

DOI:

<http://dx.doi.org/10.3926/oms.43>

REFERENCIAR ESTE CAPÍTULO:

López González, G.V., Porcal Quinta, W. (2014). Estrés oxidativo / nitro-oxidativo como blanco terapéutico en enfermedades neurodegenerativas. En García Rodríguez, J.C. (Ed.). Neuroprotección en enfermedades Neuro y Heredo degenerativas. Barcelona, España: OmniaScience; 2014. pp.157-190.

Estrés oxidativo / nitro-oxidativo como blanco terapéutico en enfermedades neurodegenerativas

DRA. GLORIA VIRGINIA LÓPEZ GONZÁLEZ

DR. WILLIAMS PORCAL QUINTA

Grupo de Química Medicinal, Departamento de Química Orgánica, Facultad de
Química-Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay.
wporcal@gmail.com

RESUMEN

Las defensas antioxidantes celulares se ven sobrepasadas por la generación tanto de especies reactivas de oxígeno (ERO) como de especies reactivas de nitrógeno (ERN) cuando se está frente a una situación de estrés oxidativo / nitro-oxidativo, la cual es capaz de provocar lesiones celulares que pueden ser de carácter reversible o irreversible. Esta desregulación en el estado redox de la célula, es una de las principales causas en las modificaciones del estado de oxidación / reducción en macromoléculas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, las cuales pueden ser causas de variaciones irreversibles en la estructura y funciones de éstas. En este sentido, el sistema nervioso central (SNC) representa un blanco particularmente susceptible al daño producido por especies reactivas. Múltiples estudios han demostrado el efecto del estrés oxidativo / nitrooxidativo en la progresión de enfermedades neurodegenerativas o condiciones traumáticas como Alzheimer, Parkinson, isquemia-reperusión y esclerosis lateral amiotrófica, entre otras. La especial sensibilidad que presenta el SNC frente a un daño oxidativo se debe a factores tales como: a) elevada actividad metabólica oxidativa, b) presencia de una alta proporción de lípidos fácilmente peroxidables, c) concentraciones elevadas de cationes metálicos, d) una disminuida capacidad antioxidante y e) reducida capacidad de regeneración celular, entre otras. En este sentido, el estado oxidativo celular es un punto clave en el control y la regulación de diversos caminos de transducción de señales celulares. En este contexto, el estrés oxidativo / nitrooxidativo puede ser considerado uno de los blancos terapéuticos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. De ahí que posibles fármacos neuroprotectores con potencial capacidad de inhibir estos procesos podrán retardar o prevenir en cierto grado el avance de los trastornos neurodegenerativos. Por ello, en estas últimas dos décadas se ha notado un creciente interés en la investigación y desarrollo de nuevos fármacos capaces de actuar como protectores frente a especies reactivas tanto de oxígeno como de nitrógeno.

1. Estrés oxidativo / nitro-oxidativo

Cuando las defensas antioxidantes celulares se ven sobrepasadas por la generación tanto de especies reactivas de oxígeno (ERO) como de especies reactivas de nitrógeno (ERN) se está frente a una situación de estrés oxidativo /

nitro-oxidativo, la cual es capaz de provocar lesiones celulares que pueden ser de carácter reversible o irreversible [1-3]. En este sentido, el daño por estrés oxidativo / nitro-oxidativo, puede ser reversible o irreversible dependiendo de factores como el tiempo que dure el estrés, efectividad de las defensas antioxidantes, edad del organismo, estado nutricional y factores genéticos que codifican sistemas antioxidantes. Esta desregulación en el estado redox de la célula, es una de las principales causas en las modificaciones del estado de oxidación / reducción en macromoléculas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, las cuales pueden ser responsables de variaciones irreversibles en la estructura y funciones de estas.

En estos dos últimos siglos, muchos investigadores han observado y propuesto que la acción de dichas especies reactivas se encuentran directa o indirectamente involucradas en variados procesos patológicos y en el estado del envejecimiento [4-6]. Así, se producen importantes alteraciones sistémicas que abarcan entre otras la pérdida de células nerviosas, endurecimiento de vasos sanguíneos y disminución tanto en la flexibilidad de los tejidos como en el tono corporal. Cambios genéticos y en la actividad metabólica celular, alteraciones hormonales, modificaciones en procesos bioquímicos y condiciones ambientales han sido muchas de las causas atribuidas al envejecimiento [7-9].

En este sentido, hasta el día de hoy, muchos científicos sostienen la hipótesis: las especies reactivas causarían un daño no reparado y acumulado. Esta teoría tiene un soporte científico algo limitado hasta los noventas, cuando los resultados de diversos estudios indicaron que el daño oxidativo en las células humanas se acumula con la edad y es un contribuyente importante en enfermedades degenerativas [10-12]. El daño oxidativo aparentemente aumenta con la edad, y esto supera la capacidad de reparación del sistema natural de defensa en los adultos mayores, produciendo un estrés oxidativo que daña estructuras celulares, lo cual conduce a la muerte celular [13, 14].

2. Radicales libres

Químicamente, un radical libre es una molécula altamente reactiva con por lo menos un electrón desapareado en el orbital más externo. Considerando que las moléculas tienden a alcanzar un estado estable, los radicales libres circulan a través del organismo con el fin de estabilizar su estructura electrónica, mediante la captura de un electrón de cualquier otra molécula de su entorno, generando

una alteración reversible o irreversible en la estructura afectada. Cuando estos radicales libres modifican una biomolécula, mediante transferencia o captura electrónica, se pueden generar reacciones en cadena a través de varios transportadores, los cuales sufren procesos secuenciales de óxido-reducción [15, 16]

Los radicales libres son generados tanto a través de procesos fisiológicos propios del organismo, como la respiración, metabolización y defensa, o por factores ambientales como la contaminación, radiación, aditivos químicos y medicamentos.

Las células han desarrollado mecanismos que las protegen del efecto nocivo de los radicales libres con base en un complejo sistema de defensa constituido por los agentes antioxidantes. Así, cuando se incrementa la producción de radicales libres, estos mecanismos se activan para controlar y estabilizar el ambiente redox intracelular o extracelular. Los antioxidantes se definen como aquellas sustancias que, presentes en bajas concentraciones respecto a las de un sustrato oxidable (biomolécula), retardan o previenen la oxidación [16]. Al interactuar con el radical libre, el antioxidante cede un electrón, se oxida y se transforma en un radical libre débil no tóxico. Existen dos tipos de antioxidantes: los endógenos, dotados por el propio sistema biológico, y los exógenos, tomados de la dieta.

3. Especies reactivas

Las estructuras subcelulares de generación de radicales libres incluyen principalmente las mitocondrias, los lisosomas, los peroxisomas, así como la membrana nuclear, la citoplásmica y la del retículo endoplásmico. La formación de estas especies radicales conducen además a la formación de otras especies reactivas altamente oxidantes que no son radicales libres, como ser peróxido de hidrógeno (H_2O_2), ácido hipocloroso (HClO) y peroxinitrito ($ONOO\cdot$), entre otras.

ERO y ERN son generadas y utilizadas por células como los neutrófilos, monocitos, macrófagos, eosinófilos y fibroblastos para eliminar organismos extraños como bacterias, parásitos y virus. Una vez formados por el metabolismo celular, los radicales libres son capaces de reaccionar rápidamente con la molécula o biomolécula vecina. En este sentido, las membranas biológicas, el ADN y proteínas

representan los grupos más susceptibles al daño provocado tanto por radicales libres como por especies oxidantes derivados de los mismos.

En ambos grupos de especies reactivas se encuentran entidades químicas consideradas como radicales libres y otras que no lo son (*Tabla 1*). Muchas de estas especies cumplen funciones fisiológicas normales, las cuales se transforman en citotóxicas, llevando incluso a la muerte celular cuando se producen en exceso [17, 18].

<u>Especies Reactivas de Oxígeno</u>		<u>Especies Reactivas de Nitrógeno</u>	
Radicales	No radicales	Radicales	No radicales
OH (hidroxilo)	H₂O₂ (peróxido de hidrógeno)	NO· (óxido nítrico)	NO₂⁻ (nitrito)
O₂⁻ (superóxido)	HOCl (ácido hipocloroso)	NO₂[·] (dióxido de nitrógeno)	ONOO⁻ (peroxinitrito)
HO₂⁻ (perhidroxilo)	peróxidos lipídicos		
RO₂⁻ (peroxilo)	oxígeno singlete		

Tabla 1. Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.

3.1. Especies Reactivas de Oxígeno

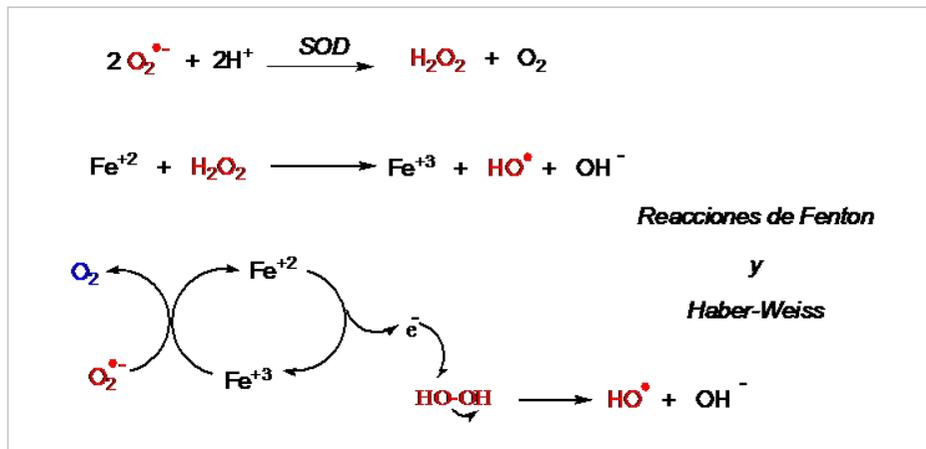
Dentro de este grupo pueden ser encontrados radicales libres y no-radicales que son agentes oxidantes o son fácilmente convertidos a radicales o ambos. Estas entidades se generan en el organismo como subproductos a consecuencia del metabolismo celular o bien a través de fuentes exógenas, como ser medicamentos, toxinas, infecciones y radiación, entre otras. El aumento acumulado de estas especies, ya sea por una sobreproducción de las mismas o por una disminución en las defensas antioxidantes, puede causar daños celulares irreversibles, llevando incluso a la muerte celular.

Estos factores conducen a una situación de estrés oxidativo, lo cual contribuye o retroalimenta el desarrollo de diversas enfermedades degenerativas como la aterosclerosis, cardiomiopatías, cáncer y enfermedades neurodegenerativas, entre otras.

Diversas fuentes endógenas a través de procesos bioquímicos son responsables de la generación de ERO y ERN. La mitocondria constituye otra importante fuente de formación de ERO [19, 20]. Aproximadamente 80 % del ATP que utilizamos se forma en las mitocondrias, donde se consume entre 85 y 90% del oxígeno. Allí, el oxígeno molecular disuelto entra a la cadena respiratoria para reducirse a agua mediante la acción de la citocromo C oxidasa (complejo IV), proceso en el cual se estima que alrededor del 1% del oxígeno consumido durante el transporte de electrones se transforma en anión superóxido a través de los complejos I (NADH deshidrogenasa) y III (Ubiquinol cit-c oxidoreductasa).

