

REVISIÓN

Efecto neuroprotector de fitoquímicos en cultivo de neuronas dopaminérgicas



S. Sandoval-Avila^a, N.F. Díaz^b, U. Gómez-Pinedo^c, A.A. Canales-Aguirre^a,
Y.K. Gutiérrez-Mercado^a, E. Padilla-Camberos^a, A.L. Marquez-Aguirre^a
y N.E. Díaz-Martínez^{a,*}

^a Unidad de Biotecnología Médica y Farmacéutica, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Guadalajara, Jalisco, México

^b Departamento de Biología Celular, Instituto Nacional de Perinatología, Ciudad de México, México

^c Instituto de Neurociencias, IdISSC, Hospital Clínico San Carlos, Universidad Complutense, Madrid, España

Recibido el 22 de abril de 2016; aceptado el 25 de abril de 2016

PALABRAS CLAVE

Fitofármacos;
Neuroprotección;
Neuronas
dopaminérgicas;
Enfermedad de
Parkinson;
Estrés oxidativo;
Neurotoxicidad

Resumen

Introducción: La enfermedad de Parkinson es un trastorno neurodegenerativo progresivo caracterizado por la pérdida de neuronas dopaminérgicas de la *sustancia nigra pars compacta*, promoviendo una disminución significativa en los niveles de dopamina y en consecuencia el deterioro funcional del circuito motor.

Desarrollo: Aunque su etiología no está bien esclarecida, se han propuesto varios mecanismos patogénicos, entre ellos destaca el estrés oxidativo. La terapia actual se basa en medicamentos que reemplazan la dopamina, sin embargo, no son capaces de detener o incluso ralentizar la progresión de la enfermedad. En la actualidad están siendo investigados nuevos enfoques terapéuticos con la intención de influir en las vías que conducen a la disfunción y muerte neuronal.

Conclusiones: En los últimos años, se ha evidenciado el efecto neuroprotector de moléculas naturales debido a sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias dentro de los cuales destacan los polifenoles, los alcaloides y las saponinas. El objetivo de esta revisión es recopilar los estudios más importantes a nivel mundial que establecen las propiedades benéficas de algunos fitoquímicos utilizados en modelos *in vitro* de la enfermedad de Parkinson.

© 2016 Sociedad Española de Neurología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Autor para correspondencia.

Correos electrónicos: ediaz@ciatej.mx, ediazx@gmail.com (N.E. Díaz-Martínez).

KEYWORDS

Phytochemicals;
Neuroprotection;
Dopaminergic
neurons;
Parkinson's disease;
Oxidative stress;
Neurotoxicity

Neuroprotective effects of phytochemicals on dopaminergic neuron cultures**Abstract**

Introduction: Parkinson's disease is a progressive neurodegenerative disorder characterised by a loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta, which results in a significant decrease in dopamine levels and consequent functional motor impairment.

Development: Although its aetiology is not fully understood, several pathogenic mechanisms, including oxidative stress, have been proposed. Current therapeutic approaches are based on dopamine replacement drugs; these agents, however, are not able to stop or even slow disease progression. Novel therapeutic approaches aimed at acting on the pathways leading to neuronal dysfunction and death are under investigation.

Conclusions: In recent years, such natural molecules as polyphenols, alkaloids, and saponins have been shown to have a neuroprotective effect due to their antioxidant and anti-inflammatory properties. The aim of our review is to analyse the most relevant studies worldwide addressing the benefits of some phytochemicals used in in vitro models of Parkinson's disease.

© 2016 Sociedad Española de Neurología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción

La enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común después de la enfermedad de Alzheimer. Aproximadamente afecta al 1-2% de los adultos mayores a 60 años; actualmente se estima que 5-6 millones de personas la presentan alrededor del mundo¹⁻³. La neurodegeneración de las células dopaminérgicas de la *substantia nigra pars compacta* y la degeneración de las fibras nerviosas hacia el cuerpo estriado promueven una disminución significativa en los niveles de dopamina (DA), un neurotransmisor importante en la modulación neural; en consecuencia, provoca el deterioro funcional del circuito motor, la bradicinesia, la inestabilidad postural, la rigidez y el temblor característico de la enfermedad, así como síntomas no motores, los trastornos del sueño, la depresión y el déficit cognitivo³⁻⁷. Se han propuesto varios mecanismos patogénicos a través de los cuales las neuronas dopaminérgicas (NDA) pueden ser dañadas, tales como disfunción mitocondrial, apoptosis, acumulación de metales de transición, estrés oxidativo (EO), inflamación, agregación y mal plegamiento de proteínas. Asimismo, estudios recientes han demostrado que el EO es el mecanismo más favorecido por el aumento de las especies reactivas de oxígeno (ERO) que conducen a la célula neuronal a una muerte por apoptosis⁸⁻¹⁰.

El tratamiento farmacológico para la EP se basa en medicamentos que reemplazan la DA aliviando eficientemente los síntomas motores, el dolor y la depresión. Sin embargo, estos tratamientos solo proporcionan un control sintomático eficaz por aproximadamente 10 años; además, el uso por periodos prolongados conduce a la formación de ERO y otros metabolitos tóxicos que se forman a partir del metabolismo de la DA. Y resulta aún más importante que estos fármacos no son capaces de detener o incluso ralentizar la progresión de la enfermedad^{3,11-14}. Por lo anteriormente expuesto, el objetivo de esta revisión es recopilar los estudios más importantes a nivel mundial con evidencia neuroprotectora

de algunos fitoquímicos utilizados en modelos *in vitro* de la EP.

Moléculas naturales que ejercen neuroprotección sobre las neuronas dopaminérgicas

Alrededor del mundo existen un gran número de sustancias bioactivas contenidas en las partes aéreas o subterráneas de las plantas con actividades biológicas importantes, como antioxidante, antiinflamatorio, anticancerígeno, antimutagénico, entre otras; actualmente estos compuestos son denominados fitoquímicos. Una forma de clasificar los fitoquímicos es mediante el impacto que tienen sobre la salud humana y para ello se han clasificado en cuatro grupos: 1) terpenoides y polienos; 2) polifenoles; 3) compuestos organosulfurados, y 4) nitrogenados. Los polifenoles constituyen el grupo más abundante e incluye: flavonoides, flavonas, flavanonas, isoflavonas, antocianinas, catequinas, ácidos fenólicos, taninos, fitoestrógenos, estilbenos y curcuminoides^{15,16}.

Polifenoles

Los polifenoles son moléculas que poseen propiedades antioxidantes y antiinflamatorias capaces de barrer con los radicales libres por su capacidad de donar electrones y átomos de hidrógeno, además poseen actividad inmunomoduladora^{17,18}. Se ha reportado que tienen actividad terapéutica en enfermedades cardiovasculares, diabetes, cáncer y enfermedades neurodegenerativas¹⁹. Uno de estos compuestos es el resveratrol, presente en las uvas, el vino tinto y otros productos alimentarios²⁰. Se ha documentado que a concentraciones de 30 y 100 μM el resveratrol confiere un efecto neuroprotector sobre las NDA de

