and H. J. Federoff, Wild-type and mutant α -synuclein induce a multi-component gene expression profile consistent with shared pathophysiology in different transgenic mouse models of PD, *Exp. Neurol.* **204** (2007) 421–432; <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2006.12.005>
63. L. C. Grandi, G. Di Giovanni and S. Galati, Animal models of early-stage Parkinson's disease and acute dopamine deficiency to study compensatory neurodegenerative mechanisms, *J. Neurosci. Methods* **308** (2018) 205–218; <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2018.08.012>
64. J. Langston, P. Ballard, J. Tetrud and I. Irwin, Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis, *Science* **219** (1983) 979–980; <https://doi.org/10.1126/science.6823561>
65. M. H. Yan, X. Wang and X. Zhu, Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease, *Free Radic. Biol. Med.* **62** (2013) 90–101; <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.11.014>
66. J. Bové and C. Perier, Neurotoxin-based models of Parkinson's disease, *Neuroscience* **211** (2012) 51–76; <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.10.057>
67. L. K. Klaidman, J. D. Adams, A. C. Leung, S. Sam Kim and E. Cadenas, Redox cycling of MPP⁺: Evidence for a new mechanism involving hydride transfer with xanthine oxidase, aldehyde dehydrogenase, and lipoamide dehydrogenase, *Free Radic. Biol. Med.* **15** (1993) 169–179; [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(93\)90056-Z](https://doi.org/10.1016/0891-5849(93)90056-Z)
68. V. Jackson-Lewis, M. Jakowec, R. E. Burke and S. Przedborski, Time course and morphology of dopaminergic neuronal death caused by the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, *Neurodegeneration* **4** (1995) 257–269; [https://doi.org/10.1016/1055-8330\(95\)90015-2](https://doi.org/10.1016/1055-8330(95)90015-2)
69. J. Blesa, S. Phani, V. Jackson-Lewis and S. Przedborski, Classic and new animal models of Parkinson's disease, *J. Biomed. Biotechnol.* **2012** (2012) Article ID 845618; <https://doi.org/10.1155/2012/845618>
70. S. Duty and P. Jenner, Animal models of Parkinson's disease: A source of novel treatments and clues to the cause of the disease, *Br. J. Pharmacol.* **164** (2011) 1357–1391; <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01426.x>
71. V. Jackson-Lewis and S. Przedborski, Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson's disease, *Nat. Protoc.* **2** (2007) 141–151; <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.342>
72. D. T. Stephenson, M. D. Meglasson, M. A. Connell, M. A. Childs, E. Hajos-Korcsok and M. E. Emborg, The effects of a selective dopamine D2 receptor agonist on behavioral and pathological outcome in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated squirrel monkeys, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **314** (2005) 1257–1266; <https://doi.org/10.1124/jpet.105.087379>
73. J. S. Schneider and C. J. Kovelowski, Chronic exposure to low doses of MPTP. I. Cognitive deficits in motor asymptomatic monkeys, *Brain Res.* **519** (1990) 122–128; [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)90069-N](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)90069-N)
74. D. S. Goldstein, S. T. Li, C. Holmes and K. Bankiewicz, Sympathetic innervation in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine primate model of Parkinson's disease, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **306** (2003) 855–860; <https://doi.org/10.1124/jpet.103.051714>
75. E. Garbayo, E. Ansorena, H. Lana, M. del M. Carmona-Abellan, I. Marcilla, J. L. Lanciego, M. R. Luquin and M. J. Blanco-Prieto, Brain delivery of microencapsulated GDNF induces functional and structural recovery in parkinsonian monkeys, *Biomaterials.* **110** (2016) 11–23; <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.09.015>
76. F. Blandini and M. T. Armentero, Animal models of Parkinson's disease, *FEBS J.* **279** (2012) 1156–1166; <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08491.x>
77. S. Sánchez-Iglesias, P. Rey, E. Méndez-Álvarez, J. L. Labandeira-García and R. Soto-Otero, Time-course of brain oxidative damage caused by intrastriatal administration of 6-hydroxydopamine

- in a rat model of Parkinson's disease, *Neurochem. Res.* 32 (2007) 99–105; <https://doi.org/10.1007/s11064-006-9232-6>
78. D. Hernandez-Baltazar, L. M. Zavala-Flores and A. Villanueva-Olivo, The 6-hydroxydopamine model and parkinsonian pathophysiology: Novel findings in an older model, *Neurología (English Ed.)* 32 (2017) 533–539; <https://doi.org/10.1016/j.nrleng.2015.06.019>
79. J. L. Venero, M. Revuelta, J. Cano and A. Machado, Time course changes in the dopaminergic nigrostriatal system following transection of the medial forebrain bundle: detection of oxidatively modified proteins in substantia nigra, *J. Neurochem.* 68 (2002) 2458–2468; <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.68062458.x>
80. D. Stanic, D. I. Finkelstein, D. W. Bourke, J. Drago and M. K. Horne, Time course of striatal re-innervation following lesions of dopaminergic SNpc neurons of the rat, *Eur. J. Neurosci.* 18 (2003) 1175–1188; <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02800.x>
81. M. Decressac, B. Mattsson and A. Björklund, Comparison of the behavioural and histological characteristics of the 6-OHDA and α -synuclein rat models of Parkinson's disease, *Exp. Neurol.* 235 (2012) 306–315; <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.02.012>
82. D. Hernandez-Baltazar, M. E. Mendoza-Garrido and D. Martinez-Fong, Activation of GSK-3 β and caspase-3 occurs in nigral dopamine neurons during the development of apoptosis activated by a striatal injection of 6-hydroxydopamine, *PLoS One* 8 (2013) e70951 (13 pages); <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070951>
83. G. Mercanti, G. Bazzu and P. Giusti, A 6-hydroxydopamine in vivo model of Parkinson's disease, *Methods Mol. Biol.* 846 (2012) 355–364; https://doi.org/10.1007/978-1-61779-536-7_30
84. K. Sakai and D. M. Gash, Effect of bilateral 6-OHDA lesions of the substantia nigra on locomotor activity in the rat, *Brain Res.* 633 (1994) 144–150; [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)91533-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)91533-4)
85. M. Healy-Stoffel, S. O. Ahmad, J. A. Stanford and B. Levant, A novel use of combined tyrosine hydroxylase and silver nucleolar staining to determine the effects of a unilateral intrastriatal 6-hydroxydopamine lesion in the substantia nigra: A stereological study, *J. Neurosci. Methods* 210 (2012) 187–194; <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2012.07.013>
86. J. T. Da Rocha, S. Pinton, B. M. Gai and C. W. Nogueira, Diphenyl diselenide reduces mechanical and thermal nociceptive behavioral responses after unilateral intrastriatal administration of 6-hydroxydopamine in rats, *Biol. Trace Elem. Res.* 154 (2013) 372–378; <https://doi.org/10.1007/s12011-013-9736-2>
87. A. Heuer, G. A. Smith, M. J. Lelos, E. L. Lane and S. B. Dunnett, Unilateral nigrostriatal 6-hydroxydopamine lesions in mice I: Motor impairments identify extent of dopamine depletion at three different lesion sites, *Behav. Brain Res.* 228 (2012) 30–43; <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.11.027>
88. D. Kirik, C. Rosenblad and A. Björklund, Characterization of behavioral and neurodegenerative changes following partial lesions of the nigrostriatal dopamine system induced by intrastriatal 6-hydroxydopamine in the rat, *Exp. Neurol.* 152 (1998) 259–277; <https://doi.org/10.1006/exnr.1998.6848>
89. H. S. Lindgren, M. J. Lelos and S. B. Dunnett, Do alpha-synuclein vector injections provide a better model of Parkinson's disease than the classic 6-hydroxydopamine model?, *Exp. Neurol.* 237 (2012) 36–42; <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.05.022>
90. P. Qiu, H. Wang, Y. Tai, L. Chen, E. Huang, C. Liu and X. Yang, Protective effect of alpha-synuclein knockdown on methamphetamine-induced neurotoxicity in dopaminergic neurons, *Neural Regen. Res.* 9 (2014) 951–958; <https://doi.org/10.4103/1673-5374.133146>
91. Q. He, J. B. Koprach, Y. Wang, W. B. Yu, B. G. Xiao, J. M. Brotchie and J. Wang, Treatment with trehalose prevents behavioral and neurochemical deficits produced in an AAV α -synuclein rat model of Parkinson's disease, *Mol. Neurobiol.* 53 (2016) 2258–2268; <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9173-7>

92. L. F. Razgado-Hernandez, A. J. Espadas-Alvarez, P. Reyna-Velazquez, A. Sierra-Sanchez, V. Anaya-Martinez, I. Jimenez-Estrada, M. J. Bannon, D. Martinez-Fong and J. Aceves-Ruiz, The transfection of BDNF to dopamine neurons potentiates the effect of dopamine D3 receptor agonist recovering the striatal innervation, dendritic spines and motor behavior in an aged rat model of Parkinson's disease, *PLoS One* **10** (2015) e0117391 (25 pages); <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117391>
93. R. Pahuja, K. Seth, A. Shukla, R. K. Shukla, P. Bhatnagar, L. K. S. Chauhan, P. N. Saxena, J. Arun, B. P. Chaudhari, D. K. Patel, S. P. Singh, R. Shukla, V. K. Khanna, P. Kumar, R. K. Chaturvedi and K. C. Gupta, Trans-blood brain barrier delivery of dopamine-loaded nanoparticles reverses functional deficits in parkinsonian rats, *ACS Nano* **9** (2015) 4850–4871; <https://doi.org/10.1021/nn506408v>
94. C. Bishop, J. L. Taylor, D. M. Kuhn, K. L. Eskow, J. Y. Park and P. D. Walker, MDMA and fenfluramine reduce L-DOPA-induced dyskinesia via indirect 5-HT1A receptor stimulation, *Eur. J. Neurosci.* **23** (2006) 2669–2676; <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04790.x>
95. T. Ren, X. Yang, N. Wu, Y. Cai, Z. Liu and W. Yuan, Sustained-release formulation of levodopa methyl ester/benserazide for prolonged suppressing dyskinesia expression in 6-OHDA-lesioned rats, *Neurosci. Lett.* **502** (2011) 117–122; <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2011.07.042>
96. A. Azeem, S. Talegaonkar, L. M. Negi, F. J. Ahmad, R. K. Khar and Z. Iqbal, Oil based nanocarrier system for transdermal delivery of ropinirole: A mechanistic, pharmacokinetic and biochemical investigation, *Int. J. Pharm.* **422** (2012) 436–444; <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.10.039>
97. N. Giladi, B. Borojerd, A. D. Korczyn, D. J. Burn, C. E. Clarke and A. H. V. Schapira, Rotigotine transdermal patch in early Parkinson's disease: A randomized, double-blind, controlled study versus placebo and ropinirole, *Mov. Disord.* **22** (2007) 2398–2404; <https://doi.org/10.1002/mds.21741>
98. O. K. Sujith and C. Lane, Therapeutic options for continuous dopaminergic stimulation in Parkinson's disease, *Ther. Adv. Neurol. Disord.* **2** (2009) 105–113; <https://doi.org/10.1177/1756285608101378>
99. A. Wang, L. Wang, K. Sun, W. Liu, C. Sha and Y. Li, Preparation of rotigotine-loaded microspheres and their combination use with L-DOPA to modify dyskinesias in 6-OHDA-lesioned rats, *Pharm. Res.* **29** (2012) 2367–2376; <https://doi.org/10.1007/s11095-012-0762-0>
100. M. J. Tsai, Y. Bin Huang, P. C. Wu, Y. S. Fu, Y. R. Kao, J. Y. Fang and Y. H. Tsai, Oral apomorphine delivery from solid lipid nanoparticles with different monostearate emulsifiers: Pharmacokinetic and behavioral evaluations, *J. Pharm. Sci.* **100** (2011) 547–557; <https://doi.org/10.1002/jps.22285>
101. E. Garbayo, E. Ansorena, J. L. Lanciego, M. J. Blanco-Prieto and M. S. Aymerich, Long-term neuroprotection and neurorestoration by glial cell-derived neurotrophic factor microspheres for the treatment of Parkinson's disease, *Mov. Disord.* **26** (2011) 1943–1947; <https://doi.org/10.1002/mds.23793>
102. P. H. Yang, J. X. Zhu, Y. D. Huang, X. Y. Zhang, P. Lei, A. I. Bush, Q. Xiang, Z. J. Su and Q. H. Zhang, Human basic fibroblast growth factor inhibits tau phosphorylation via the PI3K/Akt-GSK3 β signaling pathway in a 6-hydroxydopamine-induced model of Parkinson's disease, *Neurodegener. Dis.* **16** (2016) 357–369; <https://doi.org/10.1159/000445871>
103. Y. Z. Zhao, X. Li, C. T. Lu, M. Lin, L. J. Chen, Q. Xiang, M. Zhang, R. R. Jin, X. Jiang, X. T. Shen, X. K. Li and J. Cai, Gelatin nanostructured lipid carriers-mediated intranasal delivery of basic fibroblast growth factor enhances functional recovery in hemiparkinsonian rats, *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **10** (2014) 755–764; <https://doi.org/10.1016/j.nano.2013.10.009>
104. E. Herrán, J. A. Ruiz-Ortega, A. Aristieta, M. Igartua, C. Requejo, J. V. Lafuente, L. Ugedo, J. L. Pedraz and R. M. Hernández, In vivo administration of VEGF- and GDNF-releasing biodegradable polymeric microspheres in a severe lesion model of Parkinson's disease, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **85** (2013) 1183–1190; <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.03.034>



**VII. EVALUACIÓN DE LAS
FORMULACIONES SELECCIONADAS EN UN
MODELO ANIMAL INDUCIDO
POR ROTENONA**

La eficacia de los dos nuevos sistemas de liberación controlada seleccionados (MP-TC4 y NP-TC3), tal como se ha indicado, se han evaluado en un modelo animal de EP inducido por RT en ratas.

1. PRUEBAS EN ANIMALES

En los ensayos se han utilizado ratas Wistar macho de peso inicial comprendido entre 180 g y 220 g (Harlan, Francia). Los experimentos se han realizado cumpliendo con los principios de las 3R (Reducción, Reemplazo y Refinamiento). Los animales se alojaron en jaulas a 22±2°C en condiciones habituales de laboratorio y bajo ciclos estándares de luz-oscuridad. A los animales se les administró comida y agua *ad libitum*. Para minimizar el dolor y la incomodidad se aplicaron todas las medidas adecuadas para minimizar el número de animales utilizados. Todos los procedimientos experimentales de este estudio fueron aprobados por el Comité de Ética para la experimentación con animales de la Universidad Complutense (permiso PROEX 14/18) y realizados de acuerdo con las recomendaciones para el cuidado y uso de animales de experimentación y de acuerdo con la ley española (R.D. 1201/05).

2. TRATAMIENTOS Y GRUPOS DE ANIMALES

La neurotoxina utilizada, rotenona (RT) se disolvió en aceite de girasol antes de su administración por vía intraperitoneal (Fernández *et al.*, 2012).

Los animales de experimentación, ratas, se dividieron en los siguientes grupos:

- **Grupo 1 (G1):** Grupo control. Animales (n = 8) que recibieron únicamente los vehículos; aceite de girasol (grupo G1A, n = 4) o solución salina (grupo G1B, n = 4), durante 43 días.
- **Grupo 2 (G2):** Animales (n = 8) a los que se les administró en RT (2 mg /kg/día) durante 43 días (G2).
- **Grupo 3 (G3):** Animales (n = 8) que recibieron RT (2 mg/kg/día) durante 43 días y la cantidad de MPs equivalente a 3 mg/kg/día de TC cada 14 días a partir del día 15 de iniciado el estudio.

- **Grupo 4 (G4):** Animales (n = 8) que recibieron RT (2 mg/kg/día) durante 43 días y la cantidad de NPs equivalente a 3 mg/kg/día de TC cada 3 días a partir del día 15 de iniciado el tratamiento.
- **Grupo 5 (G5):** Animales (n = 8) que recibieron RT (2 mg /kg/día) durante 43 días y TC en solución salina (3 mg/kg/día) a partir del día 15 de comienzo del tratamiento.

La selección de las dosis ensayadas se realizó en base a experimentos previos llevados a cabo en nuestro laboratorio. Las formulaciones seleccionadas (MP-TC4 y NP-TC3) (Tabla 7) fueron administradas por vía intraperitoneal (i.p) en cantidades apropiadas, teniendo en cuenta el peso del animal y la eficacia de encapsulación obtenida para cada formulación (Tabla 7). La RT se administró disuelta en aceite de girasol y, las MPs y Nps suspendidas en solución salina. Después de 44 días, los animales se sacrificaron por decapitación, utilizando para ello una guillotina.