Varias enzimas oxidasas y oxigenasas, como también reacciones de oxidación no enzimáticas utilizan entre el 10-15 % del O_2 necesario por organismos eucariotas aeróbicos que no es consumido por la mitocondria. En este sentido, xantina oxidasa, es una de las enzima responsable en la producción de $O_2^{\cdot-}$, especialmente en condiciones de lesiones, como isquemia / reperfusión, donde se manifiesta en primer instancia una privación de oxígeno en determinado tejido, seguido de una reoxigenación [21,22]. Además de la oxidación mediada por xantina oxidasa, se han descrito otros procesos que involucran la formación de $O_2^{\cdot-}$, entre los que se pueden destacar la oxidación de catecolaminas y activación de la cascada del ácido araquidónico.

Si bien se ha descrito que el $O_2^{\cdot-}$ es moderadamente reactivo en solución, este puede posteriormente generar otras especies altamente reactivas, como H_2O_2 y OH^{\cdot} [23]. Así, mediante acción de la superóxido dismutasa (SOD), se cataliza la transferencia de un electrón de un superóxido a otro, reacción de dismutación, generando una molécula de O_2 y otra de H_2O_2 (*Esquema 1*). Esta última especie es responsable de una elevada toxicidad en células, lo que sumado a la acción de otros mediadores oxidantes, provocan la muerte celular por vía apoptótica. La formación del radical hidroxilo a partir de H_2O_2 en condiciones normales es bastante lenta, pero la reacción es catalizada en presencia de un metal de transición tal como el hierro o el cobre. Las reacciones de Fenton y Haber-Weiss (*Esquema 1*) explican la producción de radicales hidroxilos en los sistemas biológicos. El radical hidroxilo es un poderoso agente oxidante y citotóxico, el cual se considera como responsable directo del daño oxidativo sobre diversas biomoléculas, principalmente proteínas, membranas lipídicas y ADN, mediante reacciones que comprenden tanto adición como abstracción de radical hidrógeno.



Esquema 1. Procesos de formación de H₂O₂ y radical HO[•] catalizados por SOD y Fe²⁺/Fe³⁺ respectivamente.

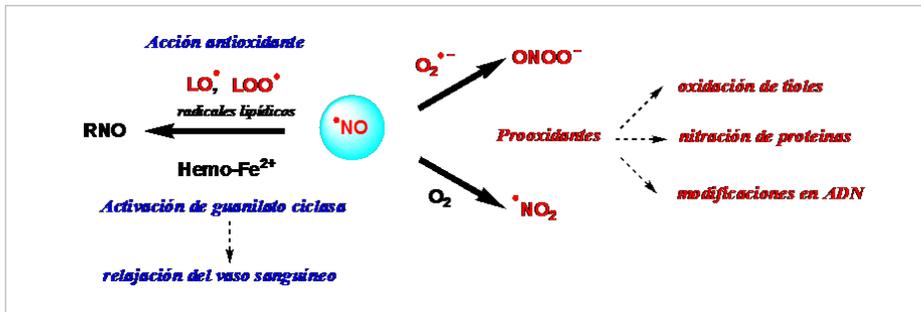
3.2. Especies Reactivas de Nitrógeno

Dentro de este grupo, las principales ERN que se producen fisiológicamente son el óxido nítrico (NO), el peroxinitrito (ONOO⁻) y el dióxido de nitrógeno (NO₂) (Tabla 1) [24]. El NO es formado fisiológicamente mediante una reacción de oxidación de la L-arginina en presencia de O₂ molecular y NADPH, catalizada por una familia de enzimas denominadas óxido nítrico sintasas (ONS) [25, 26]. La ONS presenta tres isoformas que se expresan en diferentes tejidos. Dos isoformas se expresan en forma constitutiva, la nONS presente en neuronas y la eONS en endotelio, mientras que la isoforma iONS, que se expresa de forma inducible, se encuentra principalmente en macrófagos.

La molécula de NO, la cual ha sido intensamente estudiada en las últimas décadas, es considerada un mediador endógeno en diversos procesos biológicos (Esquema 2). En condiciones fisiológicas normales presenta funciones tales como vasodilatación (regulador de la tonificación vascular), neurotransmisión (modulación de la función sináptica), destrucción de patógenos (defensa inmune) y capacidad antioxidante (inhibidor de los procesos de lipoperoxidación).

En el otro extremo, se ha observado que una sobreproducción de NO es capaz de alterar funciones claves en el organismo, tales como inhibición de la glicólisis, cadena respiratoria y replicación de ADN (Esquema 2) [27]. Así, bajo determinadas condiciones se puede llegar a una muerte celular inducida tanto por necrosis

como por apoptosis. El $\cdot\text{NO}$ puede dar lugar a especies altamente oxidantes, tales como ONOO^- y $\text{NO}_2\cdot$, por reacción con ERO . En este sentido ha sido planteada la hipótesis donde se manifiesta como crítico el balance entre la producción de $\cdot\text{NO}$ y $\text{O}_2\cdot^-$ en la patología de muchas enfermedades, como ser Alzheimer, Parkinson, isquemia-reperfusión, cáncer y aterosclerosis, entre otras [28, 29].



Esquema 2. Reacciones y efectos biológicos producidos por $\cdot\text{NO}$.

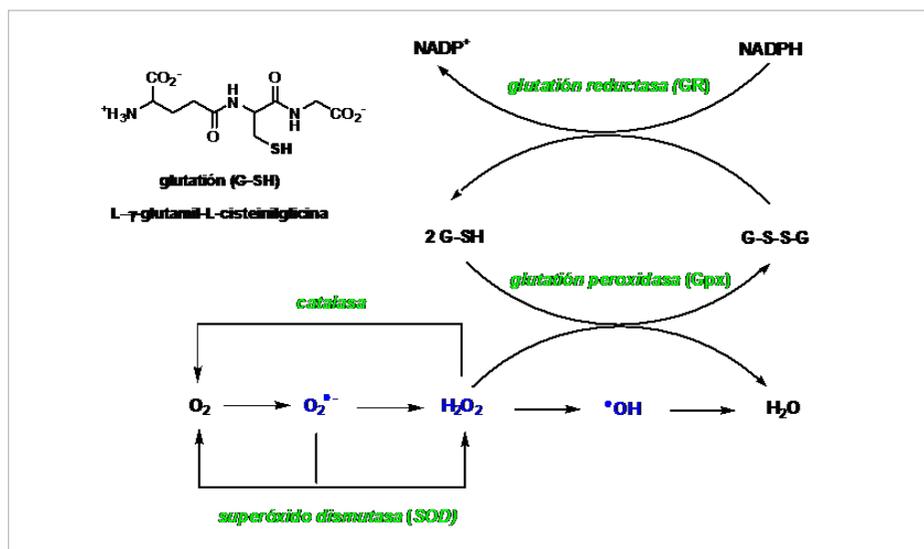
Por otro lado, ONOO^- es un potente agente oxidante el cual presenta una compleja reactividad bioquímica [30]. Si bien ONOO^- no es por sí mismo un radical libre, es capaz de producirlos mediante reacciones de homólisis con formación de radicales $\cdot\text{OH}$, $\text{NO}_2\cdot$ y $\text{CO}_3\cdot^-$ o bien mediante reacción redox directa con oxidación de tioles (radical tiilo) y centros metálicos mediante transferencia monoeléctrica. Entre las principales reacciones en que interviene ONOO^- es posible destacar: a) oxidación de tioles con formación tanto de radical tiilo como de ácido sulfénico y disulfuro, b) nitración en residuos de tirosina, lo cual puede desencadenar señales que terminen en un proceso de apoptosis celular, c) peroxidación de lípidos, que tiene un efecto importante en el desarrollo de aterosclerosis, d) modificaciones en el ADN mediante cambios estructurales de sus bases. Recientemente, muchos estudios han considerado al ONOO^- como una de las principales especies reactivas responsable de procesos neurodegenerativos causantes de enfermedades como Alzheimer y Parkinson [29, 31].

4. Sistemas de defensas antioxidantes

El mantenimiento de la homeostasis redox en el organismo se obtiene a través de un equilibrio entre la producción de especies reactivas y su eliminación. Si bien existe un daño oxidativo provocado por diferentes especies reactivas, como

se describe anteriormente, en condiciones fisiológicas normales estas especies son generalmente neutralizadas o eliminadas por las defensas antioxidantes presentes en nuestro organismo [2, 32, 33]. Según la fuente podemos dividir a los sistemas antioxidantes en dos grandes grupos, los endógenos, dotados por el propio sistema biológico, y los exógenos, provenientes de la dieta diaria.

Dentro del grupo de antioxidantes endógenos podemos diferenciar a los antioxidantes enzimáticos y los no enzimáticos. Dentro de las enzimas y las proteínas antioxidantes podemos destacar: a) SOD, responsable de catalizar la dismutación de $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 , b) catalasa, que descompone el H_2O_2 , c) glutatión peroxidasa, implicada en la reducción de H_2O_2 a H_2O , o bien de hidroperóxidos orgánicos al correspondiente alcohol y H_2O y d) ferritina, transferrina y cupreína, proteínas encargadas de transportar metales de transición como Cu y Fe, las que limitan la posibilidad de formar radical $\cdot OH$ por acción de dichos metales. Algunas de estas actividades enzimáticas se resumen en el *Esquema 3*.



Esquema 3. Mecanismo de acción antioxidante por parte de catalasa, SOD, GR y Gpx.

Dentro de los antioxidantes no enzimáticos el más destacado como blanco de las especies reactivas es glutatión reducido (G-SH), un tripéptido compuesto por ácido glutámico, cisteína y glicina (*Esquema 3*). Glutatión se encuentra tanto en forma intracelular, en concentraciones del orden de 1-10 mM, como extracelular en concentraciones micromolares. Cuando este tiol reacciona frente a especies

reactivas pasa a su estado oxidado (disulfuro, GSSG), situación que es revertida por la enzima glutatión reductasa (GR, *Esquema 3*). Así, la relación de G-SH/GSSG es un parámetro utilizado en diversos estudios como índice de estrés oxidativo.

Dos antioxidantes no enzimáticos muy importantes, los que provienen principalmente de la dieta (antioxidantes exógenos), son la vitamina C, el antioxidante hidrosoluble extracelular más abundante y la vitamina E, el antioxidante liposoluble mayoritario. Además, se han desarrollado análogos, híbridos y derivados sintéticos de algunos de los antioxidantes no enzimáticos mencionados anteriormente como forma de aumentar la capacidad antioxidante y/o modificar las propiedades fisicoquímicas. Entre ellos podemos citar a Trolox, análogo hidrosoluble de la vitamina E, un híbrido de la vitamina C-vitamina E y derivados fenólicos (BHT, BHA) [15].

Existe un grupo de compuestos naturales, los polifenoles, que son potentes antioxidantes presentes en verduras y frutas, en esta familia se encuentran los flavonoides y derivados, cumarinas y ácidos fenólicos entre otros. Entre las fuentes de polifenoles podemos citar como ejemplos las legumbres verdes, el ajo, el té verde, el aceite, las uvas y los frutos cítricos.

Gran parte de los derivados fenólicos antioxidantes y especies capaces de formar radicales oxigenados estables, presentan dos características estructurales: i) presencia de sustituyentes voluminosos (generalmente alquílico) vecinos al grupo hidroxilo o grupo con radical centrado en oxígeno, como forma de disminuir la reactividad por efecto estérico, ii) presencia de un agrupamiento adecuadamente sustituido que pueda contribuir a la deslocalización del radical libre, generando un aumento de estabilidad y disminución en la reactividad. Esto se debe a que los radicales libres presentan mayor estabilidad en situaciones como: a) electrones desapareados sobre átomos de oxígeno, con heteroátomos (como oxígeno) con pares de electrones libre en posiciones *orto* y *para* de un anillo aromático, b) radical centrado en carbono con dobles enlaces o heteroátomo en posición α y c) la llamada estabilización captodativa, donde el átomo que soporta al electrón desapareado está unido tanto a un grupo donador como aceptor de electrones [15].