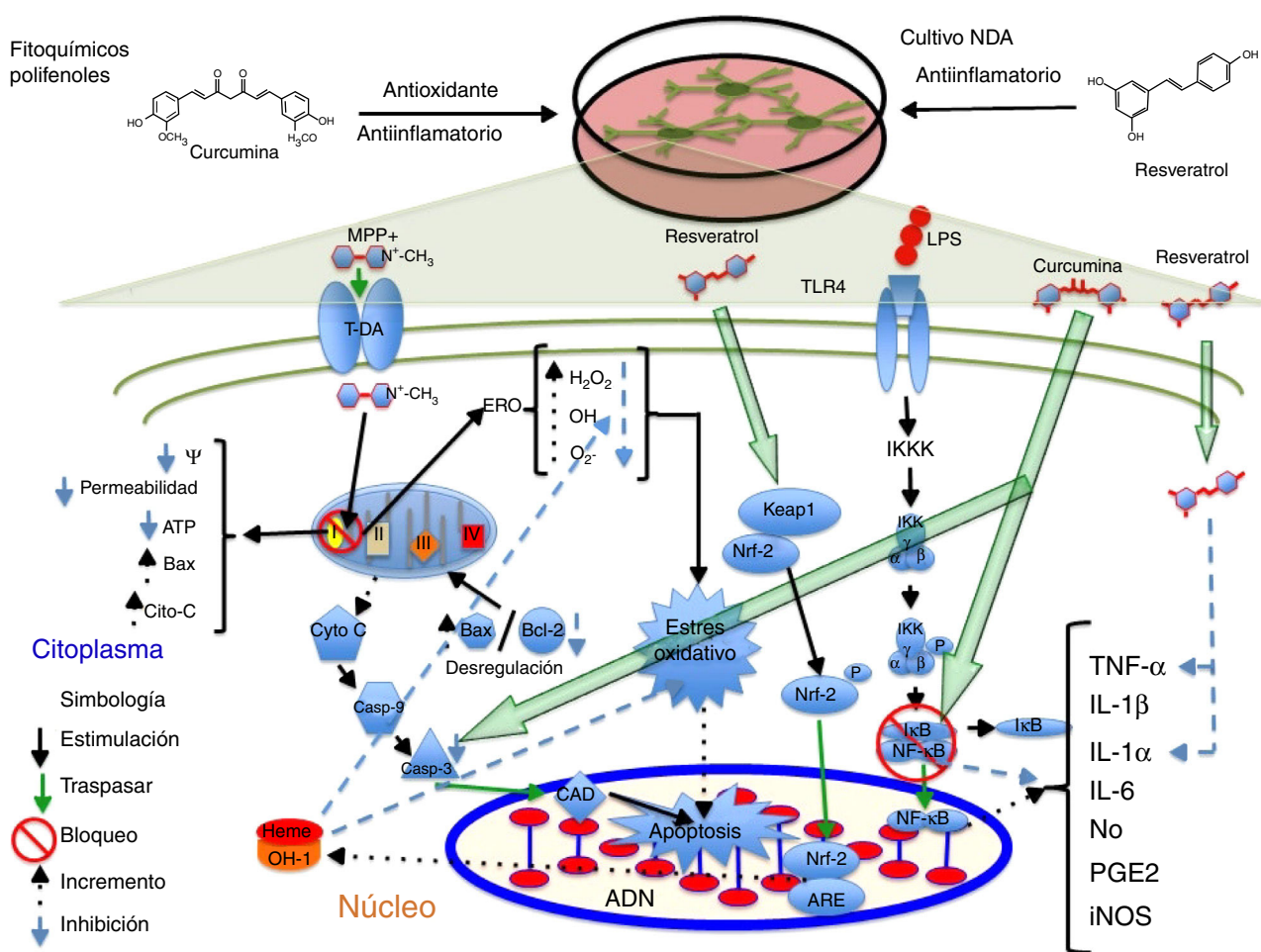


Figura 1 Propuesta del posible mecanismo de acción neuroprotector de los polifenoles. Se ilustran los fitoquímicos antiinflamatorios curcumina y resveratrol sobre los blancos moleculares que confieren neuroprotección sobre las NDA en diferentes vías de señalización que conducen a la formación de citocinas proinflamatorias y la apoptosis celular. La curcumina actúa principalmente bloqueando las proteínas NF-κB, evitando la producción de citocinas proinflamatorias, y la caspasa 3 inhibiendo el proceso apoptótico. Por otro lado, el resveratrol disminuye los niveles de las citocinas proinflamatorias TNF-α e IL-1α y provoca el incremento OH-1, este incremento protege a las células del daño oxidativo mediante la reducción de los niveles de las especies reactivas de oxígeno.

mesencéfalo al mantener los niveles de glutatión, reducir la concentración de ERO y el EO inducido por el metabolito neurotóxico 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP⁺) a 20 μM. Por otra parte, el resveratrol suprime la acetilación de la proteína p53 evitando la apoptosis inducida por el agente alquilante N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina²¹. En este mismo sentido, el equipo de Moldzio et al. en el 2013 demostraron que el resveratrol (0,01, 0,1 y 1 μM) confiere neuroprotección sobre las células mesencefálicas de ratón frente al glutamato al disminuir el número de células muertas al contrarrestar la reducción de la longitud de las neuritas y evitar la degeneración celular al reducir la formación del radical superóxido (O₂⁻) en un 68%²². Recientemente, se ha demostrado que el resveratrol (20 μM) aumenta parcialmente la expresión de la enzima hemoxygenasa-1 (OH-1) en las NDA SH-SY5Y provocando una disminución sobre la expresión de ERO y EO, y la inducción secuencial de la autofagia, evitando así la muerte celular inducida por el neurotóxico rotenona¹. Además, se ha documentado que el resveratrol incrementa la expresión de OH-1 vía Nfr-2 en un modelo de isquemia