3. EVALUACIÓN DEL PESO CORPORAL

A tiempos preestablecidos (días 1, 5, 10, 14, 20, 26, 30, 35, 40 y 44) se pesaron los animales para evaluar los cambios que se iban produciendo a lo largo del estudio.

4. PRUEBAS DE COMPORTAMIENTO

4.1. Prueba de Catalepsia

Las pruebas de catalepsia (rejilla y barra) se realizaron a tiempos predeterminados (días 16, 25, 35 y 44). Para la realización de las pruebas de catalepsia en rejilla, los animales se colgaron de las cuatro patas de una rejilla situada verticalmente (25,5x44 cm, con un espacio de 1 cm entre cada alambre), y cuando el animal realizó el primer movimiento (movimiento de una pata) se registró el tiempo en segundos. Este tiempo corresponde al tiempo de latencia.

El ensayo de catalepsia en barra se realizó de acuerdo con el siguiente procedimiento; se colocó una barra en posición horizontal a 10 cm de una superficie elevada. En el ensayo las ratas se colocaron con ambas patas delanteras en la barra en una posición de medio levantamiento. Se determinó el tiempo que la rata tarda en cambiar su posición forzada inicial.

El tiempo máximo para ambas pruebas de catalepsia se fijó en 180 segundos. Las pruebas de catalepsia se realizaron por triplicado para cada animal, a los tiempos indicados.

4.2. Prueba de Aquinesia

Una de las anomalías motoras de la enfermedad de Parkinson es el retraso en el inicio del movimiento. Dicho retraso puede estimarse mediante la realización de la prueba de aquinesia. Las pruebas de aquinesia se realizaron a tiempos predeterminados (días 16, 25, 35 y 44). Para ello, los animales se colocaron durante 5 min (periodo de adaptación) en una plataforma elevada (100 cm) (100x150 cm) y se midió el tiempo (segundos) que los animales tardan en mover las 4 extremidades. La prueba concluye cuando la latencia supera los 180 segundos. Las pruebas de aquinesia se realizaron por triplicado para cada animal a los tiempos indicados.

4.3. Prueba de Natación

Las pruebas de natación se realizaron los días 16, 25, 35 y 44 del estudio, según el procedimiento descrito por Haobam y col. (Haobam *et al.*, 2005), adaptado a nuestras condiciones experimentales. Los animales de cada grupo fueron entrenados para la prueba de natación colocándolos en el baño de agua (40x40x40 cm) a una temperatura de $27\pm 2^{\circ}\text{C}$. Los criterios de puntuación de la prueba de natación fueron los siguientes:

Puntuación 0: la rata nada con la parte trasera hundida y la cabeza flotando.

Puntuación 1: la rata nada ocasional con las extremidades traseras mientras flota de un lado.

Puntuación 2: la rata ocasionalmente nada/flota.

Puntuación 3: la rata no es capaz de nadar.

La prueba de natación se realizó por triplicado para cada animal a los distintos tiempos.

5. EVALUACIONES INMUNOHISTOQUÍMICAS

5.1. Procesamiento Cerebral

Al final del estudio (44 días) los animales se sacrificaron por decapitación. Inmediatamente después se extrajeron los cerebros, se congelaron en hielo seco y se almacenaron a -80°C hasta su análisis. Posteriormente se obtuvieron cortes de cerebro (30 µm de espesor), tanto del cuerpo estriado como de la sustancia nigra, utilizando para ello un criostato (Leica CM1850, Leica Biosystems, Alemania). Todos los cortes de cerebro se montaron sobre portaobjetos Superfrost Plus (Thermo Scientific, Alemania), se secaron a 36°C en una placa caliente y se mantuvieron congelados a -80°C, hasta su análisis.

5.2. Tinción de NISSL

Para la realización de la tinción de Nissl, los cortes de cerebro se fijaron sobre portaobjetos con formaldehído al 4% en tampón fosfato a pH 7,4. A continuación, las muestras se lavaron dos veces con tampón fosfato y se sumergieron en una solución ácida de violeta de cresilo al 0,5% durante 30 min. Posteriormente, las muestras se lavaron con agua destilada y se deshidrataron utilizando soluciones de concentración creciente de etanol (70%, 95% y 100%). Los cortes se trataron finalmente con xileno (dos veces durante 5 min cada vez) y se cubrieron con un cubreobjetos con el medio de montaje orgánico DPX (resina acrílica con base de xileno) (Sigma-Aldrich, España). Finalmente, una vez secas las preparaciones, se obtuvieron imágenes histológicas de la sustancia nigra con una cámara digital (cámara DFC425, Leica, Alemania) acoplada a un microscopio óptico (Leitz Laborlux S, Leica, Alemania).

5.3. Ensayo Inmunohistoquímico de la TH

En los ensayos inmunohistoquímico de TH (tirosina hidroxilasa) se siguió un procedimiento estándar. Después de fijar, permeabilizar con Tween 20 al 0,1% en TBS (solución salina tamponada con Tris), lavar y bloquear las muestras, se les añadió el anticuerpo TH (dilución 1: 500, Sigma-Aldrich, EE. UU.). Tras una noche de incubación a 4°C, los portaobjetos que contenían los córtex se lavaron con TBS/Tween 20 al 0,1% (3 veces durante 5 minutos, a temperatura ambiente) y luego se añadió el correspondiente anticuerpo secundario marcado con FITC (isotiocianato de fluoresceína) (dilución 1: 500; Sigma-Aldrich, EE. UU.). Finalmente,

después de la incubación (2 horas a temperatura ambiente) y lavado, los portaobjetos se montaron con medio acuoso Mowiol y se observaron con un microscopio de fluorescencia (Leica DM2000LED, Alemania). Las imágenes digitales se capturaron utilizando el filtro FITC (Leica DFC 3000G, Alemania).

5.4. Ensayo Inmunohistoquímico de la GFAP

La inmunohistoquímica de GFAP (proteína ácida fibrilar glial) se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito por García-García y colaboradores (García-García *et al.*, 2015) con modificaciones menores. Las muestras se fijaron con formaldehído al 4%, se lavaron, se permeabilizaron en TBS/Tween 20 al 0,1% y se bloquearon en albúmina al 5% disuelta en TBS. Posteriormente, los portaobjetos se incubaron durante la noche a 4°C con un anticuerpo anti-GFAP fluorescente conjugado con el colorante de cianina Cy3 (dilución 1:500; Sigma-Aldrich, EE.UU.), eliminando la necesidad de utilizar un anticuerpo secundario. Después de lavar para eliminar el anticuerpo no unido, las secciones de cerebro se cubrieron con un medio de montaje acuoso Mowiol. Finalmente, se obtuvieron imágenes digitales con una cámara digital de fluorescencia (Leica DFC 3000G, Alemania) acoplada a un microscopio (Leica DM2000LED, Alemania) utilizando un filtro de isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC).

6. PROCESAMIENTO DE ÓRGANOS

Tras el sacrificio de los animales se procedió a la extracción de los hígados para su análisis y visualización macroscópica.

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se expresan como media \pm error estándar de la media (D.E.). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía. La significación estadística se definió como $p < 0,05$. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando el software Statgraphics® Plus v. 5.1 (John Wiley and Sons, EE.UU.). Se analizaron los resultados de catalepsia y aquinesia (barra y rejilla) para determinar la significación estadística mediante análisis no paramétricos (ANOVA multifactorial de Kruskal-Wallis- ANOVA de una vía).

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LA EVALUACIÓN DE LAS FORMULACIONES SELECCIONADAS (MP-TC4 Y NP-TC3) EN UN MODELO ANIMAL DE PARKINSON INDUCIDO POR ROTENONA

En esta parte de la presente memoria experimental hemos evaluado la eficacia terapéutica de las formulaciones seleccionadas (MP-TC4 and NP-TC3) en un modelo animal de Parkinson inducido por RT. En los animales de experimentación se han realizados análisis de comportamiento y estudios histológicos e inmunoquímicos.

Tal como hemos indicado previamente, la EP se caracteriza por una degeneración progresiva y selectiva de las neuronas dopaminérgicas del SNC, dando lugar a trastornos del movimiento. Así, la reducción de la actividad dopaminérgica causa síntomas parkinsonianos como rigidez (tensión muscular específica), bradiquinesia (movimiento lento) y aquinesia (incapacidad para moverse). Este estado se manifiesta en las ratas como catalepsia. Por tanto, las pruebas de comportamiento resultan útiles en los estudios de evaluación de nuevos sistemas terapéuticos diseñados para el tratamiento del Parkinson. Además, la evaluación histológica e inmunoquímica permiten estudiar la evolución de la enfermedad después de los tratamientos.

En nuestro estudio, la mortalidad se produjo en el 12,3% de los animales tratados con RT y no se produjeron muertes en los animales de control. Cannon y col. (Cannon *et al*, 2009) cuando utilizan RT disuelta en DMSO (2,75-3 mg / kg / día) obtienen valores una mortalidad del 10% de los animales a los pocos minutos de llevar a cabo la administración de RT. Zhang y colaboradores (Zhang *et al.*, 2017) al evaluar el efecto de la administración de RT a dos dosis (2 y 2,5 mg/kg) obtuvieron una mortalidad del 46,7% con la dosis más alta en comparación con solo el 6,7% con la dosis más baja ensayada. En nuestro caso ninguno de los animales murió poco después de la inyección. Probablemente, este hecho es debido a que se utilizó la dosis 2 mg/kg/día y a la menor toxicidad del vehículo utilizado en nuestro estudio (aceite de girasol).

Por otra parte, es necesario indicar que la pérdida de peso es una característica común de los pacientes de EP, que presentan disfunción gastrointestinal. Dicha pérdida de peso está directamente relacionada con la degeneración del sistema nervioso entérico, que generalmente se produce durante la progresión de la enfermedad (Pfeiffer, 2003)

La figura 38 muestra la evolución del peso corporal de los animales de experimentación a los distintos tiempos de estudios. Los animales pertenecientes a los grupos de control (G1A y

G1B), que corresponden a los que recibieron los vehículos (aceite de girasol o suero fisiológico) experimentaron una ganancia de peso gradual y constante a lo largo del estudio. Además, no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre ambos grupos control (G1A y G1B). Los animales tratados sólo con RT (grupos G2) mostraron un aumento muy leve de peso durante los primeros 10 días. Posteriormente, se observa que los pesos permanecen constantes debido al avance progresivo de la neurogeneración. Al final del estudio, los pesos de estos animales fueron ligeramente superiores al peso inicial. El peso de los animales tratados con RP (grupos G3 a G5) resultaron ser mayores a los obtenidos en el grupo de animales que recibieron sólo RT, debido a la combinación de la neurodegeneración producida por RT y el tratamiento con TC.

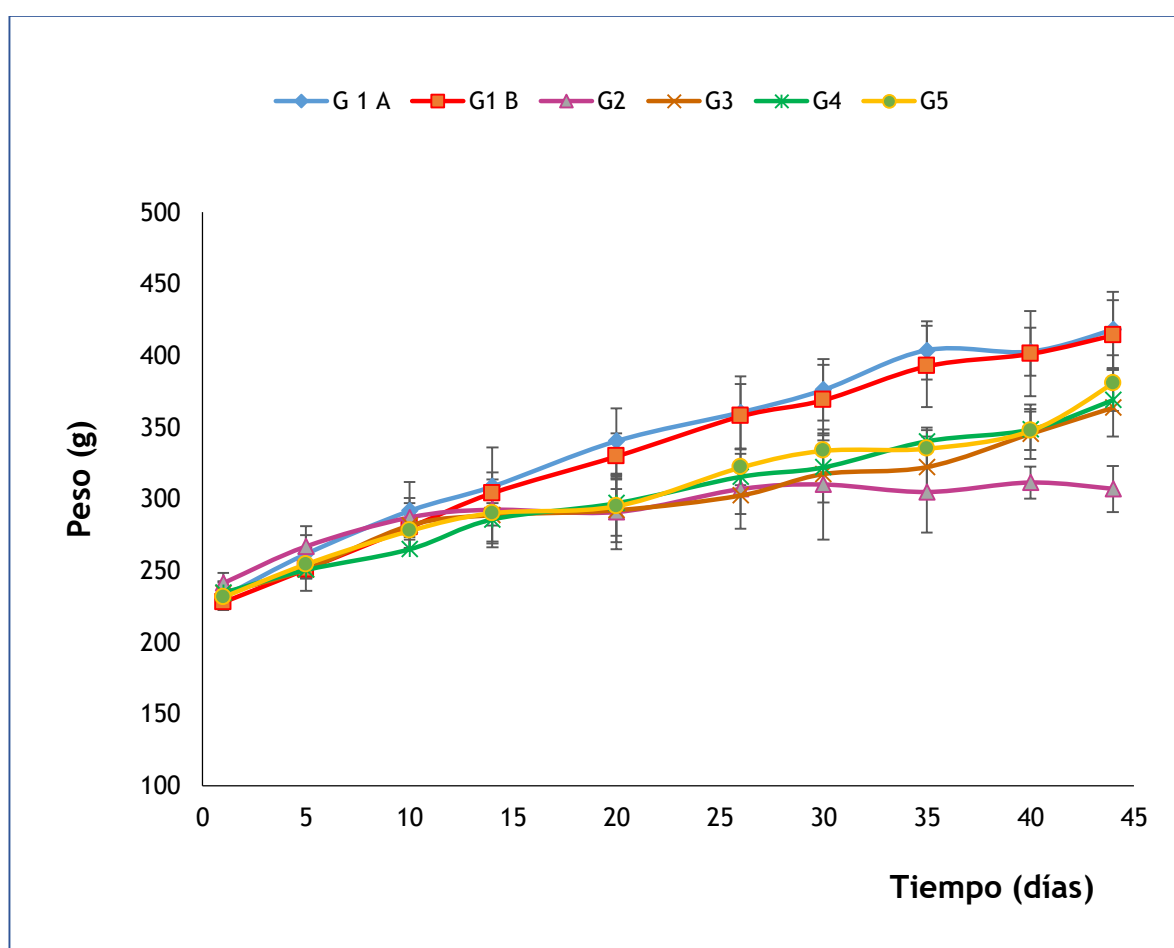


Figura 38. Evolución de los pesos de las ratas (valores medios \pm DE) durante el estudio (44 días). G1: grupo control; G2: grupo tratados con rotenona; grupos G3 a G5 tratados con rotenona y: G3 tratados con MPs cargadas con TC en cantidad equivalente a una dosis de 45 mg de TC cada 15 días, G4 tratados con NPs cargadas con TC en cantidad equivalente a una dosis de 9 mg de TC cada 3 días y G5 tratados con TC en solución (3 mg/Kg/día) durante 43 días. TC (tolcapona), MPs (micropartículas) y NPs: (nanopartículas).

La TC es un coadyuvante eficaz en el tratamiento de la EP en la mejora de las fluctuaciones motoras, de ahí la importancia de utilizar modelos animales que permitan determinar las modificaciones de comportamiento en el animal, como catalepsia, aquinesia y natación.

En la figura 39 se muestran los resultados obtenidos en la prueba de catalepsia (rejilla y barra) a los 16, 25, 35 y 44 días del estudio.

Los valores de latencia obtenidos con ambos vehículos; aceite de girasol (G1A) o la solución salina (G1B) no presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$). Sin embargo, si se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los valores de latencia entre los animales tratados con RT (G2) y los animales del grupo control (G1A y G1B).

La neurotoxina (RT) indujo un aumento en la latencia tanto las pruebas de catalepsia en la rejilla como en la de barra que revirtió cuando se administró TC (G3, G4 y G5).

Los mejores resultados se obtuvieron en el grupo G4 que corresponde a los animales que recibieron NPs de PLGA cargas con TC. En este grupo no se obtuvieron diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al grupo control.