5. Estrés oxidativo / nitro-oxidativo y neurodegeneración

Las enfermedades neurodegenerativas se han visto desde siempre como las más enigmáticas y problemáticas dentro de la medicina, donde su conocimiento ha estado circunscrito durante mucho tiempo a sus aspectos clínicos y, en algunos casos, a diferentes intentos terapéuticos. Hasta aproximadamente 30 años atrás, poco se conocía sobre las causas de estas enfermedades, hoy en día, gracias a los avances logrados se están abriendo nuevas vías de investigación en un conjunto de procesos que representan un gran desafío y graves problemas médicos, asistenciales, sociales y económicos a nivel mundial, asociado esto con un aumento masivo de las expectativas de vida.

Son diversos los factores que conducen a desencadenar y acelerar los trastornos neurodegenerativos, por lo que se ha planteado que son resultado de una patología multifactorial [34]. A pesar de que cada trastorno presenta su mecanismo molecular y sus manifestaciones clínicas particulares, existen algunas vías generales que se reconocen en las distintas patologías. Entre ellas podemos mencionar: estrés oxidativo / nitro-oxidativo, disfunción mitocondrial, agregación peptídica y proteica, desequilibrio de ciertos cationes metálicos, inflamación, excitotoxicidad, factores genéticos, pérdida de soporte trófico, entre otros (*Figura 1*). Ninguno de estos mecanismos aparece como el responsable de la etiología de las enfermedades neurodegenerativas, sino que estas vías patológicas actuarían de forma sinérgica, a través de complejas interacciones que promueven la neurodegeneración.

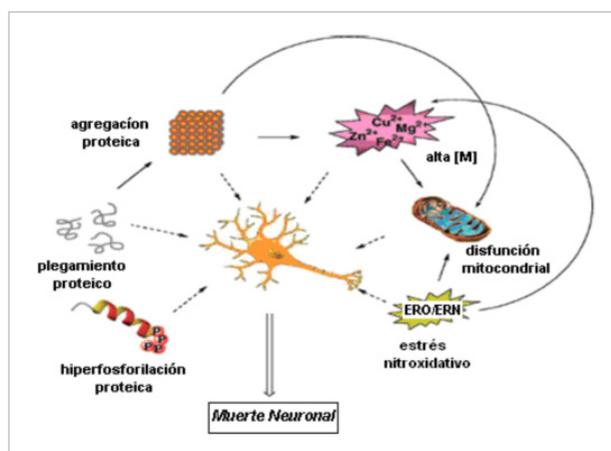


Figura 1. Eventos multifactoriales que conducen a la muerte neuronal. Adaptado de Referencia [34].

Se ha demostrado en múltiples estudios el efecto del estrés oxidativo / nitro-oxidativo en la progresión de enfermedades neurodegenerativas o condiciones traumáticas como Alzheimer, Parkinson, isquemia-reperfusión y esclerosis lateral amiotrófica, entre otras [11, 35-39]. Se ha determinado en individuos con Alzheimer y Parkinson que el transcurso de estas enfermedades se ven acompañadas por un considerable aumento de formación de ERO y ERN, las cuales pueden resultar el efecto o la causa de las mismas [40].

Estos tipos de trastornos presentan una especificidad en los procesos patológicos por determinados tipos de neuronas. La especial sensibilidad que presenta el SNC frente a un daño oxidativo se debe a factores tales como [35]:

1. elevada actividad metabólica oxidativa: el cerebro presenta un alto consumo de oxígeno
2. presencia de una alta proporción de lípidos fácilmente peroxidables, que producen aldehídos como malondialdehído (MDA), marcador de estrés oxidativo y 4-hidroxi-nonenal (4-HNE), este último es un derivado altamente reactivo y neurotóxico
3. elevadas concentraciones de cationes metálicos (Fe^{2+} , Cu^{2+}) los cuales mediante reacción de Fenton o Haber-Weiss promueven la formación del radical $\cdot OH$
4. una disminuida capacidad antioxidante, menor actividad antioxidante de catalasa, SOD y Gpx en comparación a otras regiones del organismo (hígado y corazón)
5. reducida capacidad de regeneración celular
6. formación de H_2O_2 como consecuencia de la deaminación oxidativa por parte de la monoaminoxidasa (MAO) de aminas endógenas que actúan como neurotransmisores (noradrenalina, dopamina, serotonina).

El estado oxidativo celular es un punto clave en el control y la regulación de diversos caminos de transducción de señales celulares. Por ejemplo, un aumento de las alteraciones oxidativas en proteínas o fragmentos peptídicos que presentan un papel clave en el transcurso de enfermedades neurodegenerativas tales como α -sinucleína (Parkinson), β -amiloides (Alzheimer) y SOD (esclerosis lateral amiotrófica), podrían resultar en un aumento de plegamientos incorrectos y degradaciones [40]. Además, se ha descrito que el daño oxidativo en células gliales (neuroglía) es capaz de activar estas células generando complejas respuestas

biológicas, entre ellas un aumento en la expresión de genes que involucran la producción de NO, mediante formación de iONS, y citoquinas pro-inflamatorias. En estas condiciones las neuronas son un blanco muy susceptible de daño y muerte.

7. Enfermedad de Alzheimer

Dentro de las enfermedades neurodegenerativas con mayor impacto social de los últimos tiempos se encuentra la enfermedad de Alzheimer (EA), la cual ha sido calificada como una de las epidemias de los dos últimos siglos. A nivel mundial, se estima que alrededor de 25 millones de personas se encuentran afectadas por esta patología neurodegenerativa. La EA una patología causante de demencia cortical progresiva e irreversible, se caracteriza por un trastorno de las capacidades cognitivas [41-43]. En relación a esto se ha observado una disminución importante de neurotransmisores, especialmente acetilcolina y receptores colinérgicos nicotínicos (déficit colinérgico).

La fisiopatología de esta enfermedad se caracteriza por la presencia de ovillos neurofibrilares, (hiperfosforilación de la proteína tau) [44] y placas neuríticas seniles (agregados insolubles de β -amiloides) en número mayor de lo normal [45]. La hiperfosforilación de tau es un proceso anómalo evidenciado en diversas enfermedades neurodegenerativas. En este sentido, glicógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3), es la principal responsable de la hiperfosforilación de tau. Esta anormal fosforilación causa una inestabilidad en microtúbulos asociados a la proteína tau, con posterior formación de los llamados pares de filamentos helicoidales, los mayores componentes de los ovillos neurofibrilares.

Por otra parte, en condiciones fisiológicas normales, fragmentos peptídicos amiloidogénicos son generados a partir de una proteína precursora de amiloides (proteína de trasmembrana) mediante la acción de la enzima α -secretasa. En estas condiciones los fragmentos generados cumplen funciones claves en la acción neuronal (funciones tróficas). Mientras tanto, bajo condiciones patológicas, la proteína precursora es degradada consecutivamente por las enzimas β - y γ -secretasa, generando fragmentos peptídicos denominados β -amiloides. Estos últimos, solubles en el medio celular, son capaces de formar agregados insolubles mediante un cambio conformacional que los convierte en importantes agentes neurotóxicos.

Son muy extensos los trabajos que relacionan la importancia del estrés oxidativo / nitro-oxidativo en el desarrollo de esta enfermedad neurodegenerativa [46-50]. En relación a esto, ha sido estudiado el daño neuronal por causa de la formación de β -amiloides. Algunos de los mecanismos planteados y propuestos se basan en la generación de estrés oxidativo, e interrupción de la homeostasis de Ca^{+2} [51-53]. Un aumento de Ca^{+2} en la mitocondria conduce a una sobreproducción de $\text{O}_2^{\cdot-}$. Por otra parte, la interacción de β -amiloides con cationes metálicos como Fe_2^+ y Cu^+ produce H_2O_2 en el medio extracelular, lo cual genera una situación de lipoperoxidación en membrana celular con formación de 4-HNE que puede modificar covalentemente a diversas proteínas. Tanto 4-HNE como las ERO provocan modificaciones oxidativas en la proteína tau, promoviendo la formación de los ovillos neurofibrilares neurotóxicos. Recientemente se ha estudiado la capacidad de 4-HNE en acelerar la formación de protofibrillas de β -amiloides y su relación con la toxicidad en pacientes de Alzheimer [54].

Por otra parte, numerosos estudios relacionan el $\cdot\text{NO}$ con las enfermedades neurodegenerativas, siendo la EA una de las más prevalentes. Es sabido que el $\cdot\text{NO}$ se une a residuos proteicos y los modifica por S-nitrosilación, principalmente residuos de tirosina. De hecho, en muestras cerebrales postmortem de pacientes con EA se detectan histopatológicamente residuos de nitrotirosina en los ovillos neurofibrilares. En cambio, este hecho no se detecta en muestras de pacientes añosos. Esto implica que las proteínas en los ovillos han sido modificadas por el $\cdot\text{NO}$. Ciertos autores han demostrado que altos niveles de estrés nitro-oxidativo facilitan el desplegamiento y agregación proteica, ambas características de EA y otras condiciones neurodegenerativas [55, 56].

¿Cuáles serían las potenciales fuentes de $\cdot\text{NO}$ en EA? Por una parte, es sabido que el péptido β -amiloide ($\text{A}\beta$) está sobreexpresado en el cerebro de pacientes que sufren EA. En estudios in vitro, ha sido demostrado que éste promueve la liberación de $\cdot\text{NO}$ el cual puede actuar sobre las proteínas a nivel de los ovillos neurofibrilares [57]. Además, es sabido que las placas $\text{A}\beta$ están asociadas a microglías reactivas y como se mencionó anteriormente las células gliales liberan $\cdot\text{NO}$ en condiciones de inflamación [58]. Entonces, dado que las microglías y monocitos son estimulados por $\text{A}\beta$ aumentando la expresión de la iNOS sirven de fuente de liberación de $\cdot\text{NO}$ [59].

8. Enfermedad de Parkinson

La EP es un desorden neurodegenerativo del movimiento con alta incidencia a nivel mundial, siendo el segundo trastorno neurodegenerativo más común luego de la EA, afectando al 1% de la población por encima de los 65 años y un 5% de la población por encima de los 85 años [60, 61]. La EP es una enfermedad progresiva, de inicio tardío, que se define clínicamente por síntomas motores, incluyendo: bradicinesia (dificultad o falla para ejecutar movimientos voluntarios), temblor de reposo, rigidez, inestabilidad postural, y menos frecuentemente, complicaciones no-motoras, tales como demencia, depresión y disfunción autonómica. Patológicamente, la EP se caracteriza por una marcada degeneración de neuronas dopaminérgicas (en la sustancia nigra pars compacta) y por la presencia (en las neuronas sobrevivientes de dicha región) de cuerpos de inclusión citoplasmáticos, cuerpos de Lewis (CL) e inclusiones neuríticas [62].