cerebral en rata²³. Por otro lado, existe evidencia de que la administración conjunta de resveratrol y quercetina en cultivo de células PC12 diferenciadas a NDA reduce significativamente la expresión de las citocinas proinflamatorias interleucina (IL)-1 alfa (IL-1α) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) mediada por lipopolisacárido (LPS), previniendo la muerte celular de las neuronas²⁴; en la figura 1 se resume un posible mecanismo de acción. En este mismo sentido, el flavonoide quercetina con capacidad de eliminar radicales libres y actividad antiapoptótica²⁵, en conjunto con la sesamina, que posee actividad protectora frente al EO²⁶, al ser expuestos en cocultivo de células microgliales N9 y PC12 diferenciadas hacia un destino dopaminérgico en presencia del metabolito MPP⁺ provocó una reducción significativa sobre la expresión génica y la concentración de las citocinas proinflamatorias IL-6, IL-1 (IL-1β) y TNF-α, así como la disminución sobre la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la producción de O₂⁻ rescatando a las NDA de una muerte celular tipo apoptótica²⁷. Por otra parte, se ha demostrado que la sesamina confiere efecto

neuroprotector a células dopaminérgicas diferenciadas a partir de células PC12. En el estudio realizado por Lahaie-Collins et al. en 2008 se demostró que un pretratamiento de 3 h con sesamina antes de la exposición a MPP⁺ confiere efecto neuroprotector al provocar una disminución sobre los niveles de EO y la expresión génica de IL-6, así como un incremento en la actividad de la enzima catalasa y la expresión de la proteína tirosina hidroxilasa (TH)²⁶.

La curcumina, otro compuesto polifenólico obtenido de la planta *Curcuma longa*, posee propiedades antioxidantes y antiinflamatorias²⁸; esta molécula a una concentración de 5 μ M muestra un efecto neuroprotector sobre las NDA SH-SY5Y a través de la reducción de la proteína proapoptótica caspasa 3 inducida por el insecticida natural rotenona²⁹. Por otra parte, Meesaraapee et al. en 2014 evidenciaron que la curcumina, aparte de tener efecto neuroprotector y provocar una reducción significativa sobre la producción de la proteína caspasa 3 frente a la exposición del neurotóxico 6-hidroxidopamina (6-OHDA) sobre las NDA SH-SY5Y, protege contra el daño oxidativo mediante la reducción en los niveles de p-p38 y la formación de quinoproteínas tóxicas, llevando a un aumento de la viabilidad celular y restauración en los niveles de TH³⁰. Por otra parte, el equipo de Yang et al., en 2008, demostraron que la curcumina (10 μ M) tiene un efecto neuroprotector sobre las NDA mesencefálicas incrementando la captación del neurotransmisor DA, una reducción en la expresión de los niveles de las citocinas proinflamatorias óxido nítrico (NO), prostaglandina E2 (PGE₂), IL-1 β y TNF- α e inhibe la transcripción de los factores NF- κ B y AP-1 responsables del EO. Sin embargo, se observó una mayor neuroprotección en el conjunto de células con microglía, por lo que al parecer la microglía en este estudio desempeñó un papel importante contra la neurotoxicidad producida por LPS³¹. Por otro lado, se ha identificado un posible blanco molecular de la curcumina que podría estar involucrado en la neuroprotección de las células dopaminérgicas SH-SY5Y durante el proceso de citotoxicidad inducida por el neurotóxico MPP⁺ (3 mM); este posible mecanismo de acción es a través de la inhibición de la activación de la vía JNK y la escisión de la caspasa 3 que evita la muerte celular³² (fig. 1). Por su parte, el compuesto picante del jengibre el 6-shogaol, que posee efectos antiinflamatorios, al ser probado en un cultivo primario de NDA mesencefálicas de rata en presencia de MPP⁺ impidió la pérdida de células tiroxina hidroxilasa inmunorreactivas (TH-IR), así como, la disminución significativa de los niveles de NO y TNF- α ³³.