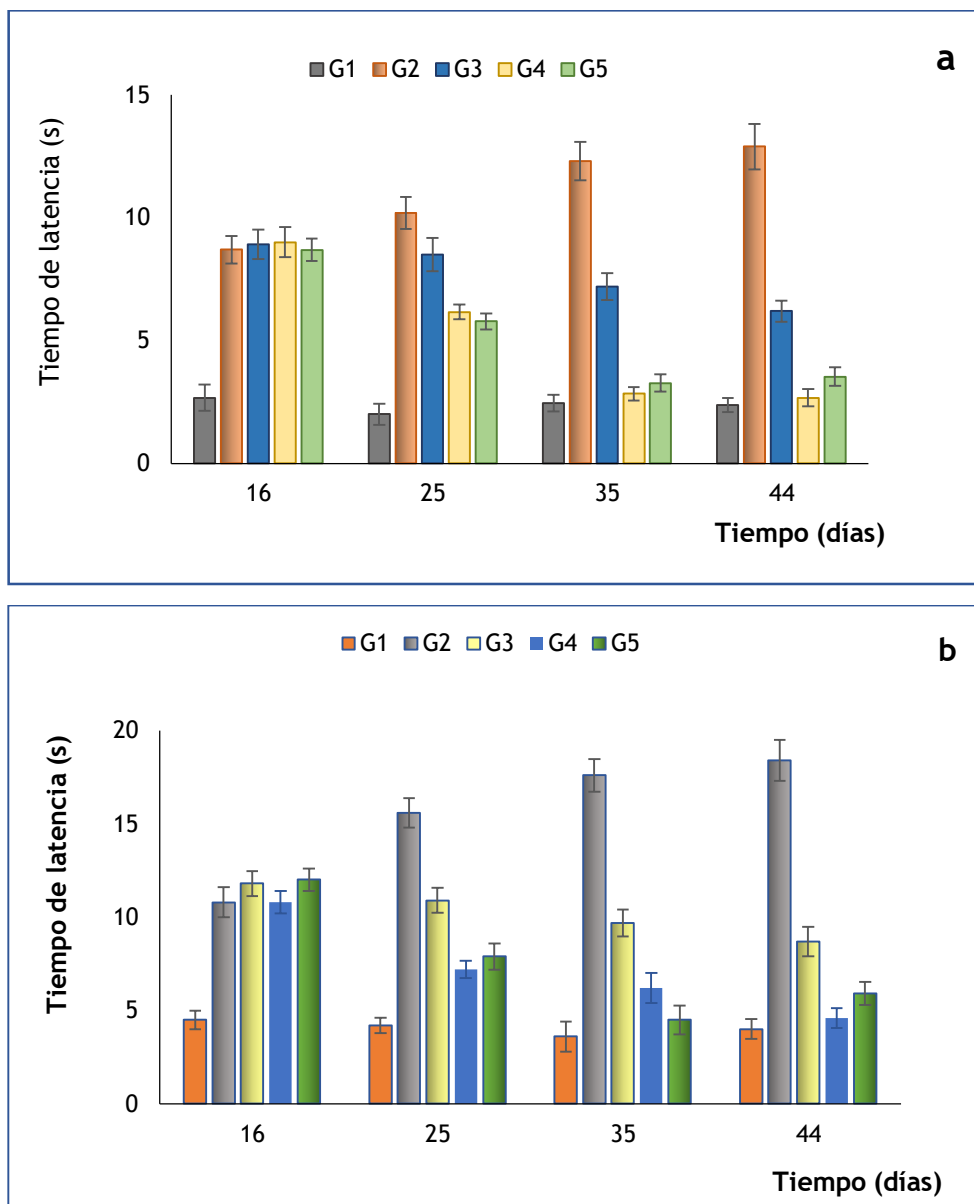


Figura 39. Resultados medios obtenidos \pm DE obtenidos en los ensayos de catalepsia a: barra y b: rejilla. G1: grupo control; G2: grupo tratados con rotenona; grupos G3 a G5 tratados con rotenona y G3 tratados con MPs en cantidad equivalente a una dosis de 45 mg de TC cada 15 días, G4 tratados con NPs en cantidad equivalente a una dosis de 9 mg de TC cada 3 días y G5 tratados con TC en solución (3 mg/Kg/día) durante 43 días. TC (tolcapona), MPs (micropartículas) y NPs (nanopartículas).

En la figura 40 se muestran los resultados obtenidos para la prueba de aquinesia, no observándose diferencias significativas entre ambos subgrupos del grupo control (G1A y G1B). A todos los tiempos estudiados, la administración de RT (grupo G2) prolongó significativamente la

latencia en comparación con el control G1 (G1A y G1B), con un valor medio de latencia alrededor de 7 veces mayor en el grupo G2 respecto al control (G1A y G1B) al final del ensayo (44 días).

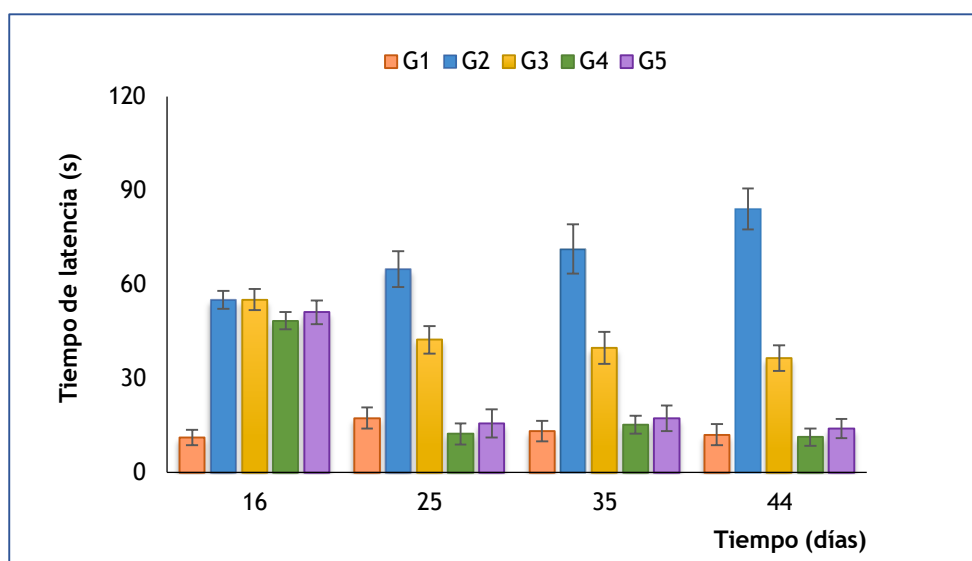


Figura 40. Resultados medios obtenidos \pm DE obtenidos en los ensayos de aquinesia. G1: grupo control; G2: grupo tratados con rotenona; grupos G3 a G5 tratados con rotenona y: G3 tratados con MPs en cantidad equivalente a una dosis de 45 mg de TC cada 15 días, G4 tratados con NPs en cantidad equivalente a una dosis de 9 mg de TC cada 3 días y G5 tratados con TC en solución (3 mg/Kg/día) durante 43 días. TC (tolcapona), MPs (micropartículas) y NPs (nanopartículas).

En los todos grupos de animales que recibieron TC (grupos G3, G4 y G5) se observó una reversión de la aquinesia a los 25, 35 y 44 días. Al final del estudio (44 días) en los grupos G4 y G5 se obtuvieron valores de latencia similares a los del grupo control (G1), no observándose diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los valores obtenidos en los G4 y G5. En el caso del grupo G5, este hecho podría deberse a que los animales de dicho grupo han recibieron la solución de TC el día anterior a la realización de las pruebas, lo que indica que la formulación provoca un efecto muy rápido en el cerebro. Los resultados obtenidos en el grupo G4 que recibieron NPs cargadas con TC, confirman el rápido acceso de la TC al cerebro y la capacidad de las NPs para mantener el efecto de forma más prolongada que la solución.

La prueba de natación se realizó con el fin valorar el déficit/capacidad motora general del animal en el modelo de rotenona (Sindhu *et al.*, 2005). Los resultados obtenidos en esta prueba se muestran en la figura 41. A todos los tiempos ensayados, todos los animales del grupo control (G1,

correspondiente a G1A y G1B) mostraron la puntuación más alta (puntuación = 3) (Figura 41). La capacidad de natación de los animales tratados con RT (grupo G2) disminuyó significativamente en comparación con el grupo de control ($p < 0,05$) (figura 41, G2 vs G1). Al final del estudio, todos los animales que recibieron TC (grupos G3, G4 y G5) mostraron puntuaciones de natación más altas que el grupo tratado únicamente con RT (puntuación > 2). Únicamente, los animales del grupo G4 obtuvieron la máxima puntuación (puntuación 3) que resultaron iguales a las obtenidas en los animales del grupo control.

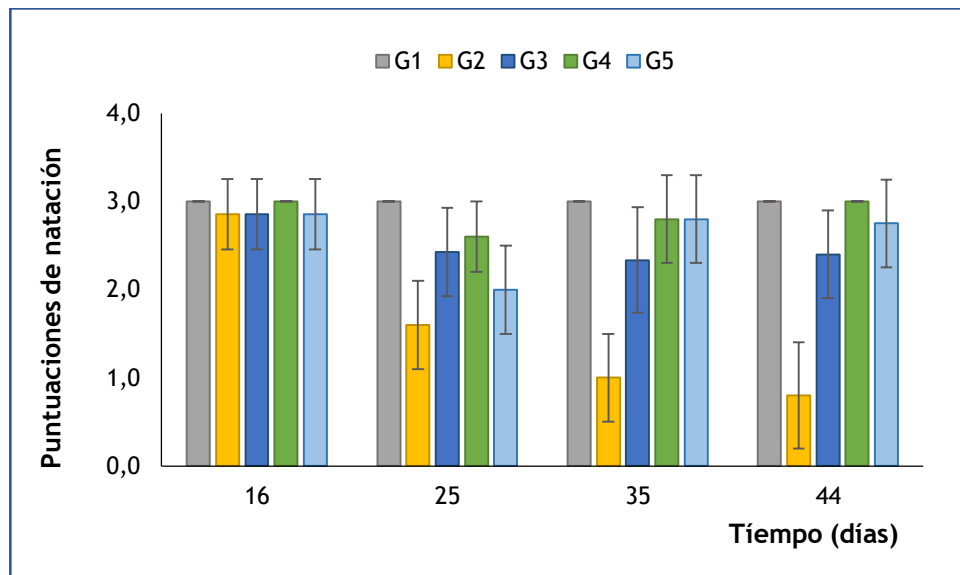


Figura 41. Resultados medios \pm DE obtenidos en las pruebas de natación. G1: grupo control; G2: grupo tratados con rotenona; grupos G3 a G5 tratados con rotenona y: G3 tratados con MPs en cantidad equivalente a una dosis de 45 mg de TC cada 15 días, G4 tratados con NPs en cantidad equivalente a una dosis de 9 mg de TC cada 3 días y G5 tratados con TC en solución (3 mg/Kg/día) durante 43 días. TC (tolcapona), MPs (micropartículas) y NPs (nanopartículas).

El método histológico de tinción de Nissl se utiliza ampliamente para estudiar la morfología y patología de las neuronas, ya que el colorante utilizado se une al ADN de los núcleos y al ARN del citoplasma de las células y permite estudiar la citoarquitectura del cerebro (Pilati *et al.*, 2008). Para observar los efectos de la RT y de las diferentes formulaciones sobre la pérdida neuronal en el SNpc, se realizó la tinción de Nissl. Las imágenes obtenidas se muestran en la figura 42. La rotenona es altamente lipofílica, por lo que atraviesa fácilmente todas las membranas biológicas, incluida la barrera hematoencefálica y ha sido ampliamente utilizada para desarrollar modelos animales de EP. La administración sistémica de RT produce degeneración progresiva crónica de la vía nigroestriatal, similar a lo que se observa en los pacientes con EP (Cannon *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2017). La administración de RT produce las modificaciones conductuales e

histopatológicos característicos de la EP, incluida una pérdida de células neuronales en SNpc (Tapias *et al.*, 2013; Swarnkar *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2019). La administración de TC en solución (grupo G5) o encapsulada, en MPs (grupo G3) o NPs (grupo G4), previene la muerte celular inducida por RT en el SNpc. Este efecto resultó ser más marcado cuando se administra TC en forma de NPs, lo que confirma la utilidad de dicho sistema para mejorar el acceso de la TC al cerebro.

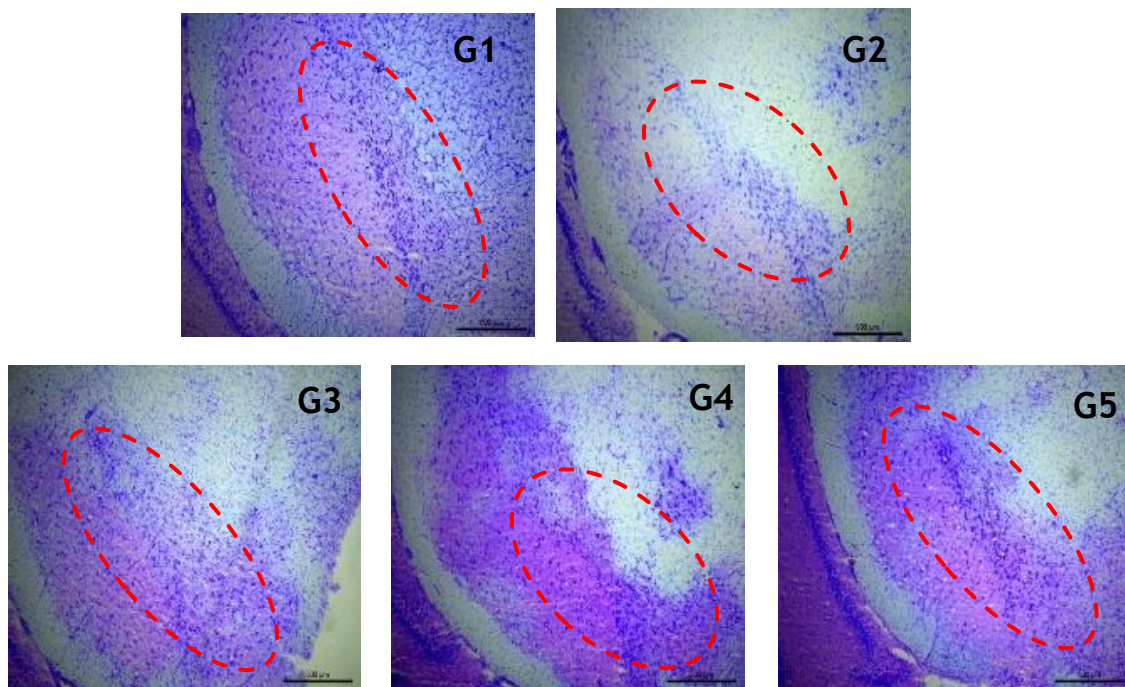


Figure 42. *Imágenes obtenidas tras la tinción de Nissl de cortes de cerebro (sustancia nigra pars compacta, 40 μ m) correspondientes a todos los grupos de animales.*

La enfermedad de Parkinson es un trastorno neurodegenerativo frecuente que, tal como se ha indicado previamente, se caracteriza por la pérdida progresiva de las neuronas dopaminérgicas en la SNpc. La pérdida de estas neuronas se asocia con una respuesta glial compuesta principalmente por células microgliales activadas y, en menor medida, por astrocitos reactivos (Vila *et al.*, 2001). La proteína fibrilar ácida de la glía, también llamada filamentos gliales o proteína gliofibrilar ácida (GFAP), es una de las proteínas fibrosas que forman los filamentos intermedios del citoesqueleto intracelular, particularmente de las células gliales. La respuesta glial puede ser la fuente de factores tróficos y puede proteger contra especies reactivas de oxígeno y glutamato. Además, cuando se produce una lesión cerebral, una respuesta astrocítica lenta puede mantener la activación de la microglía y eventualmente conducir a una lesión cerebral crónica (Gao *et al.*, 2013). Por este motivo, y con el fin de mostrar si existe una posible activación

astrocítica asociada a la neurodegeneración de la RT, se realizaron estudios inmunohistoquímicos no cuantitativos de GFAP (figura 43). La administración de RT a una dosis de 2 mg/Kg/día durante 43 días (G2) produjo una gliosis intensa. Estos resultados están de acuerdo con los resultados obtenidos por otros autores que observaron que cuando se utiliza la RT como neurotoxina se produce una activación astrocítica tanto *in vitro* (Swarnkar *et al.*, 2012) como *in vivo* (Tapias *et al.*, 2013). Esta respuesta astrocítica se manifestó con una fuerte hipertrofia y enrosamiento de los cuerpos celulares (grupo G2). Estas características se consideran típicas de la astrogliosis reactiva (Sofroniew y Vinters, 2010). Los mecanismos implicados en el daño cerebral inducido por astrocitos activados son múltiples, incluido el estrés oxidativo al incrementar la producción de ROS (Thomas *et al.*, 2004) y la liberación de citoquinas proinflamatorias (Gómez *et al.*, 2007; Choi *et al.*, 2015).

En la figura 44 se muestran los resultados de gliosis obtenidos y sus desviaciones estándares, expresadas como porcentaje respecto al grupo control (grupo G1). A los 44 días del estudio, la gliosis más intensa se observó en el grupo que recibió sólo RT (grupo G2). Además, esta respuesta astrocítica revirtió en los grupos de animales tratados con TC, tanto encapsulada (grupos G3 y G4) o como en solución (grupo G5). Pero sólo para aquellos que en recibieron NPs de PLGA cargadas con TC (grupo G4), la reversión fue completa. En este grupo no se observaron diferencias significativas respecto al control (grupo G1) ($p < 0,05$).