Numerosos estudios evidencian el rol del $\cdot\text{NO}$ en el desarrollo de la EP. La muerte neuronal dopaminérgica mediada por $\cdot\text{NO}$ involucra la S-nitrosilación de proteínas asociadas a los cambios patológicos de la EP: Parkin, XIAP (del inglés pro-survival X-linked inhibitor of apoptosis), peroxiredoxina 2, PKC-6 [63-65]. Por ejemplo, parkin es un componente del complejo ubiquitina ligasa E3 que protege a las neuronas dopaminérgicas del daño por degradación proteica. Su S-nitrosilación fue evidenciada en estudios *in vitro* y en modelos animales de EP *in vivo* así como en tejidos de pacientes postmortem pero no en tejidos de pacientes añosos. Además, el $\cdot\text{NO}$ altera la solubilidad de parkin, y en consecuencia se forman agregados intracelulares y pérdida de función neuroprotectora.

Por otra parte, existen numerosas evidencias que vinculan a la proteína α -sinucleína (αS) con la EP, por esta razón, se ha estudiado extensamente el rol de esta proteína en dicha enfermedad. La importancia del estudio de αS reside en que existen diversas patologías, denominadas en forma conjunta sinucleinopatías [65, 66]. Las sinucleinopatías constituyen un grupo de trastornos neurodegenerativos cuya característica patológica principal es la presencia de agregados proteicos intracelulares, donde la αS es el componente clave en estos agregados. Los mismos son depositados en poblaciones neuronales susceptibles, tanto en neuronas dopaminérgicas, como no-dopaminérgicas y también en la glia.

Entre las principales enfermedades vinculadas con los agregados de α S se encuentran la EP, demencia con cuerpos de Lewy y atrofia multisistémica, entre otras [67-69]. Cabe mencionar que se ha encontrado acumulación de α S en las placas neuríticas seniles (agregados insolubles de β -amiloídes), los cuales son importantes agentes neurotóxicos presentes en la EA [70]. De hecho fue la primera relación encontrada entre una enfermedad neurodegenerativa y la α S [71]. Existen diversos factores que promueven la formación de estructuras fibrilares de la proteína α S, como ser interacción con cationes metálicos (Cu^{+2}), mutaciones de α S, pesticidas (Rotenona, Paraquat, Maneb) y estrés oxidativo / nitro-oxidativo, entre otros.

Diversos estudios han reportado una fibrilación incrementada de α S debido al efecto de agentes oxidantes tales como peróxido de hidrógeno y peroxinitrito. En este sentido, la aceleración de la agregación de α S puede deberse también a diversas modificaciones post-traduccionales que puede sufrir la proteína. La nitración de residuos de tirosina es la modificación post-traducciona más frecuente (es decir, proteínas que contienen el producto de la oxidación de tirosina, 3-nitrotirosina) y se ha demostrado que la nitración de esta proteína induce la formación de conformaciones parcialmente plegadas [72-74]. Bajo condiciones que promueven el estrés nitro-oxidativo, los oligómeros de α S pueden unirse covalentemente a través de la formación del enlace *o,o*-ditirosina, lo cual hace que el proceso de polimerización se vuelva irreversible. Así, el hecho de entender los mecanismos de estas sinucleinopatías, podrá aportar valiosa información en la investigación de nuevas terapias y/o dianas terapéuticas, las cuales en el futuro podrían prevenir o retardar la progresión tanto de la EP como de las demás sinucleinopatías relacionadas, para las cuales en la mayoría de los casos actualmente existe sólo una terapia paliativa [75, 76].

9. Esclerosis Lateral Amiotrófica

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa que comienza afectando neuronas motoras superiores e inferiores que se manifiesta como una debilidad progresiva en miembros y cara, atrofia, espasticidad, reflejos hiperactivos y finalmente compromiso respiratorio y muerte prematura en un período de 3 a 5 años desde la aparición de los primeros síntomas [77]. Aproximadamente el 10% de los casos se heredan de manera autosómica dominante, mientras que la mayoría de los casos de ELA son esporádicos y sin

bases genéticas. Si bien varios mecanismos, incluyendo neuroinflamación, estrés oxidativo, defectos en el transporte de glutamato y toxicidad del glutamato, disfunción mitocondrial, mutaciones en el gen que codifica la superóxido dismutasa 1 (SOD-1), juegan un rol en la patogénesis de la ELA, ésta no está aun completamente elucidada [78-81]. Lamentablemente, las opciones de tratamiento actuales no previenen la progresión de la enfermedad y muerte, solo extienden la vida unas semanas más [77].

Como mencionamos anteriormente, el 20% de los pacientes con ELA familiar presentan mutaciones en un cromosoma (21q 22.1-22.2) que codifica la enzima SOD-1. La sobreexpresión de muchas de las mutaciones de ELA en animales transgénicos resulta en el desarrollo de la enfermedad [82]. Sin embargo, la enfermedad no es producto de la pérdida de actividad de la SOD ya que en animales knock-out para este gen la enfermedad no se desarrolla [83].

En 1993, teniendo en cuenta que la SOD cataliza la nitración de tirosina, Beckman y col. postularon que las mutaciones podrían resultar en un aumento de la actividad nitrante [84]. Esta hipótesis se refuerza al demostrarse que la afinidad por el zinc de la SOD asociada a ELA es cerca de 30 veces menor que la SOD normal. En consecuencia, se observa un aumento en la eficiencia catalítica de la SOD de la reacción de nitración de tirosina mediada por peroxinitrito. Además, el peroxinitrito puede activar los astrocitos de la médula espinal y generar un fenotipo reactivo que induce la muerte de las motoneuronas. Estos efectos pueden ser prevenidos por incremento de las defensas antioxidantes en los astrocitos ya sea por activación del factor de transcripción Nrf2 o por tratamiento con antioxidantes [85].

10. Blanco Terapéuticos en Patologías Asociadas al Estrés Oxidativo / Nitro-oxidativo

Prácticamente ninguna de las terapias farmacológicas actuales son capaces de detener o revertir la progresión de trastornos neurodegenerativos, como la EP, EA o ELA. Esto puede deberse a que los fármacos empleados tratan únicamente los síntomas de la enfermedad en lugar de apuntar a las causas moleculares del trastorno. Además, estos fármacos interactúan con un único blanco terapéutico en lugar de enfrentar la naturaleza multifactorial de estas enfermedades.

Dada la naturaleza multifactorial de las enfermedades neurodegenerativas, la investigación farmacológica en los últimos años se ha orientado a la búsqueda de compuestos multifuncionales o fármacos híbridos, los cuales tienen la propiedad de actuar en distintos blancos terapéuticos [86-88]. Se define como fármaco multifuncional aquella entidad química única capaz de modular simultáneamente distintos blancos moleculares responsables de una enfermedad multifactorial. Un enfoque muy utilizado en los últimos años ha sido combinar, en una única molécula, la estructura del farmacóforo responsable de modular la actividad biológica de un blanco molecular ya validado con una función química que le confiera otras propiedades biológicas de interés.

En base a lo expuesto anteriormente, el estrés oxidativo / nitro-oxidativo puede ser considerado como diana terapéutica fundamental para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. Por esta razón, en las últimas dos décadas se ha profundizado en la investigación y desarrollo de nuevos fármacos protectores frente a especies reactivas [89, 90].

De ahí, que posibles fármacos neuroprotectores con potencial capacidad de inhibir este proceso podrán retardar o prevenir en cierto grado el avance de los trastornos neurodegenerativos.

11. Antioxidantes como inhibidores de la agregación y nitración de α -sinucleína

Las terapias disponibles actualmente para el tratamiento de trastornos neurodegenerativos son incapaces de detener o atenuar la neurodegeneración asociada con las α -sinucleinopatías. Así, podemos mencionar el caso de la EP, para la cual el tratamiento actual se basa en la reposición exógena de dopamina, a través de la administración de L-dopa. Este tratamiento mejora los síntomas pero no detiene la progresión del proceso neurodegenerativo. Sin embargo, a pesar de que esta droga ofrece un alivio sintomático a los pacientes, también presenta muchos efectos secundarios [34].

La conversión de una proteína o péptido soluble en agregados filamentosos insolubles es el evento central en la patogénesis de diversas enfermedades neurodegenerativas, como enfermedad por priones, EA y sinucleinopatías [91-93]. En este sentido, ha sido propuesta la inhibición de la agregación de α S como una atractiva estrategia de intervención terapéutica frente a la EP y a las

demás sinucleinopatías mencionadas anteriormente [94-96]. Recientemente se han publicado numerosos trabajos donde se identifican péptidos sintéticos o pequeñas moléculas orgánicas, así como también algunas proteínas (chaperonas), que son capaces de inhibir la agregación de α S.

En los últimos años, pequeñas moléculas orgánicas, de las cuales muchas se utilizan en clínica como agentes antioxidantes, antiinflamatorios, antibacterianos y como agentes antiparkinsonianos entre otros, han sido descritas como inhibidores y desagregantes de las fibras de α S y por lo tanto como potenciales agentes neuroprotectores. Se han identificado pequeñas moléculas con propiedades antioxidantes (ej. curcumina, ácido ferúlico, resveratrol, taninos) y antiinflamatorias (ej. aspirina, ibuprofeno, diclofenac) como inhibidores de la agregación de α S y también como desestabilizadores de las fibras preformadas in vitro [97-99].

Diversos trabajos han profundizado en el estudio de las modificaciones que sufre α S por efectos del estrés nitro-oxidativo. Por ejemplo, se ha estudiado la nitración de α S in vitro, utilizando flujos de peroxinitrito como agente nitrante. En una publicación reciente se describe el efecto de protección sobre la nitración por parte de nitronas fenólicas atrapadoras de radicales libres. Estos compuestos son análogos de la nitrona PBN y (α -fenil-*N*-*t*-butilnitrona) han sido sintetizados utilizando una ruta sintética rápida y eficiente basada en la irradiación por microondas. Estas nitronas han mostrado buena actividad como atrapadoras de radicales libres y demostrado que evitan la nitración de α S mediada por peroxinitrito [100].

En este contexto, se ha descrito en muchos procesos neurodegenerativos una sobreproducción del radical \cdot NO por acción tanto de la enzima óxido nítrico sintasa neuronal (nONS) como de la inducible (iONS). Este radical mediante reacción con O_2^- formaría peroxinitrito, altamente neurotóxico. Así, fármacos capaces de inhibir la nONS, iONS o la inducción de iONS representan una potencial estrategia en el desarrollo de agentes neuroprotectores [101-103].

12. Nitronas neuroprotectoras

En estas últimas dos décadas se ha notado una profundización en la investigación y desarrollo de nuevos fármacos capaces de actuar como protectores frente a

especies reactivas. En este sentido ha sido ampliamente estudiada la utilización de nitronas, especialmente derivadas de α -fenil-N-t-butilnitrona (PBN, *Esquema 4*), con actividad neuroprotectora [35, 104-107]. A comienzos de la década del 60, diversos compuestos portando la funcionalidad nitrona (PBN, DMPO, *Esquema 4*) se comienzan a utilizar en técnicas para detectar y estabilizar radicales, “spin trapping” [108].

Las primeras observaciones de la actividad farmacológica de las nitronas se realizaron en la década del 80, cuando se observa la capacidad de PBN de proteger a ratas en condiciones de shock y traumatismos. Posteriormente, se determina la eficiencia de PBN en varios modelos neurodegenerativos, demostrando por primera vez la actividad neuroprotectora en lesiones cerebrales. En un principio, se piensa que la actividad neuroprotectora de la funcionalidad nitrona se debe a su capacidad como atrapador de radicales libres (ARL).