El flavonol «fustin», obtenido del duramen de *Rhus verniciflua*, posee propiedades antiinflamatorias³⁴ y antimutagénicas³⁵. En el presente estudio, el fustin en concentraciones superiores a 50 μ M confiere neuroprotección a las NDA SK-N-SH pretratadas por 30 min antes de la exposición a 6-OHDA (125 μ M) por 24 h, observándose una inhibición sobre los niveles de las ERO y el aumento de calcio intracelular (Ca²⁺). Además, impidió el incremento en la relación Bax/Bcl-2, así como la actividad de caspasa 3 y el bloqueo de la fosforilación de p38³⁶. Por otra parte, la isoflavona biocanina A, obtenida de la planta *Trifolium pratense* con propiedades antiinflamatorias, confiere neuroprotección a las NDA obtenidas de mesencéfalo de rata, a concentraciones de 0,25, 1 y 2,5 μ M, se observó que puede proteger de manera efectiva las células dopaminérgicas

contra la neurotoxicidad inducida por LPS (10 ng/ml), que produce una reducción del 36,7% sobre la captación de DA, así como una disminución del 52% sobre la población celular, mientras que la biocanina A mejora significativamente la captación de DA (el 55,9, el 77,9 y el 88,7%) y protege a las células del daño por el LPS (el 62,5, el 81,9 y el 89,4%); además, inhibe la producción de las citocinas proinflamatorias TNF- α y NO, así como el O₂⁻ de manera dependiente de la concentración³⁷. La acacetina es una flavona que posee propiedades anticancerígenas y antiinflamatorias; se encuentra en plantas como crisantemos y cártamos. En un cultivo primario de NDA mesencefálicas de rata expuestas al neurotóxico MPP⁺ (10 μ M) y tratadas con acacetina (50-200 nM) se observó un mayor número de células dopaminérgicas TH-IR y preservación de la morfología neuronal, incluyendo el acortamiento de las dendritas, en comparación con el grupo control. Además, inhibe de manera dependiente de la concentración la sobreproducción de los factores proinflamatorios NO, PGE2 y TNF- α ³⁸. La baicaleína es un flavonoide extraído de la raíz de la planta *Scutellaria baicalensis*; se lo ha considerado como un excelente antioxidante barrido de radicales libres y antiinflamatorio. Se probó la resistencia a la toxicidad *in vitro* con 6-OHDA (100 μ M) en cultivo de NDA SH-SY5Y previamente tratadas con baicaleína (0,05, 0,5 y 5 μ g/ml), comprobándose un efecto neuroprotector a partir de la dosis de 0,5 μ g/ml, con un 64% de supervivencia respecto al control. Además, el pretratamiento a 5 μ g/ml disminuye significativamente el porcentaje de células apoptóticas³⁹ (tabla 1).

Fitoquímicos nitrogenados

En este grupo de fitoquímicos destacan los alcaloides, las aminas, los aminoácidos no proteicos, los glucósidos cianogénicos y los glucosinolatos.

Alcaloides

El alcaloide tetrahidroberberina (THB), un compuesto aislado de la planta tradicional china *Rhizoma corydalis*, tiene efectos neuroprotectores mediante el bloqueo de los canales K_{ATP} neuronales^{40,41}. En el estudio realizado por Wu et al., en 2010, se demostró en NDA que el THB en presencia del neurotóxico rotenona tiene la capacidad de restaurar la hiperpolarización de membrana a condiciones fisiológicas (-46,1 mV) a través de los canales K_{ATP} despolarizando la membrana de -61,7 mV a -46,7 mV. Por otra parte, se evidenció que el THB restaura la hiperpolarización de la membrana a través del receptor D2, ya que en las células expuestas al agonista del receptor D2 (sulpirida), el THB restauró significativamente la hiperpolarización y el potencial de acción fue disparado⁴¹. Por otra parte, la berberina, un compuesto aislado de *Coptis chinensis* y usado en la medicina tradicional china como un antidiarreico, posee propiedades antiinflamatorias y antitumorales, y confiere protección cardiovascular. En el estudio realizado por Bae et al., en 2013, se demostró que la berberina tiene efectos neuroprotectores sobre las células SH-SY5Y frente a la