En la evaluación macroscópica de los órganos (hígados) no se observaron alteraciones en los grupos tratados con TC, aunque se están realizando estudios más exhaustivos para confirmar estos resultados.

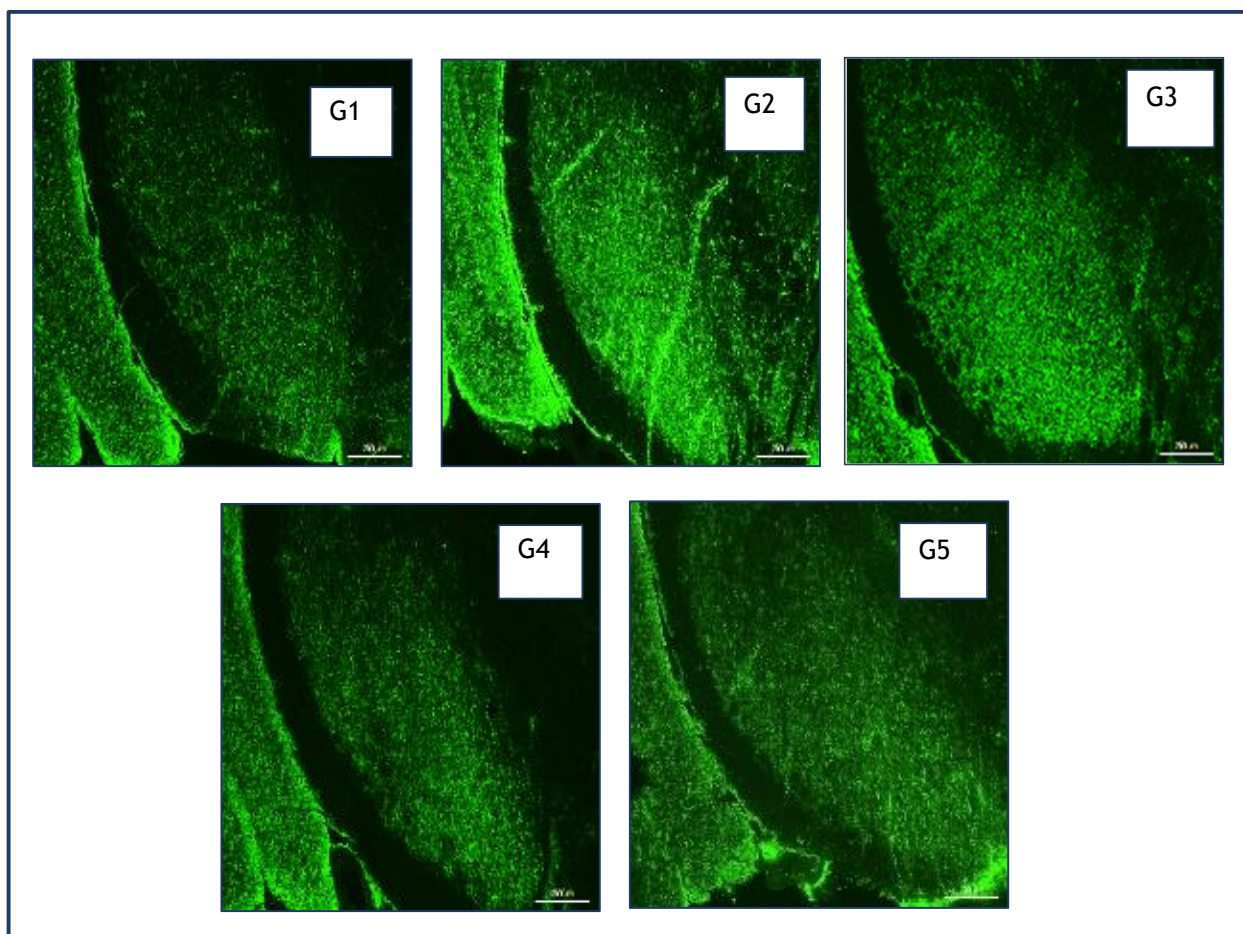
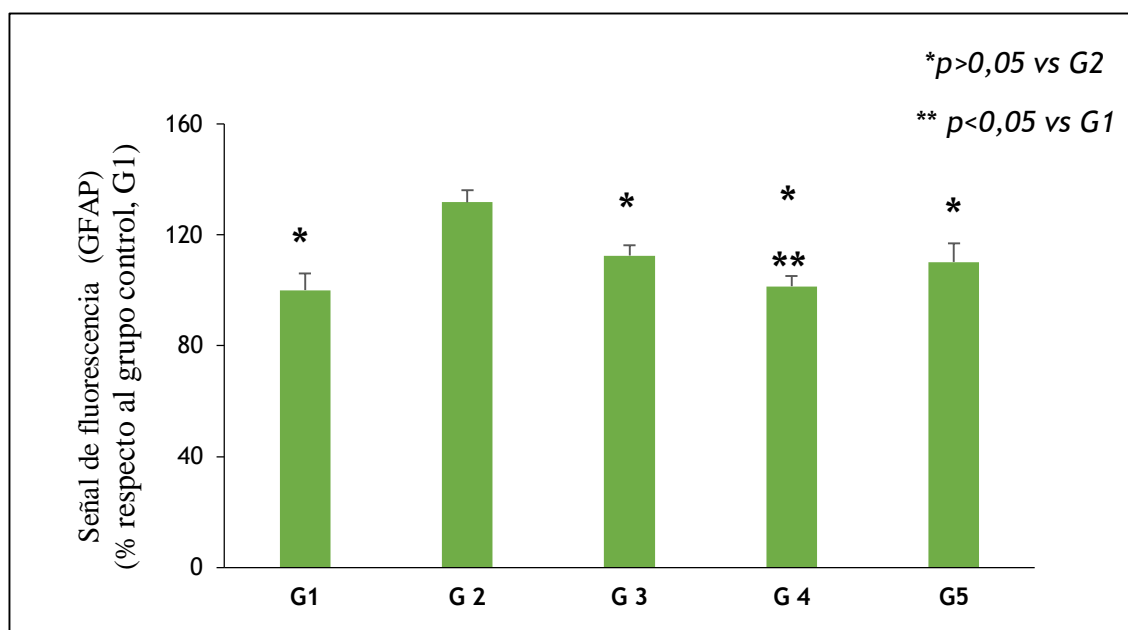


Figura 43. Evaluación de la respuesta Glial. G1: grupo control; G2: grupo tratados con rotenona; grupos G3 a G5 tratados con rotenona y: G3 tratados con MPs cargadas con TC en cantidad equivalente a una dosis de 45 mg de TC cada 15 días, G4 tratados con NPs en cantidad equivalente a una dosis de 9 mg de TC cada 3 días y G5 tratados con TC en solución (3 mg/Kg/día) durante 43 días. TC (tolcapona), MPs (micropartículas) y NPs (nanopartículas).



44. Resultados obtenidos en el estudio inmunohistoquímico (no cuantativo) de la respuesta glial (GFAP) obtenidos en los cortes cerebrales (sustancia nigra) para todos los grupos de animales analizados. G1: grupo control; G2: grupo tratados con rotenona; grupos G3 a G5 tratados con rotenona y: G3 tratados con MPs en cantidad equivalente a una dosis de 45 mg de TC cada 15 días, G4 tratados con NPs en cantidad equivalente a una dosis de 9 mg de TC cada 3 días y G5 tratados con TC en solución (3 mg/Kg/día) durante 43 días. TC (tolcapona), MPs (micropartículas) y NPs (nanopartículas).

La dopamina se sintetiza en las neuronas dopaminérgicas del SNpc, se almacena en vesículas sinápticas y se libera en respuesta a estímulos en el estriado para ejercer su función fisiológica (Messripour y Mesripour, 2013). Una anomalía neuroquímica presente en la enfermedad de Parkinson (EP) es la degeneración de las neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra, lo que conduce a una reducción de los niveles de dopamina (DA) estriatal. Como la tirosina hidroxilasa (TH) cataliza la formación de L-DOPA, paso limitante en la biosíntesis de DA, la EP puede considerarse como un síndrome de deficiencia de TH del cuerpo estriado. Para ello, la prueba inmunohistoquímica de la enzima tirosina hidroxilasa (TH) es una técnica que permite cuantificar el grado de pérdida de células dopaminérgicas en cerebros post mortem de individuos diagnosticados de Parkinson. Diversos autores han indicado que la RT provoca una reducción moderada de las neuronas inmunorreactivas de TH en la SNpc (Betarbet *et al.*, 2000; Sherer *et al.*, 2003; Bassani *et al.*, 2014). La Figura 45 muestra los resultados de la intensidad de fluorescencia obtenidos para los diferentes grupos ensayados. En nuestros estudios la inmunoreactividad de TH en SNpc disminuyó en los animales tratados con RT (grupo G2). Esta reducción revirtió parcialmente en los grupos que recibieron NPs de PLGA cargadas con TC (grupo G4) o TC en

solución (grupo G5), pero no se obtuvo ningún beneficio cuando el fármaco se administraron MPs de PLGA cargadas con TC (grupo G3).

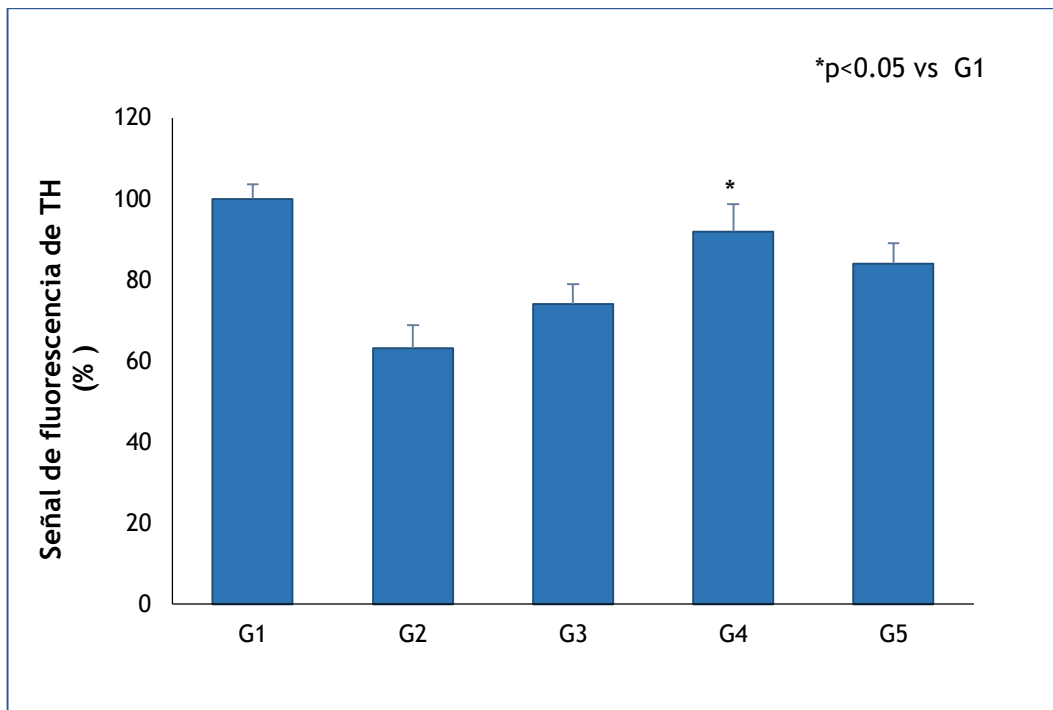


Figura 45. Resultados obtenidos en los estudios de inmunorreactividad a la tiroxina hidroxilasa en la sustancia nigra de todos grupos de animales (G1-G5). G1: grupo control; G2: grupo tratados con rotenona; grupos G3 a G5 tratados con rotenona y: G3 tratados con MPs en cantidad equivalente a una dosis de 45 mg de TC cada 15 días, G4 tratados con NPs en cantidad equivalente a una dosis de 9 mg de TC cada 3 días y G5 tratados con TC en solución (3 mg/Kg/día) durante 43 días. TC (tolcapona), MPs (micropartículas) y NPs (nanopartículas).



VIII. CONCLUSIONES

1. El método de extracción- evaporación del solvente empleado para la preparación de las micropartículas de tolcapona, en una proporción TC:PLGA 1,2:4 (formulación MP-TC4) resultó ser el más adecuado para encapsular el principio activo.
2. El método de nanoprecipitación empleado para la preparación de las nanopartículas de tolcapona, en una proporción TC:PLGA 1:5 (formulación NP-TC3) resultó ser el más adecuado para encapsular el principio activo, obteniéndose un tamaño medio de partícula de 182,59 nm, que es adecuado para atravesar la barrera hematoencefálica.
3. La incubación de la línea celular de neuroblastoma humano SKN-AS con concentraciones crecientes de H₂O₂, como neurotoxina, conduce a muerte celular significativa, seleccionándose una concentración de 900 µM para realizar los ensayos de neuroprotección.
4. La incubación de las células SKN-AS con H₂O₂ y concentraciones crecientes de tolcapona muestra una recuperación de la viabilidad celular que, a las concentraciones más elevadas ensayadas (80 y 100 µM) es similar a la de las células control. Estos resultados confirman el robusto efecto neuroprotector de la tolcapona en la línea celular de neuroblastoma humano SKN-AS.
5. Las formulaciones de micro y nanopartículas seleccionadas (MP-TC4 y NP-TC3) han sido evaluadas en un modelo animal de Parkinson, desarrollado mediante la administración de la neurotoxina rotenona a ratas Wistar, a una dosis de 2 mg/kg durante 43 días por vía intraperitoneal. Los resultados obtenidos en los ensayos histológicos e inmunohistoquímicos (tinción de Nissl, proteína ácida fibrilar glial, y tirosina hidroxilasa), y en las pruebas de comportamiento (catalepsia, aquinesia y natación), han demostrado que la formulación que presenta una mayor capacidad para revertir la sintomatología corresponde a las nanopartículas de tolcapona (formulación NP-TC3).
6. Los resultados obtenidos en las pruebas de comportamiento y en los análisis inmunohistoquímicos realizados en un modelo animal de Parkinson, demuestran la eficacia de la formulación de nanopartículas desarrollada para tolcapona y su interés potencial en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.