En estos estudios, se observa que PBN presenta una importante protección cuando es administrada luego de generada la lesión y una buena actividad neuroprotectora a dosis muy inferiores a las necesarias para actuar como un efectivo ARL. Esto sugiere que la actividad de nitronas no es simplemente debida a la capacidad de actuar como ARL, sino que estarían en juego otros mecanismos.

Por otro lado, se ha determinado que PBN es capaz de inhibir la activación de la mitógeno quinasa MAP p-38, con lo que se suprime la formación de genes específicos capaces de promover, por ejemplo, la formación de iONS en procesos neuroinflamatorios [109]. Por ejemplo, se ha evidenciado una significativa activación de la MAP p-38 en regiones cerebrales de pacientes con Alzheimer, principalmente en neuronas cercanas a las llamadas placas neuríticas seniles (agregados insolubles de β -amiloides) [35]. Además de la activación de MAP p-38 por los β -amiloides otros activadores son la IL-1 β (citoquina pro-inflamatoria) o el H₂O₂.

Se ha demostrado, además, la capacidad de PBN de inhibir la formación de H₂O₂ como un subproducto de la respiración en mitocondrias cerebrales [110]. Dadas las evidencias que indican la importancia del H₂O₂ y otras ERO tanto como moléculas de señalización en procesos de transducción de señales como en la inactivación de fosfatasa que intervienen en los mencionados procesos, se reafirman las hipótesis que plantean que la acción neuroprotectora de las nitronas, principalmen-

te PBN y sus derivados, se basa en la inhibición de procesos neuroinflamatorios producidos por especies neurotóxicas.

En un esfuerzo para optimizar el perfil biológico de PBN, una diversidad de nitronas tipo-PBN han sido diseñadas y sintetizadas [111]. La nitrona NXY-059 fue evaluada en ensayos clínicos de fase III pero desafortunadamente no tuvo efectos beneficiosos para el tratamiento de pacientes con accidente cerebrovascular isquémico [112]. A pesar de este resultado, la hipótesis de utilizar las nitronas como agentes neuroprotectores permanece viable.

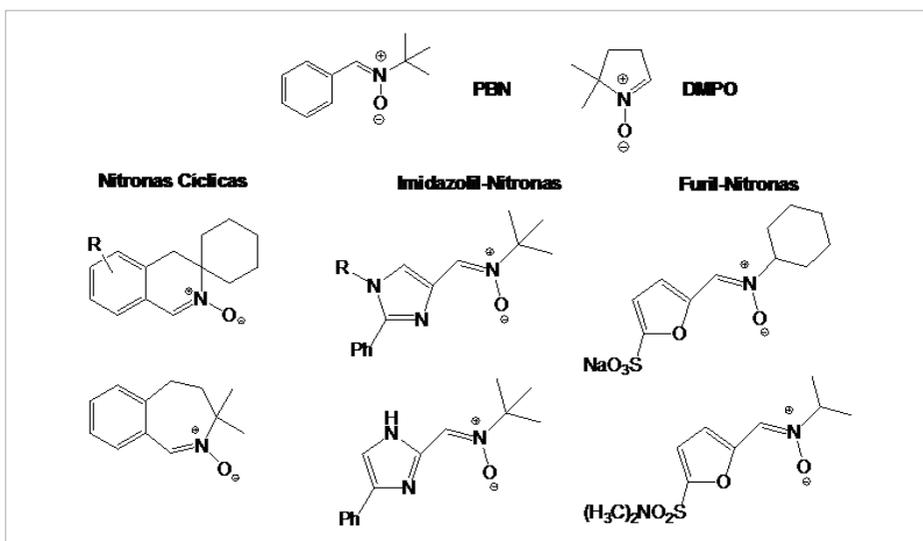
Es importante mencionar que tanto las propiedades químicas y bioquímicas de las nitronas, así como su toxicidad, dependen en gran parte del patrón de sustitución de esta funcionalidad. La inclusión de anillos heterocíclicos y la conjugación extendida pueden ser factores que aumenten la biodisponibilidad, reduzcan la toxicidad y mejoren la capacidad ARL y neuroprotectora. En este sentido, recientemente nuestro grupo de trabajo ha desarrollado derivados heterocíclicos incorporando el farmacóforo nitrona, con el objetivo de generar compuestos que presenten una superior actividad como agentes ARL y neuroprotectores en referencia a PBN [89]. Así, se trabajó con cuatro familias de sistemas heterocíclicos: 1,2,3-tiadiazol; 1,2,4-tiadiazol; 1,2,5-oxadiazol N-óxido (furoxano) y con derivados de benzo[1,2-c]1,2,5-oxadiazol (benzofuroxano). Se estudiaron las propiedades antioxidantes, como agentes ARL (mediante espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica) y neuroprotectoras (en modelo celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y) de las heteroarilnitronas desarrolladas. Otro aspecto a destacar, es la capacidad que presentaron estas heteroarilnitronas para atrapar y estabilizar diferentes tipos de radicales libres centrados en oxígeno, carbono y azufre [113].

Además, otros estudios han demostrado buenas propiedades antioxidantes in vitro así como actividad farmacológica in vivo para nitronas derivadas de Trolox (derivado de α -tocoferol). Esto demostró que las nitronas que poseen un grupo fenol exhiben la mejor actividad antioxidante [111, 113]. En este sentido, recientemente fueron sintetizadas nitronas fenólicas derivadas del spin trap PBN y se evaluaron sus propiedades antioxidantes, anti-inflamatorias y neuroprotectoras en células neuronales [100]. Se realizó la síntesis de los compuestos utilizando calentamiento asistido por microondas y por distintas técnicas se demostraron las propiedades antioxidantes y neuroprotectoras de estos compuestos. La incubación con concentraciones subtóxicas de estas nitronas, protege a las células

de neuroblastoma SHSY5Y de la muerte inducida por SIN-1 (agente que induce la producción de peroxinitrito) y por 6-OHDA (neurotoxina que produce un modelo experimental de Parkinson).

Dado que el sistema nervioso central es un sitio muy susceptible a especies oxidantes, aumentar la capacidad antioxidante y atrapadora de radicales libres podría constituir un enfoque racional para prevenir y detener el daño neuronal que ocurre en enfermedades neurodegenerativas. Las hidroxifenilnitronas serían prometedoras en cuanto a su potencial uso terapéutico como agentes neuroprotectores.

Con el objetivo de mejorar la capacidad como agentes ARL e inhibidores de la lipoperoxidación se desarrollaron diversas nitronas cíclicas (*Esquema 4*) [114, 115]. Así, se generaron derivados con mayor capacidad de atrapar los radicales libres hidroxilo y superóxido, evidenciado mediante ensayos químicos y por espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica (RPE). Recientemente, se han descrito trabajos donde se pone de manifiesto las ventajas presentadas por diversas heteroaril-nitronas con respecto a la nitrona prototipo, PBN [100, 116-118]. En este sentido, se han desarrollado fenil-imidazolil-nitronas con mayor actividad neuroprotectora y menor toxicidad que PBN (*Esquema 4*) [119].



Esquema 4. Nitronas cíclicas y heteroaril-nitronas con actividad neuroprotectora.

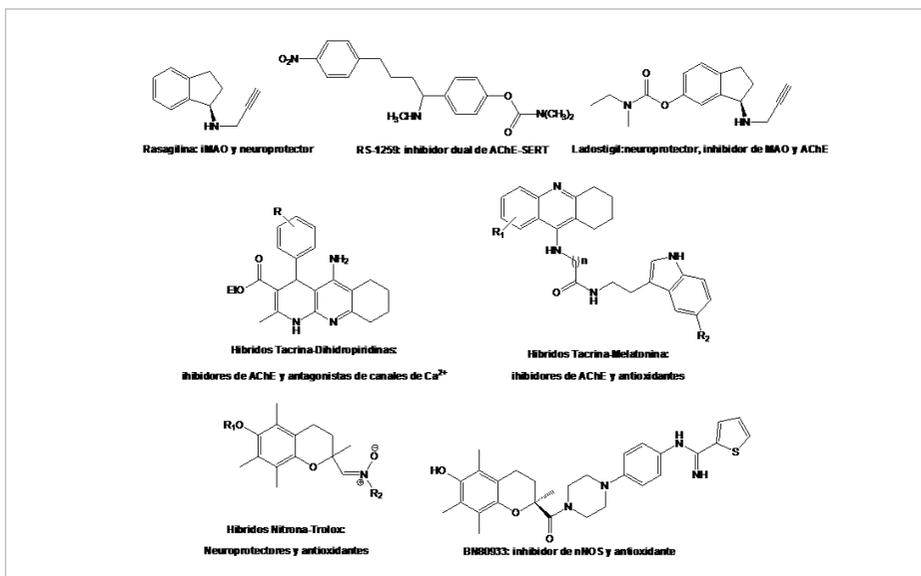
Mediante un estudio QSAR (quantitative structure-activity relationship) de esta serie de nitronas, se evidencia que la actividad anti-estrés oxidativo es dependiente del nivel energético del orbital molecular ocupado de mayor energía (E_{HOMO}) y de la lipofilia teórica (clogP) [111]. La dependencia con la E_{HOMO} es fácilmente entendible en términos químicos, conociendo los antecedentes de la funcionalidad nitrona en participar como especie capaz de aceptar un radical libre (“spin trapping”) a través del proceso en el que la nitrona cede un electrón perteneciente al nivel energético más alto ocupado. Mientras que la lipofilia se encontraría directamente relacionada con la posibilidad de alcanzar selectivamente su lugar de acción, mediante el pasaje de a través de la barrera hematoencefálica, para así alcanzar sus blancos de acción en el sistema nervioso central.

Otras heteroaril-nitronas descritas con efectos neuroprotectores son derivadas de furil-nitrona (*Esquema 4*), estos derivados han mostrado tanto inhibición in vitro e in vivo de los efectos neurotóxicos causados por β -amiloides, así como la reducción de inflamación neuronal [120].

Además, se ha visto mediante experimentos de RPE que la presencia de sistemas heterocíclicos puede aumentar la estabilidad del radical nitróxido formado mejorando así su capacidad como ARL [119]. Tanto las propiedades químicas y bioquímicas de las nitronas como su toxicidad dependen en gran parte del patrón de sustitución (factores estéricos y electrónicos) de esta funcionalidad. La inclusión de anillos heterocíclicos y conjugación extendida pueden ser factores que aumenten la biodisponibilidad, reduzcan la toxicidad y mejoren la capacidad como ARL y neuroprotectores. En este sentido, la inclusión de anillos heterocíclicos capaces de inhibir sistemas enzimáticos claves en enfermedades neurodegenerativas podrá aportar un sinergismo en la bioactividad deseada, generando así fármacos híbridos o multifuncionales. Con respecto a este último punto, estrategias terapéuticas recientes se basan en el diseño de entidades químicas que combinan dos o más farmacóforos responsables de diferentes actividades a nivel del sistema nervioso central en relación con procesos neurodegenerativos [121, 122].