Tabla 1 Lista de compuestos fitoquímicos del tipo polifenoles con actividad neuroprotectora

Compuesto	Concentración	Tiempo de exposición	Modelo in vitro	Modelo de toxicidad	Efecto principal	Referencia
Resveratrol	10, 30 y 100 μM	48 h	Cortes organotípicos de mesencéfalo de rata neonata.	MPP ⁺ (20 μM)	↑ supervivencia celular ↓ ERO y EO Bloqueo de p53	Okawara et al., 2007 ²¹
Resveratrol	0,01, 0,1 y 1 μM	48 h	Cortes organotípicos de mesencéfalo de ratón	Glutamato (5 mM)	↑ supervivencia celular Preservación de longitud en neuritas ↓ O ₂ ⁻	Moldzio et al., 2013 ²²
Resveratrol	20 μM	24 h	Células SH-SY5Y	Rotenona (20 μM)	↑ OH-1 ↓ ERO, EO ↑ de la autofagia	Lin et al., 2014 ¹
Resveratrol y quercetina	0,1 μM	3 h	Cocultivo de N9 y PC12 diferenciadas a NDA	LPS (1 $\mu\text{g/ml}$)	↑ supervivencia celular ↓ IL-1 α y TNF- α	Bureau et al., 2008 ²⁴
Quercetina y sesamina	Quercetina 1pM Sesamina 0,1 μM	3 h	Células N9 mas PC12 diferenciadas a NDA	MPP ⁺ (500 μM)	↓ IL-6, IL-1 β y TNF- α Inhibición de iNOS y O ₂ ⁻	Bournival et al., 2012 ²⁷
Sesamina	1 pM	3 h	PC12 diferenciadas a NDA	MPP ⁺ (5 mM)	↓ EO ↑ catalasa ↑ p-TH ↓ IL-6	Lahaie-Collins et al., 2008 ²⁶
Curcumina	1, 5 y 10 μM	1 h	Células SH-SY5Y	Rotenona (100 μM)	↓ caspasa 3	Qualls et al., 2014 ²⁹
Curcumina	1, 5, 10 y 20 μM	0,5 h	Células SH-SY5Y	6-OHDA (25 μM)	↑ viabilidad celular ↓ quimoproteína, p38 y caspasa 3 ↑ p-HT	Meesarapie et al., 2014 ³⁰
Curcumina	10 μM	0,5, 1, 3 y 6 h	Cultivo primario de NDA de rata	LPS (5 ng/ml)	↑ captación de DA ↓ NO, TNF- α , PGE-2, IL-1 β Bloquea NF- κ B y AP-1	Yang et al., 2008 ³¹
Curcumina	1 y 5 μM	2 h	Células SH-SY5Y	MPP ⁺ (3 mM)	↑ viabilidad celular Bloquea vía JNK y caspasa 3	Yu e al., 2010 ³²
6-shogaol	0,001 y 0,01 $\mu\text{mol/l}$	1 h	Cultivo primario de NDA de rata	MPP ⁺ (3 mM)	↑ supervivencia ↓ NO y TNF- α	Park et al., 2013 ³³
Fustin	20, 50, 100, 150 y 200 μM	30 min	Células SK-N-SH	6-OHDA (125 μM)	↓ ERO y Ca ²⁺⁺ ↓ de la relación Bax/Bcl-2 ↓ Caspasa 3 y p38	Park et al., 2007 ³⁶
Biocanina A	0,25, 1 y 2,5 μM	30 min previos más 24 h	Cultivo primario de NDA de rata	LPS (10 ng/ml)	↑ captación de DA y la supervivencia celular ↓ TNF- α , NO y O ₂ ⁻	Chen et al., 2007 ³⁷
Acacetina	50 y 200 nM	1 h previa más 23 h	Cultivo primario de NDA de rata	MPP ⁺ (10 μM)	↑ viabilidad celular Conservación de morfología y neuritas ↓ NO, PGE2 y TNF- α	Kim et al., 2012 ³⁸
Baicaleína	0,05-5 gl/ml	1 h previa más 12 h	Células SH-SY5Y	6-OHDA (100 μM)	↑ supervivencia	Mu et al., 2009 ³⁹