IX. BIBLIOGRAFÍA

- Albin, R. L. (2006). Parkinson's Disease: Background, Diagnosis, and Initial Management. *Clinics in Geriatric Medicine* 22(4), 735–751. <https://doi.org/10.1016/j.cger.2006.06.003>
- Alvarez-Erviti, L., Rodriguez-Oroz, M. C., Cooper, J. M., Caballero, C., Ferrer, I., Obeso, J. A., & Schapira, A. H. V. (2010). Chaperone-mediated autophagy markers in Parkinson disease brains. *Archives of Neurology*, 67(12), 1464–1472. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2010.198>
- Alley, M. C., Scudiero, D. A., Monks, A., Hursey, M., Czerwinski, M. J., Fine, D. L., Abbott, B. J., Mayo, J. G., Shoemaker, R., & Boyd, M. R. (1988). Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium Assay. *Cancer Research*, 48(3), 584–586.
- Amiri, H., Saeidi, K., Borhani, P., Manafirad, A., Ghavami, M., & Zerbi, V. (2013). Alzheimer's disease: Pathophysiology and applications of magnetic nanoparticles as MRI theranostic agents. *Chemical Neuroscience*, 4(11), 1417–1429. <https://doi.org/10.1021/cn4001582>
- Annett, L. E., Rogers, D. C., Hernandez, T. D., & Dunnett, S. B. (1992). Behavioural analysis of unilateral monoamine depletion in the marmoset. *Brain*, 115(3), 825–856. <https://doi.org/10.1093/brain/115.3.825>
- Antonini, A., Abbruzzese, G., Barone, P., Bonuccelli, U., Lopiano, L. (2008). COMT inhibition with tolcapone in the treatment algorithm of patients with Parkinson's disease (PD): relevance for motor and non-motor features. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 4(1), 1–9. <https://doi.org/10.2147/NDT.S2404>
- Arenas, E. (2005). Engineering a dopaminergic phenotype in stem/precursor cells: Role of Nurr1, Glia-derived signals, and wnts. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1049, 51–66. <https://doi.org/10.1196/annals.1334.007>
- Artusi C.A., Sarro, L., Imbalzano, G., Fabbri, M., Lopiano, L. (2021). Safety and efficacy of tolcapone in Parkinson's disease: systematic review. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 77, 817–829. <https://doi.org/10.1007/s00228-020-03081>
- Bankiewicz, K. S., Sanchez-Pernaute, R., Oiwa, Y., Kohutnicka, M., Cummins, A., & Eberling, J. (1999). Preclinical models of Parkinson's disease. *Current Protocols in Neuroscience*, 9(1). <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0904s09>
- Barber, T. R., Klein, J. C., Mackay, C. E., & Hu, M. T. M. (2017). Neuroimaging in pre-motor Parkinson's disease. *NeuroImage Clinical*, 15, 215–227. <https://doi.org/10.1016/j.nicl.2017.04.011>
- Barcia, E., Boeva, L. García-García, L., Slowing, K., Fernández-Carballido, A., Casanova, Y., & Negro, S. (2017). Nanotechnology-based drug delivery of ropinirole for Parkinson's disease. *Drug Delivery*, 24(1), 1112–1123. <https://doi.org/10.1080/10717544.2017.1359862>
- Barker, R. A., Götz, M., & Parmar, M. (2018). New approaches for brain repair - from rescue to reprogramming. *Nature*, 557(7705), 329–334. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0087-1>
- Barone, P. (2010). Neurotransmission in Parkinson's disease: Beyond dopamine. *European Journal of Neurology*, 17(3), 364–376. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2009.02900>

- Bassani, T. B., Gradowski, R. W., Zaminelli, T., Barbiero JK, Santiago, R. M., Boschen, S. L., da Cunha, C., Lima, M. M., Andreatini, R., & Vital M. A. (2014). Neuroprotective and antidepressant-like effects of melatonin in a rotenone-induced Parkinson's disease model in rats. *Brain Research*, 1593, 95-105. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.09.068>
- Beitz, J. M. (2014). Parkinson's disease a review. *Frontiers in Bioscience*, 6(1), 415. <https://doi.org/10.2741/S415>
- Berg, D., Postuma, R. B., Adler, C. H., Bloem, B. R., Chan, P., Dubois, B., Gasser, T., Goetz, C. G., Halliday, G., Joseph, L., Lang, A. E., Liepelt-Scarfone, I., Litvan, I., Marek, K., Obeso, J., Oertel, W., Olanow, C. W., Poewe, W., Stern, M., & Deuschl, G. (2015). MDS research criteria for prodromal Parkinson's disease. *Movement Disorders* 30(1), 1600–1611). <https://doi.org/10.1002/mds.26431>
- 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. *Journal of the Neurological Sciences*, 20(4), 415–455. [https://doi.org/10.1016/0022-510X\(73\)90175-5](https://doi.org/10.1016/0022-510X(73)90175-5)
- Betarbet, R., Sherer, T. B., MacKenzie, G., Garcia-Osuna, M., Panov, A. V., & Greenamyre, J.T. (2000). Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nature Neurosciences*, 3(12), 1301–1306. <https://doi.org/10.1038/81834>
- Bevan, M. D., Magill, P. J., Terman, D., Bolam, J. P., & Wilson, C. J. (2002). Move to the rhythm: Oscillations in the subthalamic nucleus-external globus pallidus network. *Trends in Neurosciences*, 25(10), 525–531. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(02\)02235-X](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(02)02235-X)
- Bezard, E., Dovero, S., Prunier, C., Ravenscroft, P., Chalon, S., Guilloteau, D., Crossman, A. R., Bioulac, B., Brotchie, J. M., & Gross, C. E. (2001). Relationship between the appearance of symptoms and the level of nigrostriatal degeneration in a progressive 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-lesioned macaque model of Parkinson's disease. *Journal of Neuroscience*, 21(17), 6853–6861. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-17-06853.2001>
- Bezard, E., Gross, C. E., & Brotchie, J. M. (2003). Presymptomatic compensation in Parkinson's disease is not dopamine-mediated. *Trends in Neurosciences*, 26(4), 215–221. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(03\)00038-9](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(03)00038-9)
- Birkmayer, W., & Hornykiewicz, O. (1961). The L-3,4-dioxyphenylalanine (DOPA)-effect in Parkinson-akinesia. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 73, 787–788
- Blandini, F., Armentero, M. T., & Martignoni, E. (2008). The 6-hydroxydopamine model: News from the past. *Parkinsonism and Related Disorders*, 14(2), 124–129. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2008.04.015>
- Blandini, F., & Armentero, M. T. (2012). Animal models of Parkinson's disease. *FEBS Journal*. 279(7), 1156–1166. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08491>
- Blesa, J., & Przedborski, S. (2014). Parkinson's disease: Animal models and dopaminergic cell vulnerability. *Frontiers in Neuroanatomy*, 8(155), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00155>
- Blesa, J., Phani, S., Jackson-Lewis, V., & Przedborski, S. (2012). Classic and new animal models of Parkinson's disease. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, 845618. <https://doi.org/10.1155/2012/845618>

- Block, M. L., & Hong, J. S. (2005). Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: Multiple triggers with a common mechanism. *Progress in Neurobiology* 76(2), 77–98. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2005.06.004>
- Bondon-Guitton, E., Perez-Lloret, S., Bagheri, H., Brefel, C., Rascol, O., & Montastruc, J. L. (2011). Drug-induced parkinsonism: A review of 17 years' experience in a regional pharmacovigilance center in France. *Movement Disorders*, 26(12), 2226–2231. <https://doi.org/10.1002/mds.23828>
- Bové, J., & Perier, P. (2012). Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. *Neuroscience*, 211, 51–76. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.10.057>
- Braak, H., Rüb, U., Gai, W. P., & Del Tredici, K. (2003). Idiopathic Parkinson's disease: Possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. *Journal of Neural Transmission*, 110(5), 517–536. <https://doi.org/10.1007/s00702-002-0808-2>
- Brundin, P., Li, J. Y., Holton, J. L., Lindvall, O., & Revesz, T. (2008). Research in motion: The enigma of Parkinson's disease pathology spread. *Nature Reviews Neuroscience*, 9(10), 741–745. <https://doi.org/10.1038/nrn2477>
- Buhmann, C., Kassubek, J., & Jost, W. H. (2020). Management of Pain in Parkinson's Disease. *Journal of Parkinson's Disease*, 10(1), 37–48. <https://doi.org/10.3233/JPD-202069>
- Cacabelos, R. (2017). Parkinson's disease: From pathogenesis to pharmacogenomics. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(3), 551. <https://doi.org/10.3390/ijms18030551>
- Campdelacreu, J. (2014). Enfermedad de Parkinson y enfermedad de Alzheimer: Factores de riesgo ambientales. *Neurologia*, 29(9), 541–549. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2012.04.001>
- Cannon, J. R., Tapias, V. M., Na, H. M., Honick, A. S., Drolet, R. E., & Greenamyre, J. T. (2009). A highly reproducible rotenone model of Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, 34(14), 279–290. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.01.016>
- Cano de la Cuerda, R., Vela, L., Miangolarra-Page, J. C., Macías-Macías, Y., & Muñoz-Hellín, E. (2010). Quantitative measurement of axial rigidity, functional status and health-related quality of life in patients with Parkinson's disease. *Revista de Neurologia*, 51(4), 193–200. <https://doi.org/10.33588/rn.5104.2009749>
- Carlsson, A., Lindqvist, M., & Magnusson, T. (1957). 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. *Nature*, 180(4596), 1200. <https://doi.org/10.1038/1801200a0>
- Carlsson, A., Lindqvist, M., Magnusson, T., & Waldeck, B. (1958). On the presence of 3-hydroxytyramine in brain. *Science*, 127(3296), 471. <https://doi.org/10.1126/science.127.3296.471>
- Casanova, Y., Negro, S., & Barcia, E. (2022). Application of neurotoxin- and pesticide-induced animal models of Parkinson's disease in the evaluation of new drug delivery systems. *Acta Pharmaceutica*, 72(1), 35–58. <https://doi.org/10.2478/acph-2022-0008>
- Ceravolo, R., Piccini, P., Bailey, D. L., Jorga, K. M., Bryson, H., & Brooks, D. J. (2002). 18F-dopa PET evidence that tolcapone acts as a central COMT inhibitor in Parkinson's disease.

- Cicchetti, F., Drouin-Ouellet, J., & Gross, R. E. (2009). Environmental toxins and Parkinson's disease: what have we learned from pesticide-induced animal models?. *Trends in Pharmacological Sciences*, 30(9), 475–483. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.06.005>
- Connolly, B. S., & Lang, A. E. (2014). Pharmacological treatment of Parkinson disease: A review. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 311(16), 1670–1683. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.3654>
- Charcôt, J. M. (1872). Jean-Martin Charcot's house officers at La Salpêtrière Hospital. *Frontiers of Neurology and Neuroscience*, 1, 155–188. <https://doi.org/10.1159/000321774>
- Chaudhuri, K. R., Healy, D. G., & Schapira, A. H. V. (2006). Non-motor symptoms of Parkinson's disease: Diagnosis and management. *The Lancet Neurology*, 5(3), 235–245. *Lancet Neurol.* [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(06\)70373-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(06)70373-8)
- Chaudhuri, K. R., & Schapira, A. H. (2009). Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. *The Lancet Neurology*, 8(5), 464–474, [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70068-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70068-7)
- Chaudhuri, K. R., Poewe, W., & Brooks, D. (2018). Motor and Nonmotor Complications of Levodopa: Phenomenology, Risk Factors, and Imaging Features. *Movement Disorders*, 33(6), 909–919. <https://doi.org/10.1002/mds.27386>
- Chen, C., Cao, J., Ma, X., Wang, X., Chen, Q., Yan, S., Zhao, N., Geng, Z., & Wang, Z. (2016). Neuroprotection by polynitrogen manganese complexes: regulation of reactive oxygen species-related pathways. *Scientific Reports*, 6(20853), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep20853>
- Chen, P. C., Vargas, M. R., Pani, A. K., Smeyne, R. J., Johnson, D. A., Kan, Y. W., & Johnson, J. A. (2009). Nrf2-mediated neuroprotection in the MPTP mouse model of Parkinson's disease: Critical role for the astrocyte. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(8), 2933–2938. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813361106>
- Chen, W., Huang, Q., Ma, S., & Li, M. (2019). Progress in dopaminergic cell replacement and regenerative strategies for parkinson's disease. *ACS Chemical Neuroscience*, 10(2), 839–85, <https://doi.org/10.1021/acchemneuro.8b00389>
- Chen, X., Wu, G., & Schwarzschild, M. A. (2012). Urate in Parkinson's Disease: More Than a Biomarker? *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 12(4), 367–375. <https://doi.org/10.1007/s11910-012-0282-7>
- Choi, W. S., Kim, H. W., & Xia, Z. (2015). JNK inhibition of VMAT2 contributes to rotenone-induced oxidative stress and dopamine neuron death. *Toxicology* 328, 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2014.12.005>
- Chrisp, P., Mammen, G. J., & Sorkin, E. M. (1991). Selegiline: A Review of its Pharmacology, Symptomatic Benefits and Protective Potential in Parkinson's Disease. *Drugs & Aging*, 1(3), 228–248. <https://doi.org/10.2165/00002512-199101030-00006>
- Cleeter, M. W. J., Cooper, J. M., & Schapira, A. H. V. (1992). Irreversible Inhibition of Mitochondrial Complex I by 1-Methyl-4-Phenylpyridinium: Evidence for Free Radical Involvement. *Journal of Neurochemistry*, 58(2), 786–789. <https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.1992.tb09789E>

- Connolly, B. S., & Lang, A. E. (2014). Pharmacological treatment of Parkinson disease: A review. *Journal of the American Medical Association* 311(16), 1670–1683, <https://doi.org/10.1001/jama.2014.3654>
- Cookson, M. R. (2012). Cellular effects of LRRK2 mutations. *Biochemical Society Transactions* 40(5), 1070–1073, <https://doi.org/10.1042/BST20120165>
- Cuadrado, A., Moreno-Murciano, P., & Pedraza-Chaverri, J. (2009). The transcription factor Nrf2 as a new therapeutic target in Parkinson's disease. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 13(3), 319–329. <https://doi.org/10.1517/13543780802716501>
- D'Amelio, M., Ragonese, P., Morgante, L., Reggio, A., Callari, G., Salemi, G., & Savettieri, G. (2006). Long-term survival of Parkinson's disease: A population-based study. *Journal of Neurology*, 253(1), 33–37. <https://doi.org/10.1007/s00415-005-0916-7>
- Dauer, W., & Przedborski, S. (2003). Parkinson's disease: Mechanisms and models. *Neuron*, 39(6), 889–909, [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00568-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00568-3)
- Davies, C. A. A review of Parkinson's disease. (2008). *British Medical Bulletin*, 86, 109–127. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldn013>
- Davis, T. L., Roznoski, M., & Burns, R. S. (1995). Effects of tolcapone in Parkinson's patients taking L-dihydroxyphenylalanine/carbidopa and selegiline. *Movement Disorders*, 10(3), 349–351. <https://doi.org/10.1002/mds.870100321>
- Dawson, T. M., Ko, H. S., & Dawson, V. L. (2010). Genetic Animal Models of Parkinson's Disease. *Neuron*, 66(5), 646–661, <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.04.034>
- Deane, K., Spieker, S., & Clarke, C. E. (2004). Catechol-O-methyltransferase inhibitors for levodopa-induced complications in Parkinson's disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 18(4), 1465–1858. <https://doi.org/10.1002/14651858.cd00455>
- De Deurwaerdère, P., Di Giovanni, G., & Millan, M. J. (2017). Expanding the repertoire of L-DOPA's actions: A comprehensive review of its functional neurochemistry. In *Progress in Neurobiology*, 151, 57–100, <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2016.07.002>
- Decressac, M., Mattsson, B., & Björklund, A. (2012). Comparison of the behavioural and histological characteristics of the 6-OHDA and α -synuclein rat models of Parkinson's disease. *Experimental Neurology*, 235(1), 306–315. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.02.012>
- Denizot, F., & Lang, R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods*, 89(2), 271–277. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(86\)90368-6](https://doi.org/10.1016/0022-1759(86)90368-6)
- Destée, A., Mutez, E., Kreisler, A., Vanbesien-Maillot, C., & Chartier-Harlin, M. C. (2009). Parkinson disease: genetics and neuronal death. *Revue Neurologique*, 165, 80–85.
- Dickson, D. W., Braak, H., Duda, J. E., Duyckaerts, C., Gasser, T., Halliday, G. M., Hardy, J., Leverenz, J. B., Del Tredici, K., Wszolek, Z. K., & Litvan, I. (2009). Neuropathological assessment of Parkinson's disease: refining the diagnostic criteria. *The Lancet Neurology*, 8(12), 1150–1157, [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70238-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70238-8)

- Dingemanse, J., Jorga, K. M., Schmitt, M., Gieschke, R., Fotteler, B., Zürcher, G., Prada, M., & van Brummelen, P. (1995). Integrated pharmacokinetics and pharmacodynamics of the novel catechol-O-methyltransferase inhibitor tolcapone during first administration to humans. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 57(5), 508–517. [https://doi.org/10.1016/0009-9236\(95\)90035-7](https://doi.org/10.1016/0009-9236(95)90035-7)
- Djaldetti, R., Ziv, I., & Melamed, E. (2006). The mystery of motor asymmetry in Parkinson's disease. *The Lancet Neurology*, 5(9), 796–802. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(06\)70549-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(06)70549-X)
- Dong, X., Wang, Y., & Qin, Z. (2009). Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacologica Sinica*, 30(4), 379–387. <https://doi.org/10.1038/aps.2009.24>
- Dunnett, S. B., & Lelos, M. (2010). Behavioral analysis of motor and non-motor symptoms in rodent models of Parkinson's disease. *Progress in Brain Research*, 184, 35–51. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(10\)84003-8](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(10)84003-8)
- Ebadi, M., Sharma, S., Shavali, S., & El Refaey, H. (2002). Neuroprotective actions of selegiline. *Journal of Neuroscience Research*, 67(3), 285–289. <https://doi.org/10.1002/jnr.10148>
- Eruslanov, E., & Kusmartsev, S. (2010). Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. *Methods in Molecular Biology*, 594(1), 57–72. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-411-1_4
- Fernández, M., Barcia, E., Fernández-Carballido, A., Garcia, L., Slowing, K., & Negro, S. (2012). Controlled release of rasagiline mesylate promotes neuroprotection in a rotenone-induced advanced model of Parkinson's disease. *International Journal of Pharmaceutics*, 438(1-2), 266–278. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.09.024>
- Fernández, M., Negro, S., Slowing, K., Fernández-Carballido, A., & Barcia, E. (2011). An effective novel delivery strategy of rasagiline for Parkinson's disease. *International Journal of Pharmaceutics*, 419(1-2), 271–280. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.07.029>
- Filiz, G., Caragounis, A., Bica, L., Du, T., Masters, C. L., Crouch, P. J., & White, A. R. (2008). Clioquinol inhibits peroxide-mediated toxicity through up-regulation of phosphoinositol-3-kinase and inhibition of p53 activity. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40(5), 1030–1042. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.11.003>
- Flood, P. M., Qian, L., Peterson, L. J., Zhang, F., Shi, J. S., Gao, H. M., & Hong, J. S. (2011). Transcriptional factor NF- κ B as a target for therapy in Parkinson's disease. *Parkinson's Disease*, 2011, 1–8. <https://doi.org/10.4061/2011/216298>
- Fonseca, C., Simoes, S., & Gaspar, R. (2002). Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: preparation, physicochemical characterization and in vitro anti-tumoral activity. *Journal of Controlled Release*, 83(2), 273–286. [https://doi.org/10.1016/s0168-3659\(02\)00212-2](https://doi.org/10.1016/s0168-3659(02)00212-2)
- Fox, S. H. (2013). Non-dopaminergic treatments for motor control in Parkinson's disease. *Drugs*, 73(13), 1405–1415. <https://doi.org/10.1007/s40265-013-0105-4>
- Freiberg, S., & Zhu, X. X. (2004). Polymer microspheres for controlled drug release. *International Journal of Pharmaceutics*, 282(1-2), 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.04.013>