Estos compuestos bi- o multifuncionales podrán ejercer una mayor eficacia sintomática, mayor actividad neuroprotectora y menores efectos adversos, por el uso de menores dosis. En este sentido se pueden citar algunos ejemplos de agentes descubiertos en forma casual: PBN, neuroprotector y agente ARL; Rasagilina (*Esquema 5*), fármaco antiparkinsoniano, inhibidor de monoaminoxidasa

(MAO) B y neuroprotector; Galantamina y Donepezilo, inhibidores de AChE y moduladores de receptores de *N*-metil-D-aspartato. Por otra parte, muchos fármacos se han desarrollado mediante un diseño que involucra la utilización de diversos farmacóforos. Así, se puede mencionar el diseño de compuestos para el tratamiento de la EA que combinan la acción inhibitoria de AChE con otras bioactividades (*Esquema 5*). Entre las bioactividades se puede destacar: inhibición del transporte de serotonina (para el tratamiento de la ansiedad y depresión, RS-1259); inhibición de la MAO y concomitante efecto neuroprotector (Ladostigil); antagonismo de canales de Ca²⁺, híbridos Tacrina-dihidropiridinas; propiedades antioxidantes, híbridos Tacrina-Melatonina. En el mismo sentido, otros derivados se han diseñado con el farmacóforo antioxidante dihidrocromeno combinado a grupos inhibidores de nONS o al agrupamiento nitronas (*Esquema 5*) [118].



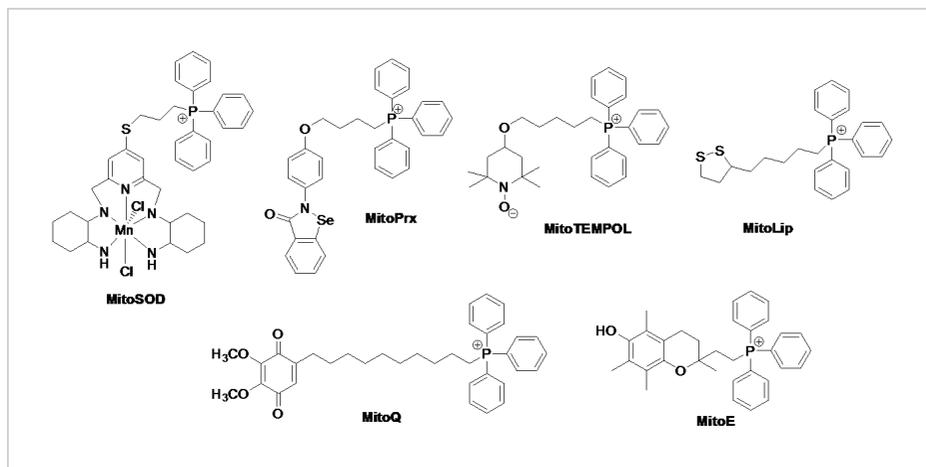
Esquema 5. Compuestos bi- o multifuncionales con acción en patologías del sistema nervioso central.

13. Antioxidantes dirigidos a la mitocondria para el tratamiento de ELA, EA y EP

Algunos estudios evidencian que el tratamiento con antioxidantes puede disminuir o retrasar la progresión de la enfermedad en modelos animales de enfermedades neurodegenerativas. Antioxidantes naturales como coenzima Q (CoQ), vitamina E (tocoferol) y polifenoles del té verde poseen efectos protectores

en modelos animales de ELA, EA y EP [123, 124]. Sin embargo, mientras que los estudios epidemiológicos en el hombre indican cierto rol protector de la vitamina E en la prevención de enfermedades neurodegenerativas, los ensayos clínicos muestran resultados contradictorios [125]. Una de las razones por las cuales se observa esta pérdida de eficiencia por parte de los antioxidantes naturales puede ser la dificultad de atravesar la barrera hematoencefálica. Por ejemplo, se ha descrito que ratas que han recibido CoQ durante 2 meses no presentan aumento de sus niveles cerebrales de CoQ [126].

Es más, tanto el tocoferol y la CoQ por su lipofilia se acumulan en la membrana celular y no alcanzan niveles intracelulares adecuados para combatir las ERO y ERN intracelular. Para superar las limitaciones de los antioxidantes naturales se han desarrollado antioxidantes dirigidos a la mitocondria. Estos antioxidantes son derivados de tocoferol [127], ubiquinona [128-131], ácido lipoico [132], spin trap [133], y peroxidasa mimético ebselen [134]; y son dirigidos a la mitocondria debido a la presencia de un catión trifenilfosfonio lipofílico (*Esquema 6*).



Esquema 6. Estructura de antioxidantes dirigidos a la mitocondria.

El MitoQ es el antioxidante dirigido a mitocondria más ampliamente estudiado. Este tipo de antioxidante hace uso del gradiente de potencial existente a través de la membrana interna de la mitocondria lo que permite su acumulación de 100 a 1000 veces en la matriz mitocondrial; y su salida se da por despolarización. Los estudios realizados por Murphy y colaboradores demuestran que MitoQ puede incrementar las defensas antioxidantes de la mitocondria in vitro. Asimismo,

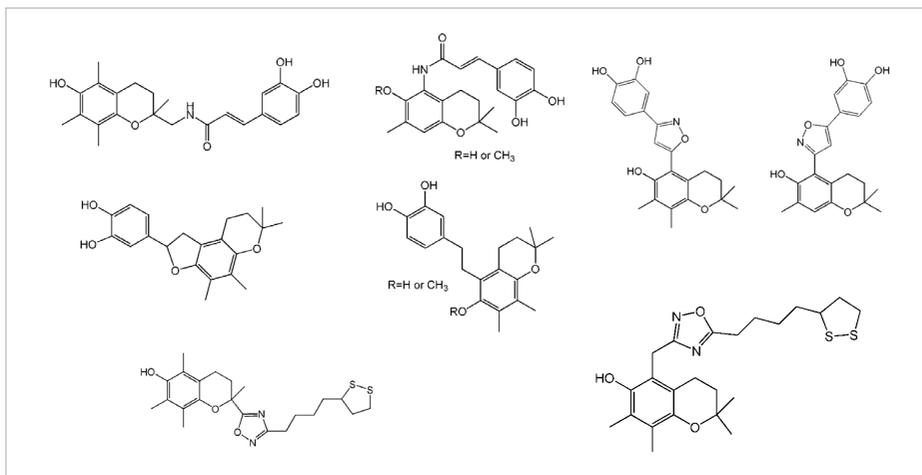
se ha demostrado que puede ser formulado para su administración oral como fármaco en animales de experimentación. Dichos experimentos demostraron que MitoQ presenta eficacia antioxidante en tejidos lo cual justifica desarrollar estudios clínicos. En este sentido, se desarrolló un ensayo clínico para ver si MitoQ puede enlentecer la progresión de EP. Sin embargo, los resultados no fueron alentadores aunque permitieron determinar que su administración en humanos es segura [128-131, 135].

Por otra parte, recientemente se ha descrito una nueva clase de pequeños péptidos antioxidantes capaces de acumularse en la mitocondria de una forma independiente del potencial. El motivo estructural de estos péptidos de Szeto-Schiller (SS) se centra en alternar residuos aromáticos y aminoácidos básicos (péptidos aromático-catiónicos) [136-138]. Estos péptidos SS son capaces de atrapar ERO y ERN protegiendo la mitocondria por reducción del estrés oxidativo y por tanto, son potenciales agentes neuroprotectores. De hecho, estudios en modelos animales de ELA y EP demostraron su eficacia en minimizar o prevenir la neurodegeneración. Los estudios pre-clínicos son promisorios y se esperan futuros ensayos clínicos en humanos [139].

14. Otras moléculas híbridas diseñadas como neuroprotectores

Recientemente, Koufaki y colaboradores desarrollaron la síntesis de nuevas moléculas híbridas diseñadas como agentes neuroprotectores: híbridos cromanol-catecol, híbridos cromanol-1,2-ditiolanos, híbridos cromanol-ácido lipoico (*Esquema 7*) [140-143].

Los compuestos desarrollados fueron capaces de proteger del daño al ADN mediado por peróxido de hidrógeno y su capacidad neuroprotectora fue estudiada usando células HT22 presencia de glutamato. En particular, aquellos derivados en los cuales la estructura cromano y catecol está conectada a través de un anillo heterocíclico de 5 miembros (*esquema 7*) resultaron más efectivos y justifica más estudios.



Esquema 7. Estructura de algunas moléculas híbridas desarrolladas por Koufaki y col.

15. Conclusiones

Existe un enorme crecimiento en la Investigación y Desarrollo (I+D) de nuevos fármacos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. En este sentido, diversos estudios sobre los mecanismos moleculares implicados en la patofisiología de estas enfermedades, están dirigidos a identificar y validar dianas terapéuticas específicas, las cuales han de ser objeto para el desarrollo de nuevos fármacos que proporcionen tratamientos más selectivos y efectivos. Debido a esto, actualmente tanto instituciones de investigación públicas o privadas como compañías farmacéuticas centran sus esfuerzos en la búsqueda de terapias neuroprotectoras ya sea mediante la quimioterapia (desarrollo de fármacos de origen sintético o natural), o bien por inmunoterapia (desarrollo de vacuna terapéutica).

Como se mencionó anteriormente, diversas especies reactivas se encuentran implicadas en procesos fisiopatológicos de numerosas enfermedades. En este sentido, el sistema nervioso central (SNC) representa un blanco particularmente susceptible al daño producido por especies reactivas. Así, el estrés oxidativo y nitro-oxidativo, entre otros, pueden ser considerados blancos terapéuticos para el tratamiento de este tipo de patología. De ahí que posibles fármacos neuroprotectores y antioxidantes con potencial capacidad de inhibir estos procesos podrán retardar el avance de los trastornos neurodegenerativos.