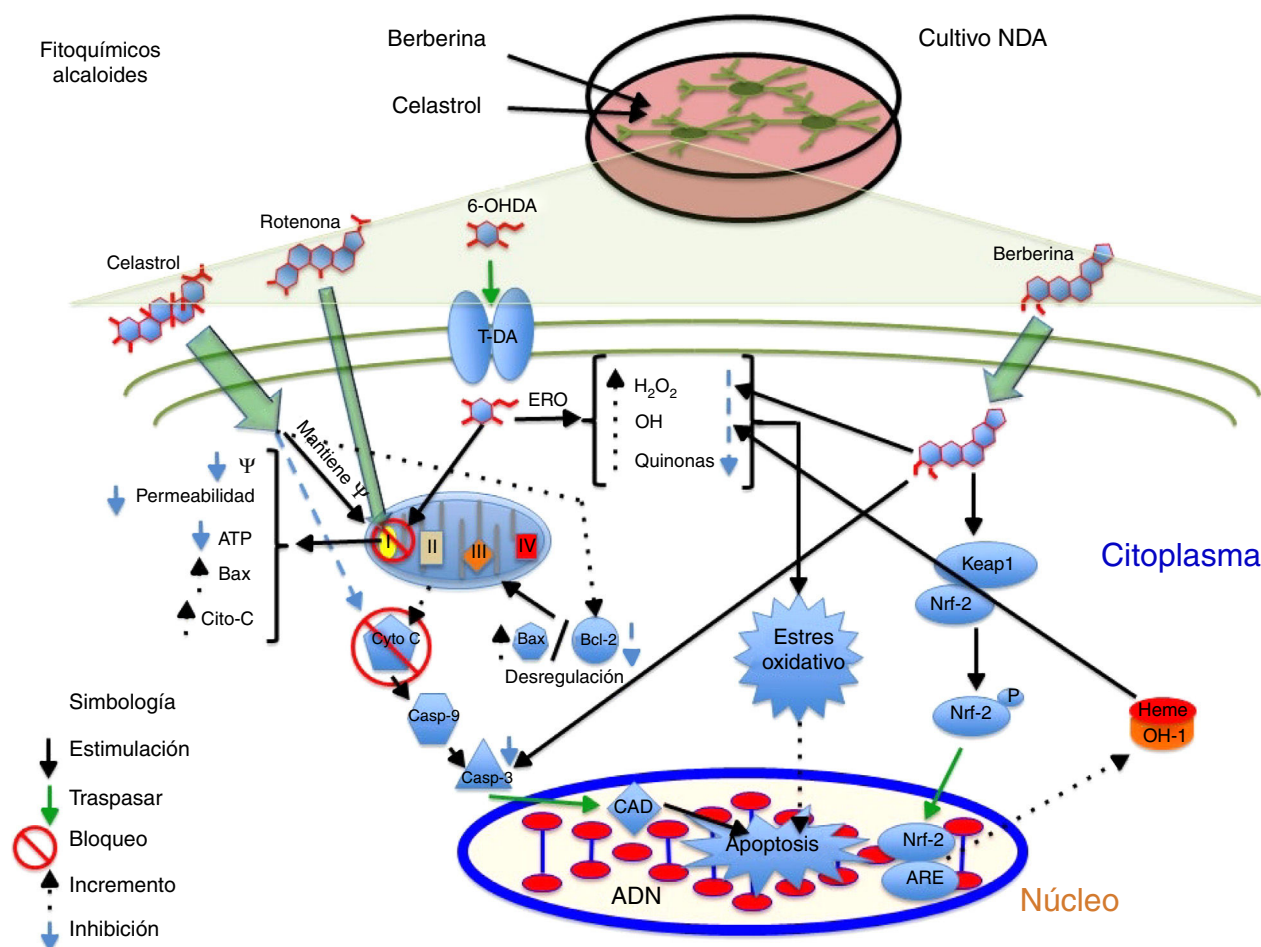


Figura 2 Efecto neuroprotector de los fitoquímicos alcaloides celastrol y berberina frente al neurotóxico rotenona. Se ilustra la inhibición del complejo I de la cadena de transporte de electrones, la disminución de producción de ATP, el incremento de ERO, la disminución de los sistemas antioxidantes endógenos y, por consiguiente, la generación de EO que contribuyen a la apoptosis. El celastrol mantiene el potencial de membrana mitocondrial, incrementa los niveles de Bcl-2 e inhibe la liberación de citocromo C al citosol, evitando la apoptosis. Por otro lado, la berberina inhibe la escisión de caspasa 3, e induce el incremento de OH-1 vía Nrf-2, evitando el daño oxidativo al disminuir las especies reactivas de oxígeno.

muerte neuronal inducida por 6-OHDA, encontrándose un incremento de la supervivencia celular de manera dependiente de concentración, una reducción de la apoptosis celular por un decremento de la actividad de caspasa 3 y una disminución de ERO después de 3 h de pretratamiento frente a 6-OHDA. Por otro lado, se identificó que la berberina aumenta la expresión del mRNA de la enzima OH-1 mediante el incremento de la translocación del factor de transcripción Nrf2⁴²; en la figura 2 se resume un posible mecanismo de acción.

El triterpenoide celastrol aislado de los extractos de raíz de *Tripterygium wilfordii* posee actividades antiinflamatorias y anticancerígenas⁴³. Se ha reportado que el celastrol (10 nM) evita la muerte celular inducida por el neurotóxico rotenona (10 μ M) a través de la reducción en los niveles de ERO, bloquea la liberación del citocromo C al citosol e inhibe la expresión de Bax. Además, confiere protección a la pérdida del potencial de membrana (Ψ), así como el aumento de la proteína antiapoptótica Bcl-2², posible mecanismo de acción (fig. 2 y tabla 2).