- Freshney, R. I. (2005). *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, (5th ed). Editorial John Wiley and sons. USA., p. 4–37.
- Fukaya, C., & Yamamoto, T. (2015). Deep brain stimulation for Parkinson's disease: Recent trends and future direction. *Neurologia Medico-Chirurgica*, 55(5), 422–431. <https://doi.org/10.2176/nmc.ra.2014-0446>
- Gao, H. M., Liu, B., Zhang, W., & Hong, J. S. (2003). Novel anti-inflammatory therapy for Parkinson's disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, 24(8), 395–401. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(03\)00176-7](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(03)00176-7)
- Gao, Z., Zhu, Q., Zhang, Y., Zhao, Y., Cai, L., Shields, C.B., & Cai, L. (2013). Reciprocal modulation between microglia and astrocyte in reactive gliosis following the CNS injury. *Molecular Neurobiology*, 48(3), 690–701. <https://doi.org/10.1007/s12035-013-8460-4>
- Garbayo, E., Ansorena, E., Lana, H., Carmona-Abellan, M., Marcilla, I., Lanciego, J. L., Luquin, M. R., & Blanco-Prieto, M. J. (2016). Brain delivery of microencapsulated GDNF induces functional and structural recovery in parkinsonian monkeys, *Biomaterials*, 110, 11–23. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.09.015>
- García-García, L, Delgado, M., Al-Sayed, A. A., Bascuñana, P., Fernández de la Rosa, R., Bermejo-Bescós, P., Martín-Aragón, S., & Pozo, M. A. (2015). In vivo [¹⁸F]FDG PET imaging reveals that p-chloroamphetamine neurotoxicity is associated with long-term cortical and hippocampal hypometabolism. *Molecular Imaging and Biology*, 17(2), 239–247. <https://doi.org/10.1007/s11307-014-0794-4>
- Gershanik, O., Emre, M., Bernhard, G., & Sauer, D. (2003). Efficacy and safety of levodopa with entacapone in Parkinson's disease patients suboptimally controlled with levodopa alone, in daily clinical practice: An international, multicentre, open-label study. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 27(6), 963–971. [https://doi.org/10.1016/S0278-5846\(03\)00156-8](https://doi.org/10.1016/S0278-5846(03)00156-8)
- Giasson, B. I., Duda, J. E., Murray, I. V. J., Chen, Q., Souza, J. M., Hurtig, H. I., Ischiropoulos, H., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. Y. (2000). Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective α -synuclein nitration in synucleinopathy lesions. *Science*, 290(5493), 985–989. <https://doi.org/10.1126/science.290.5493.985>
- Gispert, S., Ricciardi, F., Kurz, A., Azizov, M., Hoepken, H. H., Becker, D., Voos, W., Leuner, K., Müller, W. E., Kudin, A. P., Kunz, W. S., Zimmerman, A., Roeper, J., Wenzel, D., Jendrach, M., García-Arencibia, M., Fernández-Ruiz, J., Huber, L., Rohrer, H., & Auburger, G. (2009). Parkinson phenotype in aged PINK1-deficient mice is accompanied by progressive mitochondrial dysfunction in absence of neurodegeneration. *PLoS ONE*, 4(6), 5777. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005777>
- Gómez, C., Bandez, M. J., & Navarro, A. (2007). Pesticides and impairment of mitochondrial function in relation with the parkinsonian syndrome. *Frontiers in Biosciences*, 12(3), 1079–1093. <https://doi.org/10.2741/2128>

- Grandi, L. C., Di Giovanni, G., & Galati, S. (2018). Animal models of early-stage Parkinson's disease and acute dopamine deficiency to study compensatory neurodegenerative mechanisms. *Journal of Neuroscience Methods*, 308, 205–218, <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2018.08.012>
- Hallett, P. J., Deleidi, M., Astradsson, A., Smith, G. A., Cooper, O., Osborn, T. M., Sundberg, M., Moore, M. A., Perez-Torres, E., Brownell, A. L., Schumacher, J. M., Spealman, R. D., & Isacson, O. (2015). Successful function of autologous iPSC-derived dopamine neurons following transplantation in a non-human primate model of Parkinson's disease. *Cell Stem Cell*, 16(3), 269–274. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.01.018>
- Halliwell, B. (2006). Oxidative stress and neurodegeneration: Where are we now?. *Journal of Neurochemistry*, 97(6), 1634–1658. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03907.x>
- Halliwell, B., & Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, 142(2), 231–255. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705776>
- Hamann, K., & Shi, R. (2009). Acrolein scavenging: a potential novel mechanism of attenuating oxidative stress following spinal cord injury. *Journal of Neurochemistry*, 111(6), 1348–1356. <https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2009.06395>
- Hanisch, U. K., & Kettenmann, H. (2007). Microglia: Active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nature Neuroscience*, 10(11), 1387–1394, <https://doi.org/10.1038/nn1997>
- Haobam, R., Sindhu, K. M., Chamdra, G. & Mohanakumar, K. P. (2005). Swim-test as a function or motor impairment in MPTP model of Parkinson's disease: a comparative study in two mouse strains. *Behavioral Brain Research*, 163(2), 159-167. <https://doi:10.1016/j.bbr.2005.04.011>
- Hardy, J., Lewis, P., Revesz, T., Lees, A., & Paisan-Ruiz, C. (2009). The genetics of Parkinson's syndromes: a critical review. *Current Opinion in Genetics and Development*, 19(3), 254–265. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2009.03.008>
- Hasegawa, T., Treis, A., Patenge, N., Fiesel, F. C., Springer, W., & Kahle, P. J. (2008). Parkin protects against tyrosinase-mediated dopamine neurotoxicity by suppressing stress-activated protein kinase pathways. *Journal of Neurochemistry*, 105(5), 1700–1715. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05277>
- Hatano, T., Kubo, S. I., Sato, S., & Hattori, N. (2009). Pathogenesis of familial Parkinson's disease: New insights based on monogenic forms of Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 111(5), 1075–1093. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06403>
- Heinzel, S., Berg, D., Gasser, T., Chen, H., Yao, C., & Postuma, R. B. (2019). Update of the MDS research criteria for prodromal Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 34(10), 1464–1470. <https://doi.org/10.1002/mds.27802>
- Hernandez-Baltazar, D., Zavala-Flores, L. M., & Villanueva-Olivo, A. (2017). The 6-hydroxydopamine model and parkinsonian pathophysiology: Novel findings in an older model. *Neurología (English Edition)*, 32(8), 533–539. <https://doi.org/10.1016/j.nrleng.2015.06.019>

- Hernández-Romero, M. C., Delgado-Cortés, M. J., Sarmiento, M., de Pablos, R. M., Espinosa-Oliva, A. M., Argüelles, S., Bández, M. J., Villarán, R. F., Mauriño, R., Santiago, M., Venero, J. L., Herrera, A. J., Cano, J., & Machado, A. (2012). Peripheral inflammation increases the deleterious effect of CNS inflammation on the nigrostriatal dopaminergic system. *Neurotoxicology*, 33(3), 347–360. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2012.01.018>
- Herrera, E. J., Viano, J. C., Cáceres, M., Costello, G., Suárez, M., & Suárez, J. C. (2000). Posteroventral pallidotomy in Parkinson's disease. *Acta Neurochirurgica*, 142(2), 169–175. <https://doi.org/10.1007/s007010050020>
- Hillaireau, H. & Couvreur, P. (2009). Nanocarriers entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(17), 2873–2896. <https://doi: 10.1007/s00018-009-0053-z>
- Hirsch, E. C., Breidert, T., Rousset, E., Hunot, S., Hartmann, A., & Michel, P. P. (2003). The role of glial reaction and inflammation in Parkinson's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 991, 214–228. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2003.tb07478.x>
- Hirsch, Etienne C., & Hunot, S. (2009). Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection?. *The Lancet Neurology*, 8(4), 382–397. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70062-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70062-6)
- Hisata, J. (2002). Lake and stream rehabilitation: rotenone use and health risks. *Final Supplemental Environmental Impact Statement, Washington State Department of Fish and Wildlife*, 4, 44–75.
- Hsueh, S. C., Chen, K. Y., Lai, J. H., Wu, C. C., Yu, Y. W., Luo, Y., Hsieh, T. H., & Chiang, Y. H. (2018). Voluntary physical exercise improves subsequent motor and cognitive impairments in a rat model of parkinson's disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2), 2–13. <https://doi.org/10.3390/ijms19020508>
- <http://www.aemps.gob.es>. Último acceso noviembre 2021
- <https://www.parkinsons.org.uk>. Ultimo acceso octubre 2021
- Huang, X. & Brazel, C. S. (2001). On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. *Journal of Controlled Release* 73(2-3), 121–136. [https://doi: 10.1016/S0168-3659\(01\)00248-6](https://doi: 10.1016/S0168-3659(01)00248-6).
- Hubsher, G., Haider, M., & Okun, M. S. (2012). Amantadine: The journey from fighting flu to treating Parkinson disease. *Neurology*, 78(14), 1096–1099. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31824e8f0d>
- Hunter, R. L., Cheng, B., Choi, D. Y., Liu, M., Liu, S., Cass, W. A., & Bing, G. (2009). Intrastriatal lipopolysaccharide injection induces Parkinsonism in C57/B6 mice. *Journal of Neuroscience Research*, 87(8), 1913–1921. <https://doi.org/10.1002/jnr.22012>
- Huot, P., Johnston, T. H., Koprach, J. B., Fox, S. H., & Brotchie, J. M. (2013). The pharmacology of L-DOPA-induced dyskinesia in Parkinson's disease. *Pharmacological Reviews*, 65(1), 171–222. <https://doi.org/10.1124/pr.111.005678>

- Hurtado-Lorenzo, A., & Anand, V. S. (2008). Heat shock protein 90 modulates LRRK2 stability: Potential implications for Parkinson's disease treatment. *Journal of Neuroscience*, 28(27), 6757–6759. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1870-08.2008>
- Iravani, M. M., Leung, C. C. M., Sadeghian, M., Haddon, C. O., Rose, S., & Jenner, P. (2005). The acute and the long-term effects of nigral lipopolysaccharide administration on dopaminergic dysfunction and glial cell activation. *European Journal of Neuroscience*, 22(2), 317–330. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04220.x>
- Jankovic, J. (2008). Parkinson's disease: Clinical features and diagnosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 79(4), 368–376. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2007.131045>
- Jellinger, K. A. (2001). Cell death mechanisms in neurodegeneration. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 5(1), 1–17. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2001.tb00134>
- Jenner, P., & Olanow, C. W. (1996). Pathological evidence for oxidative stress in Parkinson's disease and related degenerative disorders. *Neurodegeneration and Neuroprotection in Parkinson's Disease*, 23–45. <https://doi.org/10.1016/b978-012525445-8/50004-7>
- Jiang, X., Nie, B., Fu, S., Hu, J., Yin, L., Lin, L., Wang, X., Lu, P., & Xu, X.-M. (2009). EGb761 Protects Hydrogen Peroxide-induced Death of Spinal Cord Neurons through Inhibition of Intracellular ROS Production and Modulation of Apoptotic Regulating Genes. *Journal of Molecular Neuroscience*, 38(2), 103–113. <https://doi.org/10.1007/S12031-008-9140-0>
- Jin, M. M., Zhang, L., Yu, H. X., Meng, J., Sun, Z., & Lu, R. R. (2013). Protective effect of whey protein hydrolysates on H₂O₂-induced PC12 cells oxidative stress via a mitochondria-mediated pathway. *Food Chemistry*, 141(2), 847–852. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.076>
- Jomova, K., Vondrakova, D., Lawson, M., & Valko, M. (2010). Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 345(1–2), 91–104. <https://doi.org/10.1007/s11010-010-0563-x>
- Jorga, K. M., Şedek, G., Fotteler, B., Zürcher, G., Nielsen, T., & Aitken, J. W. (1997). Optimizing levodopa pharmacokinetics with multiple tolcapone doses in the elderly. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 62(3), 300–310. [https://doi.org/10.1016/S0009-9236\(97\)90033-3](https://doi.org/10.1016/S0009-9236(97)90033-3)
- Kamaly, N., Yameen, B., Wu, J., & Farokhzad, O. C. (2016). Degradable controlled-release polymers and polymeric nanoparticles: mechanisms of controlling drug release. *Chemical Reviews*, 116(4), 602–663. <https://doi: 10.1021/acs.chemrev.5b00346>
- Katiyar, S. S., Muntimadugu, E., Rafeeqi, T.A., Domb, A. J., & Khan, W. (2016). Co-delivery of rapamycin and piperine-loaded polymeric nanoparticles for breast cancer treatment. *Drug Delivery*, 23(7), 2608–2616. <https://doi: 10.3109/10717544.2015.1039667>
- Kikuchi, A., Takeda, A., Onodera, H., Kimpara, T., Hisanaga, K., Sato, N., Nunomura, A., Castellani, R. J., Perry, G., Smith, M. A., & Itoyama, Y. (2002). Systemic increase of oxidative nucleic acid damage in Parkinson's disease and multiple system atrophy. *Neurobiology of Disease*, 9(2), 244–248. <https://doi.org/10.1006/nbdi.2002.0466>

- Kitada, T., Pisani, A., Karouani, M., Haburcak, M., Martella, G., Tschertter, A., Platania, P., Wu, B., Pothos, E. N., & Shen, J. (2009). Impaired dopamine release and synaptic plasticity in the striatum of Parkin^{-/-} mice. *Journal of Neurochemistry*, 110(2), 613–621. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06152.x>
- Klein, C., & Westenberger, A. (2012). Genetics of Parkinson's disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008888>
- Klein, C., Lohmann-Hedrich, K., Rogaeva, E., Schlossmacher, M. G., & Lang, A. E. (2007). Deciphering the role of heterozygous mutations in genes associated with parkinsonism. *The Lancet Neurology*, 6(7), 652–662. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(07\)70174-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(07)70174-6)
- Klose, D., Siepmann, F., Elkharraz, K., Krenzlin, S., & Siepmann, J. (2006). How porosity and size affect the drug release mechanisms from PLGA-based microparticles. *International Journal Pharmaceutics*, 314(2), 198–206. <https://doi:10.1016/j.ijpharm.2005.07.031>
- Kubo, S. I., Hattori, N., & Mizuno, Y. (2006). Recessive Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 21(7), 885–893. <https://doi.org/10.1002/mds.20841>
- Kurth, M.C., Adler, C.H. (1998). COMT inhibition: a new treatment strategy for Parkinson's disease. *Neurology*, 50(5), 3–14. https://doi.org/10.1212/wnl.50.5_suppl_5.s3
- Kuzuhara, S., Yoshimura, M., Nagura, H., Yamanouchi, H., & Toyokura, Y. (1988). Clinical features of diffuse Lewy body disease. Report of 8 cases and review of the literature. *Clinical Neurology*, 28(11), 1274–1281
- Langston, J., Ballard, P., Tetrud, J., & Irwin, I. (1983). Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*, 219(4587), 979–980. <https://doi.org/10.1126/science.6823561>
- Le, W., Sayana, P., & Jankovic, J. (2014). Animal models of Parkinson's disease: A Gateway to therapeutics?. *Neurotherapeutics*, 11(1), 92–110. <https://doi.org/10.1007/s13311-013-0234>
- Lee, H. G., & Yang, J. H. (2010). PKC- δ mediates TCDD-induced apoptosis of chondrocyte in ROS-dependent manner. *Chemosphere*, 81(8), 1039–1044. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.08.045>
- Lee, V. M. Y., & Trojanowski, J. Q. (2006). Mechanisms of Parkinson's *Neuron*, 528(1), 33–38. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.09.026>
- Leegwater-Kim, J., & Waters, C. (2014). Role of tolcapone in the treatment of Parkinson's disease. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 7(12), 1649–1657. <https://doi.org/10.1586/14737175.7.12.1649>
- Lees, A. J., Hardy, J., & Revesz, T. (2009). Parkinson's disease. *The Lancet*, 373(9680), 2055–2066. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60492](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60492)
- Lehr, C. M. (2002). Cell Culture Models of Biological Barriers: In vitro Test Systems for Drug Absorption and Delivery. Taylor and Francis ed. New York, p.5–19- ISBN 9780367395957 <https://doi.org/10.1201/9780203219935>
- Lewis, M., Huang, X., Nichols, D., & Mailman, R. (2008). D1 and Functionally Selective Dopamine Agonists as Neuroprotective Agents in Parkinsons Disease. *CNS & Neurological Disorders-Drug Targets*, 5(3), 345–353. <https://doi.org/10.2174/187152706777452245>