16. Referencias

1. Finkel, T.; Holbrook, N.J. Oxidants, Oxidative Stress and the Biology of Ageing. *Nature*. 408, 239-247, 2000.
 - <http://dx.doi.org/10.1038/35041687>
 - PMID:11089981
2. Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. *Free Radical in Biology and Medicine*. 3rd Ed. Clarendon, Oxford. 2000.
3. Betteridge, D.J. What is Oxidative Stress? *Metabolism*. 49 (Suppl 1., 3-8, 2000.
4. Harman, D. Free Radical Theory of Aging: An Update. Increasing the Functional Life Span. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1067, 10-21, 2006.
 - <http://dx.doi.org/10.1196/annals.1354.003>
 - PMID:16803965
5. Ames, B.N.; Shigenaga, M.K. Oxidants are a Major Contributor to Aging. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 663, 85-96, 1992.
 - <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.1992.tb38652.x>
 - PMID:1482105
6. Sastre, J.; Pallardo, F.V.; García de la Asunción, J.; Vina, J. Mitochondria, Oxidative Stress and Aging. *Free Radic. Res.* 2000, 32, 189-198.
 - <http://dx.doi.org/10.1080/10715760000300201>
 - PMID:10730818
7. Sastre, J.; Pallardo, F.V.; Vi-a, J. The Role of Mitochondrial Oxidative Stress in Aging. *Free Rad. Biol. Med.* 35, 1-8, 2003.
 - [http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849\(03.00184-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849(03.00184-9)
8. Holliday, R. Causes of Aging. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 854, 61-71, 1998.
 - <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb09892.x>
 - PMID:9928420
9. Harman, D. Aging: Phenomena and Theories. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 854, 1-7, 1998.
 - <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb09886.x>
 - PMID:9928414
10. Yokoyama, M. Oxidant Stress and Atherosclerosis. *Curr. Opin. Pharmacol.* 4, 110-115, 2004.
 - <http://dx.doi.org/10.1016/j.coph.2003.12.004>
 - PMID:15063353
11. Floyd, R.A.; Hensley, K. Oxidative Stress in Brain Aging Implications for Therapeutics of Neurodegenerative Diseases. *Neurobiol. Aging*. 23, 795-807, 2002.
 - [http://dx.doi.org/10.1016/S0197-4580\(02.00019-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0197-4580(02.00019-2)
12. Klaunig, J.E.; Kamendulis, L.M. The Role of Oxidative Stress in Carcinogenesis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44, 239-267, 2004.
 - <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121851>
 - PMID:14744246
13. Kowald, A.; Kirkwood, T.B. Accumulation of Defective Mitochondria through Delayed Degradation of Damaged Organelles and its Possible Role in the Ageing of Post-mitotic and Dividing Cells. *J. Theor. Biol.* 202, 145-160, 2000.
 - <http://dx.doi.org/10.1006/jtbi.1999.1046>
 - PMID:10640434
14. Lu, C.Y.; Lee, H.C.; Fahn, H.J.; Wei, Y.H. Oxidative Damage Elicited by Imbalance of Free Radical Scavenging Enzymes is Associated with Large-scale mtDNA Deletions in Aging Human Skin. *Mutat. Res.* 423, 11-21, 1999.
 - [http://dx.doi.org/10.1016/S0027-5107\(98.00220-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0027-5107(98.00220-6)
15. Avendaño, C. *Introducción a la Química Farmacéutica*. 2a Ed. McGraw-Hill. Interamericana. 2001.
16. Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. *The Definition and Measurement of Antioxidants in Biological Systems*. *Free Rad. Biol. Med.* 18, 125-126, 1995.
 - [http://dx.doi.org/10.1016/0891-5849\(95.91457-3](http://dx.doi.org/10.1016/0891-5849(95.91457-3)
17. Darley-Usmar, V.; Wiseman, H.; Halliwell, B. Nitric Oxide and Oxygen: A Question of Balance. *FEBS Lett.* 369, 131-135, 1995.
 - [http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793\(95.00764-Z](http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(95.00764-Z)
18. Hensley, K.; Robinson, K.A.; Gabbita, P.; Salsman, S.; Floyd, R.A. Reactive Oxygen Species, Cell Signaling, and Cell Injury. *Free. Rad. Biol. Med.* 28, 1456-1462, 2000.
 - [http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849\(00.00252-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849(00.00252-5)
19. Smith, M.A.; Hirai, K.; Nunomura, A.; Perry, G. Mitochondrial Abnormalities: A Primary Basis for Oxidative Damage in Alzheimer's disease. *Drug. Develop. Res.* 46, 26-33, 1999.
 - [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2299\(199901.46:1<26::AID-DDR5>3.O.CO;2-8](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1098-2299(199901.46:1<26::AID-DDR5>3.O.CO;2-8)

20. Inoue, M.; Sato, E.F.; Nishikawa, M.; Park, A.-M.; Kirai, Y.; Imada, I.; Utsumi, K. Mitochondrial Generation of Reactive Oxygen Species and its Role in Aerobic Life. *Curr. Med. Chem.* 10, 2495-2505, 2003.
• <http://dx.doi.org/10.2174/0929867033456477>
• PMID:14529465
21. Mishra, O.P.; Delivoria-Papadopoulos, M. Cellular Mechanisms of Hypoxic Injury in the Developing Brain. *Brain Res. Bull.* 48, 233-238, 1999.
• [http://dx.doi.org/10.1016/S0361-9230\(98.00170-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0361-9230(98.00170-1)
22. Taylor, J.M.; Crack, P.J. Impact of Oxidative Stress on Neuronal Survival. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 31, 397-406, 2004.
• <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1681.2004.04017.x>
• PMID:15236624
23. Ruffels, J.; Griffin, M.; Dickenson, J.M. Activation of ERK1/2, JNK and PKB by Hydrogen Peroxide in Human SH-SY5Y Neuroblastoma Cells: Role of ERK1/2 in H₂O₂-Induced Cell Death. *Eur. J. Pharmacol.* 483, 163-173, 2004.
• <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2003.10.032>
• PMID:14729104
24. Drew, B.; Leeuwenburgh, C. Aging and the Role of Reactive Nitrogen Species. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 959, 66-81, 2002.
• <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb02084.x>
• PMID:11976187
25. Vallance, P.; Leiper, J. Blocking NO Synthesis: How, Where and Why? *Nature Rev.* 1, 939-949, 2002.
• <http://dx.doi.org/10.1038/nrd960>
• PMID:12461516
26. Rosen, G.M.; Tsai, P.; Pou, S. Mechanism of Free-Radical Generation by Nitric Oxide Synthase. *Chem. Rev.* 102, 1191-1199, 2002.
• <http://dx.doi.org/10.1021/cr010187s>
• PMID:11942793
27. Radi, R. Nitric Oxide, Oxidants, and Protein Tyrosine Nitration. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 101, 4003-4008, 2004.
• <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0307446101>
• PMID:15020765 PMCID:PMC384685
28. Maxwell, A.J. Mechanisms of Dysfunction of the Nitric Oxide Pathway in Vascular Disease. *Nitric. Oxide Biol. Chem.* 6, 101-124, 2002.
• <http://dx.doi.org/10.1006/niox.2001.0394>
• PMID:11890735
29. Aslan, M.; Ozben, T. Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Alzheimer's Disease. *Curr. Alzheimer Res.* 1, 111-119, 2004.
• <http://dx.doi.org/10.2174/1567205043332162>
• PMID:15975075
30. Radi, R.; Denicola, D.; Alvarez, B.; Ferrer-Sueta, G.; Rubbo, H. The Biological Chemistry of Peroxynitrite. En Nitric Oxide. Capitulo IV. Academic Press. 2000.
PMCID:PMC1221117
31. Szabó, C.; Ischiropoulos, H.; Radi, R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat. Rev. Drugs. Discov.* 6, 662-680, 2007.
• <http://dx.doi.org/10.1038/nrd2222>
• PMID:17667957
32. Azzia, A.; Davies, K.J.A.; Kelly, F. Free Radical Biology-Terminology and Critical Thinking. *FEBS Letters.* 558, 3-6, 2004.
• [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793\(03.01526-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(03.01526-6)
33. Maritim, A.C.; Sanders, R.A.; Watkins, J.B. Diabetes, Oxidative Stress, and Antioxidants: A Review. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 17, 24-38, 2003.
• <http://dx.doi.org/10.1002/jbt.10058>
• PMID:12616644
34. Cavalli, A., Bolognesi, M. L., Minarini, A., Rosini, M., Tumiatti, V., Recanatini, M. and Melchiorre, C. Multi-target-directed ligands to combat neurodegenerative diseases. *J. Med. Chem.* 51, 347-372, 2008.
• <http://dx.doi.org/10.1021/jm7009364>
• PMID:18181565
35. Floyd, R.A. Antioxidant, Oxidative Stress, and Degenerative Neurological Disorders. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 222, 236-245, 1999.
• <http://dx.doi.org/10.1046/j.1525-1373.1999.d01-140.x>
• PMID:10601882
36. Koutsilieris, E., Schellerb, C.; Tribla, F.; Riederer, P. Degeneration of Neuronal Cells due to Oxidative Stress-microglial Contribution. *Parkin. Rel. Disor.* 8, 401-406, 2002.
• [http://dx.doi.org/10.1016/S1353-8020\(02.00021-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1353-8020(02.00021-4)
37. Perry, G.; Nunomura, A.; Hirai, K.; Zhu, X.; Pérez, M.; Avila, J.; Castellani, R.J.; Atwood, C.S.; Aliev, G.; Sayre, L.M.; Takeda, A.; Smith, M.A. Is Oxidative Damage the Fundamental Pathogenic Mechanism of Alzheimer's and Other Neurodegenerative Diseases? *Free. Rad. Biol. Med.* 33, 1475-1479, 2002.
• [http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849\(02.01113-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849(02.01113-9)

38. Alexia, T.; Borlongand, C.V.; Faull, R.L.M.; Williams, C.E.; Clark, R.G.; Gluckmana, P.D.; Hughes, P.E. Neuroprotective Strategies for Basal Ganglia Degeneration: Parkinson's and Huntington's Diseases. *Progress in Neurobiology*. 60, 409-470, 2000.
• [http://dx.doi.org/10.1016/S0301-0082\(99.00032-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0301-0082(99.00032-5)
39. Cui, K.; Luo, X.; Xu, K.; Ven Murthy, M.R. Role of Oxidative Stress in Neurodegeneration: Recent Developments in Assay Methods for Oxidative Stress and Nutraceutical Antioxidants. *Prog. Neuro-Psychopharm. Biol. Psy.* 28, 771-799, 2004.
40. Andersen, J.K. Oxidative Stress in Neurodegeneration: Cause or Consequence? *Nature Rev. Neurosc.* 5, S18-S25, 2004.
• <http://dx.doi.org/10.1038/nrn1434>
• PMID:15298006
41. Elio Scarpini, E.; Scheltens, P.; Feldman, H. Treatment of Alzheimer's Disease: Current Status and New Perspectives. *Lancet Neurol.* 2: 539-47, 2003.
• [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(03.00502-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(03.00502-7)
42. Mark P.; Mattson, M.P. Pathways Towards and Away from Alzheimer's Disease. *Nature*, 430, 631-639, 2004.
• <http://dx.doi.org/10.1038/nature02621>
• PMID:15295589 PMCID:PMC3091392
43. Citron, M. Strategies for Disease Modification in Alzheimer's Disease. *Nature Rev. Neurosc.* 5, 677-685, 2004.
• <http://dx.doi.org/10.1038/nrn1495>
• PMID:15322526
44. Binder, L.I.; Guillozet-Bongaarts, A.L.; Garcia-Sierra, F.; Berry, R.W. Tau, Tangles, and Alzheimer's Disease. *Biochim. Biophys. Acta.* 1739, 216-223, 2005.
• <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2004.08.014>
• PMID:15615640
45. Ghiso, J.; Frangione, B. Amyloidosis and Alzheimer's Disease. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 54, 1539-1551, 2002.
• [http://dx.doi.org/10.1016/S0169-409X\(02.00149-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0169-409X(02.00149-7)
46. Markesbery, W.R. Oxidative Stress Hypothesis in Alzheimer's Disease. *Free Rad. Biol. Med.* 23, 134-147, 1997.
• [http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849\(96.00629-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849(96.00629-6)
47. Behl, C. Alzheimer's Disease and Oxidative Stress: Implications for Novel Therapeutic Approaches. *Prog. Neurobiol.* 57, 301-323, 1999.
• [http://dx.doi.org/10.1016/S0301-0082\(98.00055-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0301-0082(98.00055-0)
48. Barnham, K. J.; Masters, C. L.; Bush, A. I. Neurodegenerative Diseases and Oxidative Stress. *Nature Rev. Drug Discov.* 3, 205-214, 2004.
• <http://dx.doi.org/10.1038/nrd1330>
• PMID:15031734
49. Vi-a, J.; Lloret, A.; Ort, R.; Alonso, D. Molecular Bases of the Treatment of Alzheimer's Disease with Antioxidants: Prevention of Oxidative Stress. *Mol. Aspec. Med.* 25, 117-123, 2004.
• <http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2004.02.013>
• PMID:15051321
50. Zhu, X.; Raina, A.K.; Lee, H.; Casadesus, G.; Smith, M.A.; Perry, G. Oxidative Stress Signalling in Alzheimer's Disease. *Brain. Res.* 1000, 32-39, 2004.
• <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2004.01.012>
• PMID:15053949
51. Tabner, B.J.; Turnbull, S.; El-Agnaf, O.M.A.; Allsop, D. Formation of Hydrogen Peroxide and Hydroxyl Radicals from α -Synuclein as A Possible Mechanism of Cell Death in Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease. *Free Rad. Biol. Med.* 32, 1076-1083, 2002.
• [http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849\(02.00801-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849(02.00801-8)
52. Butterfield, D.A. Amyloid β -Peptide [1-42]-Associated Free Radical-Induced Oxidative Stress And Neurodegeneration in Alzheimer's Disease Brain: Mechanisms and Consequences. *Curr. Med. Chem.* 10, 2651-2659, 2003.
• <http://dx.doi.org/10.2174/0929867033456422>
• PMID:14529455
53. Gibson, G.L.; Allsop, D.; Austen, B.M. Induction of Cellular Oxidative Stress by the β -Amyloid Peptide Involved in Alzheimer's Disease. *Prot. Pept. Lett.* 11, 257-270, 2004.
• <http://dx.doi.org/10.2174/0929866043407101>
• PMID:15182227
54. Siegel, S.J.; Bieschke, J.; Powers, E.T.; Kelly, J.W. The Oxidative Stress Metabolite 4-Hydroxynonenal Promotes Alzheimer Protofibril Formation. *Biochem.* 46, 1503-1510, 2007.
• <http://dx.doi.org/10.1021/bio618535>
• PMID:17279615 PMCID:PMC2530822
55. Uehara, T.; Nakamura, T.; Yao, D.; Shi, ZQ.; Gu, Z.; Ma, Y.; Masliah, E.; Nomura, Y.; Lipton, S.A. S-nitrosylated protein-disulphide isomerase links protein misfolding to neurodegeneration. *Nature* 441, 513-517, 2006.
• <http://dx.doi.org/10.1038/nature04782>
• PMID:16724068