- Lin, M. T., & Beal, M. F. (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, 443(7113), 787–795. <https://doi.org/10.1038/nature05292>
- Lindvall, O. (2016). Clinical translation of stem cell transplantation in Parkinson's disease. *Journal of Internal Medicine*, 279(1), 30–40. <https://doi.org/10.1111/joim.12415>
- Lindvall, Olle, & Björklund, A. (2004). Cell therapy in Parkinson's disease. *NeuroRx*, 1(4), 382–393. <https://doi.org/10.1602/neurorx.1.4.382>
- Liu, B., Gao, H. M., & Hong, J. S. (2003). Parkinson's disease and exposure to infectious agents and pesticides and the occurrence of brain injuries: Role of neuroinflammation. *Environmental Health Perspectives*, 111(8), 1065–1073. <https://doi.org/10.1289/ehp.6361>
- Llumiguano, C., Dóczi, T., & Baths, I. (2006). Microelectrode guided stereotactic pallidotomy and pallido-thalamotomy for treatment of Parkinson's disease. *Neurocirugia*, 17(5), 420–431. [https://doi.org/10.1016/s1130-1473\(06\)70325-6](https://doi.org/10.1016/s1130-1473(06)70325-6)
- Lockman, P. R., Koziara, J. M., Mumper, R. J., Allen, D. D. (2004). Nanoparticle surface charges alter blood-brain barrier integrity and permeability. *Journal of Drug Targeting*, 12(9-10), 635-641. <https://doi: 10.1080/10611860400015936>
- Loonen, A. J. M., & Ivanova, S. A. (2013). New insights into the mechanism of drug-induced dyskinesia. *CNS Spectrums*, 18(1), 15–20. <https://doi.org/10.1017/S1092852912000752>
- Makadia, H. K., & Siegel, S. J. (2011). Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers*, 3(3), 1377–1397. <https://doi.org/10.3390/polym3031377>
- Marcianes, P., Negro, S., García-García, L., Montejo, C., Barcia, E., & Fernández-Carballido, A. (2017). Surface-modified gatifloxacin nanoparticles with potential for treating central nervous system tuberculosis. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 1959-1968. <https://doi:10.2147/ijn. s130908>
- Marsden, C. D., & Parkes, J. D. (1977). Success and problems of long-term levodopa therapy in Parkinson's disease. *The Lancet*, 309(8007), 345–349. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(77\)91146-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(77)91146-1)
- Marshall, N. J., Goodwin, C. J., Holt, S. J. (1995). A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. *Growth Regulation*, 5(2), 69–84.
- Martínez-Fernández, R., Schmitt, E., Martínez-Martin, P., & Krack, P. (2016). The hidden sister of motor fluctuations in Parkinson's disease: A review on nonmotor fluctuations. *Movement Disorders*, 31(8), 1080–1094. <https://doi.org/10.1002/mds.26731>
- McGeer, P. L., Itagaki, S., Boyes, B. E., & McGeer, E. G. (1988). Reactive microglia are positive for HLA-DR in the: Substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology*, 38(8), 1285–1291. <https://doi.org/10.1212/wnl.38.8.1285>
- McKeith, I. G., Dickson, D. W., Lowe, J., Emre, M., O'Brien, J. T., Feldman, H., Cummings, J., Duda, J. E., Lippa, C., Perry, E. K., Aarsland, D., Arai, H., Ballard, C. G., Boeve, B., Burn, D. J., Costa, D., Del Ser, T., Dubois, B., Galasko, D., Yamada, M. (2005). Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies: Third report of the DLB consortium. *Neurology*, 65(12), 1863–1872. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000187889.17253.b1>

- McNaught, K. S. P., & Jenner, P. (2001). Proteasomal function is impaired in substantia nigra in Parkinson's disease. *Neuroscience Letters*, 297(3), 191–194. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(00\)01701-8](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(00)01701-8)
- Mena, M., Rodriguez-Navarro, J., Ros, R., & de Yébenes, J. (2008). On the pathogenesis and neuroprotective treatment of parkinson disease: what have we learned from the genetic forms of this disease? *Current Medicinal Chemistry*, 15(23), 2305–2320. <https://doi.org/10.2174/092986708785909148>
- Meredith, G. E., Totterdell, S., Potashkin, J. A., & Surmeier, D. J. (2008). Modeling PD pathogenesis in mice: Advantages of a chronic MPTP protocol. *Parkinsonism and Related Disorders*, 14(2), 112–115. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2008.04.012>
- Merten, O. W. (2006). Introduction to animal cell culture technology past, present and future. *Cytotechnology*, 50(1), 1–7. <https://doi.org/10.1007/S10616-006-9009-4>
- Mesripour, M., & Mesripour, A. (2013). Age related interaction of dopamine and serotonin synthesis in striatal synaptosomes. *Biocell*, 37(2), 17-21.
- Milosevic, J., Schwarz, S. C., Ogunlade, V., Meyer, A. K., Storch, A., & Schwarz, J. (2009). Emerging role of LRRK2 in human neural progenitor cell cycle progression, survival and differentiation. *Molecular Neurodegeneration*, 4(25), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-4-25>
- Miyazaki, I., Isooka, N., Imafuku, F., Sun, J., Kikuoka, R., Furukawa, C., & Asanuma, M. (2020). Chronic systemic exposure to low-dose rotenone induced central and peripheral neuropathology and motor deficits in mice: reproducible animal model of parkinson's disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9), 3254 <https://doi.org/10.3390/ijms21093254>
- Mizuno, Y., Matuda, S., Yoshino, H., Mori, H., Hattori, N., & Ikebe, S. -I. (1994). An immunohistochemical study on α -ketoglutarate dehydrogenase complex in Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 35(2), 204–210. <https://doi.org/10.1002/ana.410350212>
- Mochizuki, H., Mori, H., & Mizuno, Y. (1997). Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Journal of Neural Transmission*, 50(50), 125–140. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6842-4_13
- Mohamed, N. V., Larroquette, F., Beitel, L. K., Fon, E. A., & Durcan, T. M. (2019). One Step into the Future: New iPSC Tools to Advance Research in Parkinson's Disease and Neurological Disorders. *Journal of Parkinson's Disease*, 9(2), 265–281. <https://doi.org/10.3233/JPD-181515>
- Montejo, C., Barcia, E., Negro, S., & Fernández-Carballido, A. (2010). Effective antiproliferative effect of meloxicam on prostate cancer cells: Development of a new controlled release system. *International Journal of Pharmaceutics*, 387(1–2), 223–229. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.11.036>
- Morgado, H. V., Vilatela, M. E. A., & López, M. L. (2007). Factores genéticos involucrados en la susceptibilidad para desarrollar enfermedad de Parkinson. In *Salud Mental*, 30(1), 16–24
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

- Mrak, R. E., & Griffin, W. S. T. (2005). Potential Inflammatory biomarkers in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 8(4), 369–375. <https://doi.org/10.3233/jad-2005-8406>
- Mulcahy, P., Walsh, S., Paucard, A., Rea, K., & Dowd, E. (2011). Characterisation of a novel model of Parkinson's disease by intra-striatal infusion of the pesticide rotenone, *Neuroscience*, 181, 234–242. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.01.038>
- Müller, T. (2015). Catechol-O-methyltransferase inhibitors in Parkinson's disease. *Drugs*, 75(2), 157–174. <https://doi.org/10.1007/s40265-014-0343-0>
- Nalls, M. A., Plagnol, V., Hernandez, D. G., Sharma, M., Sheerin, U. M., Saad, M., Simón-Sánchez, J., Schulte, C., Lesage, S., Sveinbjörnsdóttir, S., Stefánsson, K., Martinez, M., Hardy, J., Heutink, P., Brice, A., Gasser, T., Singleton, A. B., & Wood, N. W. (2011). Imputation of sequence variants for identification of genetic risks for Parkinson's disease: A meta-analysis of genome-wide association studies. *The Lancet*, 377(9766), 641–649. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)62345-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)62345-8)
- Napolitano, A., Del Dotto, P., Petrozzi, L., Dell'Agnello, G., Bellini, G., Gambaccini, G., & Bonuccelli, U. (1999). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of L-DOPA after acute and 6-week tolcapone administration in patients with Parkinson's disease. *Clinical Neuropharmacology*, 22(1), 24–29. <https://doi.org/10.1097/00002826-199901000-00005>
- Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D. F., & Youle, R. J. (2008). Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *Journal of Cell Biology*, 183(5), 795–803. <https://doi.org/10.1083/jcb.200809125>
- Nayak, L., & Henchcliffe, C. (2008). Rasagiline in treatment of Parkinson's disease. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 4(1), 11–20. <https://doi.org/10.2147/ndt.s464>
- Negro, N., Boeva, L., Slowing, K., Fernandez-Carballido, A., Garcia-García, L., & Barcia, E. (2016). Efficacy of ropinirole-loaded PLGA microspheres for the reversion of rotenone-induced Parkinsonism. *Current Pharmaceutical Design*, 23(23), 3423–3431. <https://doi.org/10.2174/1381612822666160928145346>
- Nistico, R., Mehdawy, B., Piccirilli, S. & Mercuri, N. (2011). Paraquat- and rotenone-induced models of Parkinson's disease. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 24(2), 313–322. <https://doi.org/10.1177/039463201102400205>
- Nyholm, D., Lennernäs, H., Gomes-Trolin, C., & Aquilonius, S. M. (2002). Levodopa pharmacokinetics and motor performance during activities of daily living in patients with Parkinson's disease on individual drug combinations. *Clinical Neuropharmacology*, 25(2), 89–96. <https://doi.org/10.1097/00002826-200203000-00006>
- Obeso, J. A., Rodriguez-Oroz, M. C., Goetz, C. G., Marin, C., Kordower, J. H., Rodriguez, M., Hirsch, E. C., Farrer, M., Schapira, A. H., & Halliday, G. (2010). Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. *Nature medicine*, 16(6), 653–661. <https://doi.org/10.1038/nm.2165>
- Obeso, J. A., Stamelou, M., Goetz, C. G., Poewe, W., Lang, A. E., Weintraub, D., Burn, D., Halliday, G. M., Bezard, E., Przedborski, S., Lehericy, S., Brooks, D. J., Rothwell, J. C., Hallett, M., DeLong, M. R., Marras, C., Tanner, C. M., Ross, G. W., Langston, J. W., Stoessl, A.J. (2017). Past, present, and future of Parkinson's disease: A special essay on the 200th Anniversary of the Shaking Palsy. *Movement Disorders*, 32(9), 1264–1310. <https://doi.org/10.1002/mds.27115>

- Olanow, C. W., Watts, R. L., & Koller, W. C. (2001). An algorithm (decision tree) for the management of Parkinson's disease: Treatment guidelines. *Neurology*, 56(11), 1-88. https://doi.org/10.1212/wnl.56.suppl_5.s1
- Ossig, C., & Reichmann, H. (2013). Treatment of Parkinson's disease in the advanced stage. *Journal of Neural Transmission*, 120(4), 523–529. <https://doi.org/10.1007/s00702-013-1008>
- Paisán-Ruiz, C., Lewis, P. A., & Singleton, A. B. (2013). LRRK2: Cause, risk, and mechanism. *Journal of Parkinson's Disease*, 3(2), 85–103. <https://doi.org/10.3233/JPD-130192>
- Pardal, R., & López-Barneo, J. (2012). Neural stem cells and transplantation studies in Parkinson's disease. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 741, 206–216. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-2098-9_14
- Park, C. H., Minn, Y. K., Lee, J. Y., Choi, D. H., Chang, M. Y., Shim, J. W., Ko, J. Y., Koh, H. C., Kang, M. J., Kang, J. S., Rhie, D. J., Lee, Y. S., Son, H., Moon, S. Y., Kim, K. S., & Lee, S. H. (2005). In vitro and in vivo analyses of human embryonic stem cell-derived dopamine neurons. *Journal of Neurochemistry*, 92(5), 1265–1276. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.03006>
- Park, H. R., Youn, J., Cho, J. W., Oh, E.-S., Kim, J. S., Park, S., Jang, W., & Park, J. S. (2018). Characteristic motor and nonmotor symptoms related to quality of life in drug-naïve patients with late-onset Parkinson Disease. *Neurodegenerative Diseases*, 18(1), 19–25. <https://doi.org/10.1159/000484249>
- Park, T.G., Cohen, S., & Langer, R. (1992). Poly (L-lactic acid)/Pluronic blends: characterization of phase separation behavior, degradation, and morphology and use as protein-releasing matrixes. *Macromolecules*, 25(1), 116–122. <https://doi:10.1021/ma00027a019>
- Parkinson J. An essay on the shaking palsy. 1817. (2002). *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, 14(2), 223-236. <https://doi.org/10.1176/jnp.14.2.223>
- Pfeiffer, R.F. (2003). Gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease. *Lancet Neurology*, 2(2), 107-116. [https://doi:10.1016/s1474-4422\(03\)00307-7](https://doi:10.1016/s1474-4422(03)00307-7)
- Pilati, N., Barker, M., Panteleimonitis, S., Donga, R., & Hamann, M. (2008). A rapid method combining Golgi and Nissl staining to study neuronal morphology and cytoarchitecture. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 56(6), 539–550. <https://doi:10.1369/jhc.2008.950246>
- Poewe, W. (2006). The need for neuroprotective therapies in Parkinson's disease: A clinical perspective. *Neurology*, 66(10), 2-9. https://doi.org/10.1212/wnl.66.10_suppl_4.s2
- Poewe, W., Seppi, K., Tanner, C. M., Halliday, G. M., Brundin, P., Volkman, J., Schrag, A. E., & Lang, A. E. (2017). Parkinson disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 3(1), 1–21. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.13>
- Polymeropoulos, M. H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S. E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E. S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papapetropoulos, T., Johnson, W. G., Lazzarini, A. M., Duvoisin, R. C., Di Iorio, G., Golbe, L. I., & Nussbaum, R. L. (1997). Mutation in the α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*, 276(5321), 2045–2047. <https://doi.org/10.1126/science.276.5321.2045>