56. Honjo, Y.; Ito, H.; Horibe, T.; Takahashi, R.; Kawakami, K. Protein disulfide isomerase-immunopositive inclusions in patients with Alzheimer disease. *Brain Res.* 1349, 90–96, 2010.
• <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2010.06.016>
• PMID:20550946
57. Keil, U.; Bonert, A.; Marques, CA.; Scherping, I.; Weyermann, J.; Strosznajder, JB.; Muller-Spahn, F.; Haass, C.; Czech, C.; Pradier, L.; Muller, WE.; Eckert, A. Amyloid beta-induced changes in nitric oxide production and mitochondrial activity lead to apoptosis. *J. Biol. Chem.* 279, 50310–50320, 2004.
• <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M405600200>
• PMID:15371443
58. Sparrow JR. Inducible nitric oxide synthase in the central nervous system. *J. Mol. Neurosci.* 5, 219–229, 1994-1995.
• <http://dx.doi.org/10.1007/BF02736723>
• PMID:7577365
59. Combs, CK.; Karlo, JC.; Kao, SC.; Landreth, GE. beta-Amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNF alpha-dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis. *J. Neurosci.* 21, 1179–1188, 2001.
• PMID:11160388
60. Lee, VM.; Trojanowski, JQ. Mechanisms of Parkinson's disease linked to pathological alpha-synuclein: new targets for drug discovery. *Neuron.* 52, 33-38, 2006
• <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2006.09.026>
• PMID:17015225
61. Tanner, CM. Occupational and environmental causes of parkinsonism. *Occup. Med.* 7, 503-513, 1992.
• PMID:1496432
62. Gomez-Tortosa, E.; Newell, K.; Irizarry, MC.; Albert, M.; Growdon, JH.; Hyman, BT. Clinical and quantitative pathologic correlates of dementia with Lewy bodies. *Neurology.* 53, 1284-1291, 1999.
• <http://dx.doi.org/10.1212/WNL.53.6.1284>
• PMID:10522886
63. Chung, KK.; Thomas, B.; Li, X.; Pletnikova, O.; Troncoso, JC.; Marsh, L.; Dawson, VL.; Dawson, TM. S-nitrosylation of parkin regulates ubiquitination and compromises parkin's protective function. *Science.* 304, 1328–1331, 2004.
• <http://dx.doi.org/10.1126/science.1093891>
• PMID:15105460
64. Fang, J.; Nakamura, T.; Cho, DH.; Gu, Z.; Lipton, SA. S-nitrosylation of peroxiredoxin 2 promotes oxidative stress-induced neuronal cell death in Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U SA.* 104, 18742-18747, 2007.
• <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0705904104>
• PMID:18003920 PMCID:PMC2141847
65. Tsang, AH.; Lee, YI.; Ko, HS.; Savitt, JM.; Pletnikova, O.; Troncoso, JC.; Dawson, VL.; Dawson, TM.; Chung, KK. S-nitrosylation of XIAP compromises neuronal survival in Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 106, 4900-4905, 2009.
• <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0810595106>
• PMID:19273858 PMCID:PMC2660786
66. Ferrer, I. Alpha-synucleinopathies. *Neurologia.* 16, 163-170, 2001.
• PMID:11412709
67. Uversky, VN. Neuropathology, biochemistry, and biophysics of alphasynuclein aggregation. *J. Neurochem.* 103, 17-37, 2007.
• PMID:17623039
68. Beyer, K.; Ariza, A. Protein aggregation mechanisms in synucleinopathies: commonalities and differences. *J. Neuropathol. Exp Neurol.* 66, 965-974, 2007.
• <http://dx.doi.org/10.1097/nen.0bo13e3181587d64>
• PMID:17984679
69. Weisman, D.; McKeith, I. Dementia with Lewy bodies. *Semin. Neurol.* 27, 42-47, 2007.
• <http://dx.doi.org/10.1055/s-2006-956754>
• PMID:17226740
70. Culvenor, JG.; McLean, CA.; Cutt, S.; Campbell, BC.; Maher, F.; Jakala, P.; Hartmann, T.; Beyreuther, K.; Masters, CL.; Li, QX. Non-Abeta component of Alzheimer's disease amyloid (NAC. revisited. NAC and alphasynuclein are not associated with Abeta amyloid. *Am. J. Pathol.* 155, 1173-1181, 1999.
• [http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440\(10.65220-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440(10.65220-0)
71. Ueda, K.; Fukushima, H.; Masliah, E.; Xia, Y.; Iwai, A.; Yoshimoto, M.; Otero, DA.; Kondo, J.; Ihara, Y.; Saitoh, T. Molecular cloning of Cdna encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U SA.* 90, 11282-11286, 1993.
• <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.90.23.11282>
• PMID:8248242 PMCID:PMC47966

72. Giasson, Bl.; Duda, JE.; Murray, IV.; Chen, Q.; Souza, J.M.; Hurtig, H.I.; Ischiropoulos, H.; Trojanowski, J.Q.; Lee, V. M. Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions. *Science*, 290, 985-989, 2000.
• <http://dx.doi.org/10.1126/science.290.5493.985>
• PMID:11062131
73. Souza, JM.; Giasson, Bl.; Chen, Q.; Lee, VM.; Ischiropoulos, H. Dityrosine cross-linking promotes formation of stable alpha-synuclein polymers. Implication of nitrate and oxidative stress in the pathogenesis of neurodegenerative synucleinopathies. *J. Biol. Chem.* 275, 18344-18349, 2000.
• <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M000206200>
• PMID:10747881
74. Souza, JM.; Peluffo, G.; Radi, R. Protein tyrosine nitration-functional alteration or just a biomarker? *Free. Radic. Biol. Med.* 45, 357-366, 2008.
• <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.04.010>
• PMID:18460345
75. Uversky, V. N. Neuropathology, biochemistry, and biophysics of alphasynuclein aggregation. *J. Neurochem.* 103, 17-37, 2007.
• PMID:17623039
76. Singh, N.; Pillay, V.; Choonara, YE. Advances in the treatment of Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* 81, 29-44, 2007.
• <http://dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2006.11.009>
• PMID:17258379
77. Rowland, LP.; Shneider, NA. Amyotrophic Lateral Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 344, 1688-1700, 2001.
• <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM200105313442207>
• PMID:11386269
78. Bruijn, Li.; Miller, TM.; Cleveland, DW. Unraveling the mechanisms involved motor neuron degeneration in ALS. *Annu. Rev. Neurosci.* 27, 723-749, 2004.
• <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.neuro.27.070203.144244>
• PMID:15217349
79. Mhatre, M.; Floyd, RA.; Hensley, K. Oxidative stress and neuroinflammation in Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis: common links and potential therapeutic targets. *J. Alzheimers. Dis.* 6, 147-157, 2004.
• PMID:15096698
80. Simpson, EP. (2005). Antioxidant treatment for Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol* 4, 266
• [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(05.70052-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(05.70052-1)
81. Valentine, JS.; Doucette, PA.; Potter, SZ. Copper-zinc superoxide dismutase and amyotrophic lateral sclerosis. *Annu. Rev. Biochim.* 74, 563-593, 2005.
• <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161647>
• PMID:15952898
82. Gurney, ME.; Pu, H.; Chiu, A.Y.; Dal Canto, MC.; Polchow, CY.; Alexander, DD.; Caliendo, J.; Hentati, A.; Kwon, YW.; Deng, HX.; Chen, W.; Zhai, P.; Sufit, RL.; Siddique, T. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science*. 264, 1772-1775, 1994.
• <http://dx.doi.org/10.1126/science.8209258>
• PMID:8209258
83. Reaume, AG.; Elliott, JL.; Hoffman, EK.; Kowall, NW.; Ferrante, R.J.; Siwek, DF.; Wilcox, HM.; Flood, DG.; Beal, MF. Brown, R.H. Jr.; Scott, RW.; Snider, WD. Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat. Genet.* 13, 43-47, 1996.
• <http://dx.doi.org/10.1038/ngo596-43>
• PMID:8673102
84. Beckman, JS.; Carson, M.; Smith, CD.; Koppenol, WH. ALS, SOD and peroxynitrite. *Nature*. 364, 584, 1993.
• <http://dx.doi.org/10.1038/364584a0>
• PMID:8350919
85. Vargas, MR.; Pehar, M.; Cassina, P.; Martinez-Palma, L.; Thompson, JA.; Beckman, JS.; Barbeito, L. Fibroblast growth factor-1 induces heme oxygenase-1 via nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) in spinal cord astrocytes: consequences for motor neuron survival. *J. Biol. Chem.* 280, 25571-25579, 2005.
• <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M501920200>
• PMID:15870071
86. Youdim, MB.; Buccafusco, JJ. Multi-functional Drugs for Various CNS Targets in the Treatment of Neurodegenerative Disorders. *Trends. Pharmacol. Sci.* 26, 27-35, 2005.
• <http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2004.11.007>
• PMID:15629202
87. Youdim, MB.; Buccafusco, JJ. CNS Targets for Multifunctional drugs in the treatment of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *J. Neural. Trans.* 112, 519-539, 2005.
• <http://dx.doi.org/10.1007/s00702-004-0214-z>
• PMID:15666041

88. Aslan, M.; Ozben, T. Reactive oxygen and nitrogen species in Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer. Res.* 1, 111-119, 2004.

- <http://dx.doi.org/10.2174/1567205043332162>
- PMID:15975075

89. Porcal, W.; Hernandez, P.; Gonzalez, M.; Ferreira, A.; Olea-Azar, C.; Cerecetto, H.; Castro, A. Heteroaryl-nitrones as drugs for neurodegenerative diseases: synthesis, neuroprotective properties, and free radical scavenger properties. *J. Med. Chem.* 51, 6150-6159, 2008.

- <http://dx.doi.org/10.1021/jm8006432>
- PMID:18788732