- Pont-Sunyer, C., Hotter, A., Gaig, C., Seppi, K., Compta, Y., Katzenschlager, R., Mas, N., Hofeneder, D., Brücke, T., Bayés, A., Wenzel, K., Infante, J., Zach, H., Pirker, W., Posada, I. J., Álvarez, R., Ispierto, L., De Fàbregues, O., Callén, A., Tolosa, E. (2015). The onset of nonmotor symptoms in parkinson's disease (the onset pd study). *Movement Disorders*, 30(2), 229–237. <https://doi.org/10.1002/mds.26077>
- Postuma, R. B., & Berg, D. (2019). Prodromal Parkinson's Disease: The Decade Past, the Decade to Come. *Movement Disorders*, 34(5), 665–675. <https://doi.org/10.1002/mds.27670>
- Postuma, R. B., Berg, D., Stern, M., Poewe, W., Olanow, C. W., Oertel, W., Obeso, J., Marek, K., Litvan, I., Lang, A. E., Halliday, G., Goetz, C. G., Gasser, T., Dubois, B., Chan, P., Bloem, B. R., Adler, C. H., & Deuschl, G. (2015). MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 30(12), 1591–1601. <https://doi.org/10.1002/mds.26424>
- Raine, C. S. (2000). Inflammation in Alzheimer's disease: A view from the periphery. *Neurobiology of Aging*, 21(3), 437–440. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(00\)00138-X](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(00)00138-X)
- Rajput, A. H., Uitti, R. J., Rajput, A. H., & Offord, K. P. (1997). Timely levodopa (LD) administration prolongs survival in Parkinson's disease. *Parkinsonism and Related Disorders*, 3(3), 159–165. [https://doi.org/10.1016/S1353-8020\(97\)00030-8](https://doi.org/10.1016/S1353-8020(97)00030-8)
- Rana, A. Q., Ahmed, U. S., Chaudry, Z. M., & Vasan, S. (2015). Parkinson's disease: A review of non-motor symptoms. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 15(5), 549–562. <https://doi.org/10.1586/14737175.2015.1038244>
- Rappold, P. M., & Tieu, K. (2010). Astrocytes and therapeutics for Parkinson's disease. *Neurotherapeutics*, 7(4), 413–423. <https://doi.org/10.1016/j.nurt.2010.07.001>
- Rascol, O., Goetz, C., Koller, W., Poewe, W., & Sampaio, C. (2002). Treatment interventions for Parkinson's disease: An evidence based assessment. *Lancet*, 359(9317), 1589–1598. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)08520-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)08520-3)
- Ray Chaudhuri, K., Poewe, W., & Brooks, D. (2018). Motor and Nonmotor Complications of Levodopa: Phenomenology, Risk Factors, and Imaging Features. *Movement Disorders*, 33(6), 909–919. <https://doi.org/10.1002/mds.27386>
- Rentzos, M., Nikolaou, C., Andreadou, E., Paraskevas, G. P., Rombos, A., Zoga, M., Tsoutsou, A., Boufidou, F., Kapaki, E., & Vassilopoulos, D. (2007). Circulating interleukin-15 and RANTES chemokine in Parkinson's disease. *Acta Neurologica Scandinavica*, 116(6), 374–379. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2007.00894.x>
- Riederer, P., & Youdim, M. B. H. (1986). Monoamine Oxidase Activity and Monoamine Metabolism in Brains of Parkinsonian Patients Treated with l-Deprenyl. *Journal of Neurochemistry*, 46(5), 1359–1365. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1986.tb01747>
- Rodrigo, R., Fernandez-Gajardo, R., Gutierrez, R., Matamala, J., Carrasco, R., Miranda-Merchak, A., & Feuerhake, W. (2013). oxidative stress and pathophysiology of ischemic stroke: novel therapeutic opportunities. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 12(5), 698–714. <https://doi.org/10.2174/1871527311312050015>
- Rodríguez Díaz, M., Abdala, P., Barroso-Chinea, P., Obeso, J., & González-Hernández, T. (2001). Motor behavioural changes after intracerebroventricular injection of 6-hydroxydopamine in the rat: An animal model of Parkinson's disease. *Behavioural Brain Research*, 122(1), 79–92. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(01\)00168-1](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(01)00168-1)

- Royall, J. A., & Ischiropoulos, H. (1993). Evaluation of 2',7'-Dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular h₂o₂ in cultured endothelial cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 302(2), 348–355. <https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1222>
- Sayre, L. M., Zelasko, D. A., Harris, P. L. R., Perry, G., Salomon, R. G., & Smith, M. A. (1997). 4-Hydroxynonenal-derived advanced lipid peroxidation end products are increased in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 68(5), 2092–2097. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.68052092>
- Sayre, L., Smith, M., & Perry, G. (2001). Chemistry and Biochemistry of Oxidative Stress in Neurodegenerative Disease. *Current Medicinal Chemistry*, 8(7), 721–738. <https://doi.org/10.2174/0929867013372922>
- Schapira, A. H.V., Cooper, J. M., Dexter, D., Clark, J. B., Jenner, P., & Marsden, C. D. (1990). Mitochondrial Complex I Deficiency in Parkinson's Disease. *Journal of Neurochemistry*, 54(3), 823–827. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1990.tb02325>
- Schapira, Anthony H., & Jenner, P. (2011). Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 26(6), 1049–1055. <https://doi.org/10.1002/mds.23732>
- Schapira, Anthony H.V., Bezard, E., Brotchie, J., Calon, F., Collingridge, G. L., Ferger, B., Hengerer, B., Hirsch, E., Jenner, P., Novère, N. Le, Obeso, J. A., Schwarzschild, M. A., Spampinato, U., & Davidai, G. (2006). Novel pharmacological targets for the treatment of Parkinson's disease. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5(10), 845–854. <https://doi.org/10.1038/nrd2087>
- Schapira, Anthony HV. (2008). Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *The Lancet Neurology*, 7(1), 97–109. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(07\)70327-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(07)70327-7)
- Schrag, A., Hovris, A., Morley, D., Quinn, N., & Jahanshahi, M. (2003). Young- versus older-onset Parkinson's disease: Impact of disease and psychosocial consequences. *Movement Disorders*, 18(11), 1250–1256. <https://doi.org/10.1002/mds.10527>
- Sherer, T. B., Betabert, R., Kim, J. H., & Greenamyre J. T. (2003). Selective microglial activation in the rat model of Parkinson's disease. *Neuroscience Letters*, 341(3), 87-90. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(03\)00172-1](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(03)00172-1)
- Shihabuddin, L. S., Brundin, P., Greenamyre, J. T., Stephenson, D., & Sardi, S. P. (2018). New frontiers in Parkinson's disease: From genetics to the clinic. *Journal of Neuroscience*, 38(44), 9375–9382. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1666-18.2018>
- Shulman, J. M., De Jager, P. L., & Feany, M. B. (2011). Parkinson's disease: genetics and pathogenesis. *Annual Review of Pathology*, 6(1), 193–222. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130242>
- Sindhu, K. M., Saravanan, K. S., & Mohanakumar, K. P. (2005). Behavioral differences in a rotenone-induced hemiparkinsonian rat model developed following intranigral or median forebrain bundle infusion. *Brain Research*, 1051(1-2), 25-34. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.05.051>
- Singh, R., & Lillard, J.W. Jr. (2009). Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Experimental Molecular Pathology*, 86(3), 215–223. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2008.12.004>

- Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 119(1), 7–35. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8>
- Spillantini, M. G., Schmidt, M. L., Lee, V. M. Y., Trojanowski, J. Q., Jakes, R., & Goedert, M. (1997). α -synuclein in Lewy bodies. *Nature*, 388(6645), 839–840. <https://doi.org/10.1038/42166>
- Spivey, A. (2011). Rotenone and paraquat linked to Parkinson's disease: human exposure study supports years of animal studies. *Environmental Health Perspectives*, 119(6), A259. <https://doi.org/10.1289/ehp.119-a259a>
- Steigerwald, F., Pötter, M., Herzog, J., Pinsker, M., Kopper, F., Mehdorn, H., Deuschl, G., & Volkman, J. (2008). Neuronal activity of the human subthalamic nucleus in the parkinsonian and nonparkinsonian state. *Journal of Neurophysiology*, 100(5), 2515–2524. <https://doi.org/10.1152/jn.90574.2008>
- Stocchi, F. (2006). The levodopa wearing-off phenomenon in Parkinson's disease: Pharmacokinetic considerations. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 7(10), 1399–1407. <https://doi.org/10.1517/14656566.7.10.1399>
- Stocchi, F., & De Pandis, M. F. (2006). Utility of tolcapone in fluctuating Parkinson's disease. *Clinical Interventions in Aging*, 1(4), 317–325. <https://doi.org/10.2147/cia.2006.1.4.317>
- Stoddard-Bennett, T., & Reijo Pera, R. (2019). Treatment of Parkinson's disease through personalized medicine and induced pluripotent stem cells. *Cells*, 8(1), 26. <https://doi.org/10.3390/cells8010026>
- Suchlfart, S., Gelperina, S., & Kreuter, J. (2012). Transport of drug across the blood brain barrier by nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 161(2), 264–273. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.08.017>
- Surmeier, D. J. (2007). Calcium, ageing, and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *The Lancet Neurology*, 6(10), 933–938. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(07\)70246-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(07)70246-6)
- Sveinbjornsdottir, S. (2016). The clinical symptoms of Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 139, 318–324. <https://doi.org/10.1111/jnc.13691>
- Swarnkar, S., Goswami, P., Kamat, P. K., Patro, I. K., Singh, S., & Nath, C. (2013). Rotenone-induced neurotoxicity in rat brain areas: a study on neuronal and neuronal supportive cells. *Neuroscience*, 230, 172–183. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.10.034>
- Swarnkar, S., Singh, S., Goswami, P., & et al. (2012). Astrocyte activation: a key step in rotenone induced cytotoxicity and DNA damage. *Neurochemical Research*, 37(10), 2178–2189. <https://doi.org/10.1007/s11064-012-0841-y>
- Tanner, C. M. (1992). Epidemiology of Parkinson's disease. *Neurologic Clinics*, 10(2), 317–329. [https://doi.org/10.1016/s0733-8619\(18\)30212-3](https://doi.org/10.1016/s0733-8619(18)30212-3)
- Tapias, V., Greenamyre, J. T., & Watkins, S. C. (2013). Automated imaging system for fast quantitation of neurons, cell morphology and neurite morphometry in vivo and in vitro. *Neurobiology of Disease*, 54, 158–168. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2012.11.018>
- Tarakad, A., & Jankovic, J. (2017). Diagnosis and management of Parkinson's disease. *Seminars in Neurology*, 37(2), 118–126. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1601888>

- Thébault, J. J., Guillaume, M., & Levy, R. (2004). Tolerability, safety, pharmacodynamics, and pharmacokinetics of rasagiline: A potent, selective, and irreversible monoamine oxidase type B inhibitor. *Pharmacotherapy*, 24(10), 1295–1305. <https://doi.org/10.1592/phco.24.14.1295.43156>
- Thomas, D. M., Walker, P.D., Benjamins, J. A., Geddes, T. J., & Kuhn, D. M. (2004). Methamphetamine neurotoxicity in dopamine nerve endings of the striatum is associated with microglial activation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 311(1), 1–7. <https://doi:10.1124/jpet.104.070961>
- Thorpe, T. A. (2007). History of plant tissue culture. *Molecular Biotechnology*, 37(2), 169–180. <https://doi.org/10.1007/S12033-007-0031-3>
- Tofaris, G. K., & Spillantini, M. G. (2005). Alpha-synuclein dysfunction in Lewy body diseases. *Movement Disorders*, 20(12), 37–44. <https://doi.org/10.1002/mds.20538>
- Tofaris, G. K., Layfield, R., & Spillantini, M. G. (2001). α -Synuclein metabolism and aggregation is linked to ubiquitin-independent degradation by the proteasome. *FEBS Letters*, 509(1), 22–26. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)03115-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)03115-5)
- Truong, D. D. (2009). Tolcapone: Review of its pharmacology and use as adjunctive therapy in patients with Parkinson's disease. *Clinical Interventions in Aging*, 4(1), 109–113. <https://doi.org/10.2147/cia.s3787>
- Ughratdar, I., Samuel, M., & Ashkan, K. (2015). Technological advances in deep brain stimulation. *Journal of Parkinson's Disease*, 5(3), 483–496. <https://doi.org/10.3233/JPD-150579>
- Uversky V. N. (2004). Neurotoxicant-induced animal models of Parkinson's disease: understanding the role of rotenone, maneb and paraquat in neurodegeneration. *Cell and tissue research*, 318(1), 225–241. <https://doi.org/10.1007/s00441-004-0937-z>
- Valente, E. M., Abou-Sleiman, P. M., Caputo, V., Muqit, M. M. K., Harvey, K., Gispert, S., Ali, Z., Del Turco, D., Bentivoglio, A. R., Healy, D. G., Albanese, A., Nussbaum, R., González-Maldonado, R., Deller, T., Salvi, S., Cortelli, P., Gilks, W. P., Latchman, D. S., Harvey, R. J., & Wood, N. W. (2004). Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science*, 304(5674), 1158–1160. <https://doi.org/10.1126/science.1096284>
- Van Der Brug, M. P., Singleton, A., Gasser, T., & Lewis, P. A. (2015). Parkinson's disease: From human genetics to clinical trials. *Science Translational Medicine*, 7(305) 205ps20. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa8280>
- Van Laar, T. (2003). Levodopa-induced response fluctuations in patients with Parkinson's disease: Strategies for management. *CNS Drugs*, 17(7), 475–489. <https://doi.org/10.2165/00023210-200317070-00002>
- Vanhauwaert, R., & Verstreken, P. (2015). Flies with Parkinson's disease. *Experimental Neurology*, 274, 42–51. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.02.020>
- Velasco-Rodríguez, V., Cornejo-Mazón, M., Flores- Flores, J. O., Gutiérrez-López, G. F., & Hernández-Sánchez, H. (2012). Preparation and properties of alpha-lipoic acid-loaded chitosan nanoparticles. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 11(1), 155-161.
- Vijayakumar, D., & Jankovic, J. (2016). Drug-induced dyskinesia, part 1: treatment of levodopa-induced dyskinesia. *Drugs*, 76(7), 759–777. <https://doi.org/10.1007/s40265-016-0566-3>

- Vila, M., Jackson-Lewis, V., Guégan, C., Wu, D. C., Teismann, P., Choi, D. K., Tieu, K., & Przedborski, S. (2001). The role of glial cells in Parkinson's disease. *Current Opinion in Neurology*, 14(4), 483-489. <https://doi.org/10.1097/00019052-200108000-00009>
- Virhammar, J., & Nyholm, D. (2017). Levodopa-carbidopa enteral suspension in advanced Parkinson's disease: Clinical evidence and experience. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 10(3), 171–187. <https://doi.org/10.1177/1756285616681280>
- Visconti, R. P., Kasyanov, V., Gentile, C., Zhang, J., Markwald, R. R., & Mironov, V. (2010). Towards organ printing: engineering an intra-organ branched vascular tree. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 10(3), 409–420. <https://doi.org/10.1517/14712590903563352>
- Wang, A., Wang, L., Sun, K., Liu, W., Sha, C., & Li, Y. (2012). Preparation of rotigotine-loaded microspheres and their combination use with L-DOPA to modify dyskinesias in 6-OHDA-lesioned rats. *Pharmaceutical Research*, 29(9), 2367–2376. <https://doi.org/10.1007/s11095-012-0762-0>
- Wijeyekoon, R., & Barker, R. A. (2009). Cell replacement therapy for Parkinson's disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1792(7), 688–702. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2008.10.007>
- Williams, D. F. (2009). On the nature of biomaterials. *Biomaterials*, 30(30), 5897–5909. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.07.027>
- Williams, D. R., & Litvan, I. (2013). Parkinsonian syndromes. *Continuum (Minneapolis, Movement Disorders)*, 19(5), 1189-212. doi: 10.1212/01.CON.0000436152.24038.e0.
- Wyss-Coray, T., & Mucke, L. (2002). Inflammation in neurodegenerative disease - A double-edged sword. *Neuron*, 35(3), 419–432. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00794-8](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00794-8)
- Xiao, B., Hui Ng, H., Takahashi, R., & Tan, E. K. (2016). Induced pluripotent stem cells in Parkinson's disease: Scientific and clinical challenges. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 87(7), 697–702. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2015-312036>
- Xiong, N., Xiong, J., Jia, M., Liu, L., Zhang, X., Chen, Z., Huang, J., Zhang, Z., Hou, L., Luo, Z., Ghoorah, D., Lin Z., & Wang, T. (2013). The role of autophagy in Parkinson's disease: Rotenone-based modeling, *Behavioral Brain Function*, 9(1), 13–25. <https://doi.org/10.1186/1744-9081-9-13>
- Youdim, M. B. H., Geldenhuys, W. J., & Van der Schyf, C. J. (2007). Why should we use multifunctional neuroprotective and neurorestorative drugs for Parkinson's disease? *Parkinsonism and Related Disorders*, 13(3), 281–291. [https://doi.org/10.1016/S1353-8020\(08\)70017-8](https://doi.org/10.1016/S1353-8020(08)70017-8)
- Yu, B. W., Li, J. L., Guo, B. Bin, Fan, H. M., Zhao, W. M., & Wang, H. Y. (2016). Chlorogenic acid analogues from *Gynura nepalensis* protect H9c2 cardiomyoblasts against H₂O₂-induced apoptosis. *Acta Pharmacologica Sinica*, 37(11), 1413–1422. <https://doi.org/10.1038/aps.2016.79>
- Yun-Seok, R., Chun-Woong, P., Patrick, P. D., & Heidi MM (2010). Sustained-release injectable drug delivery: a review of current and future systems. *Pharmaceutical Technology*, 34(11), 1–7.

- Zhang, Y., Guo, H., Guo, X., Ge, D., Shi, Y., Lu, X., Lu, J., Chen, J., Ding, F., & Zhang, Q. (2019). Involvement of Akt/mTOR in the neurotoxicity of rotenone-induced Parkinson's disease models. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(20), 3811. <https://doi.org/10.3390/ijerph162038>
- Zhang, Z. N., Zhang, J. S., Xiang, J., Yu, Z. H., Zhang, W., Cai, M., Li, X. T., Wu, T., Li, W. W., & Cai, D. F. (2017). Subcutaneous rotenone rat model of Parkinson's disease: Dose exploration study. *Brain Research*, 1655, 104–113. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.11.020>