Saponinas

La saponina astragalósido-IV (AS-IV), un derivado de la raíz seca de *Astragalus membranaceus*, es una planta utilizada en medicina china para enfermedades neurodegenerativas; al probarse AS-IV en cultivos primarios de NDA mesencefálicas y frente a la exposición a 6-OHDA, se encontró un fuerte efecto neuroprotector, a una concentración de 100 μ M, probablemente relacionado con su efecto antioxidante, mejora en la supervivencia celular y evita la pérdida y el acortamiento de neuritas¹⁴. Por otra parte, el grupo de Zhang et al., en 2012, probó el mismo compuesto en NDA SH-SY5Y frente al neurotóxico MPP+, observando que el AS-IV posee efectivamente un efecto neuroprotector al provocar un incremento en la supervivencia de las células mediante la disminución del tamaño nuclear, la condensación de la cromatina y la fragmentación nuclear, así como una reducción sobre las ERO y la tasa de Bax/Bcl-2, e inhibe la actividad de caspasa 3⁴⁴; en la figura 3 se presenta un posible mecanismo de acción.

Tabla 2 Fitoquímicos de tipo alcaloides que muestran efecto neuroprotector en NDA

Compuesto	Concentración	Tiempo de exposición	Modelo in vitro	Modelo de toxicidad	Efecto principal	Referencia
Tetrahydro-berberina	100 μ M		Cultivo primario de NDA de rata	Rotenona (1 μ M)	THB restaura la hiperpolarización inducida por rotenona	Wu et al., 2010 ⁴¹
Berberina	1, 5 y 10 μ M	12 h	Células SH-SY5Y	6-OHDA (50 μ M)	↑ supervivencia ↓ ERO y caspasa 3 ↑ OH-1	Bae et al., 2013 ⁴²
Celastrol	1 y 10 nM	24 h	Células SH-SY5Y	Rotenona (10 μ M)	↓ muerte celular ↓ ERO, Bax, caspasa 3 y 9 Protege la pérdida del Ψ Evita la liberación de citocromo C al citosol y la activación de p38 MAPK	Choi et al., 2014 ²

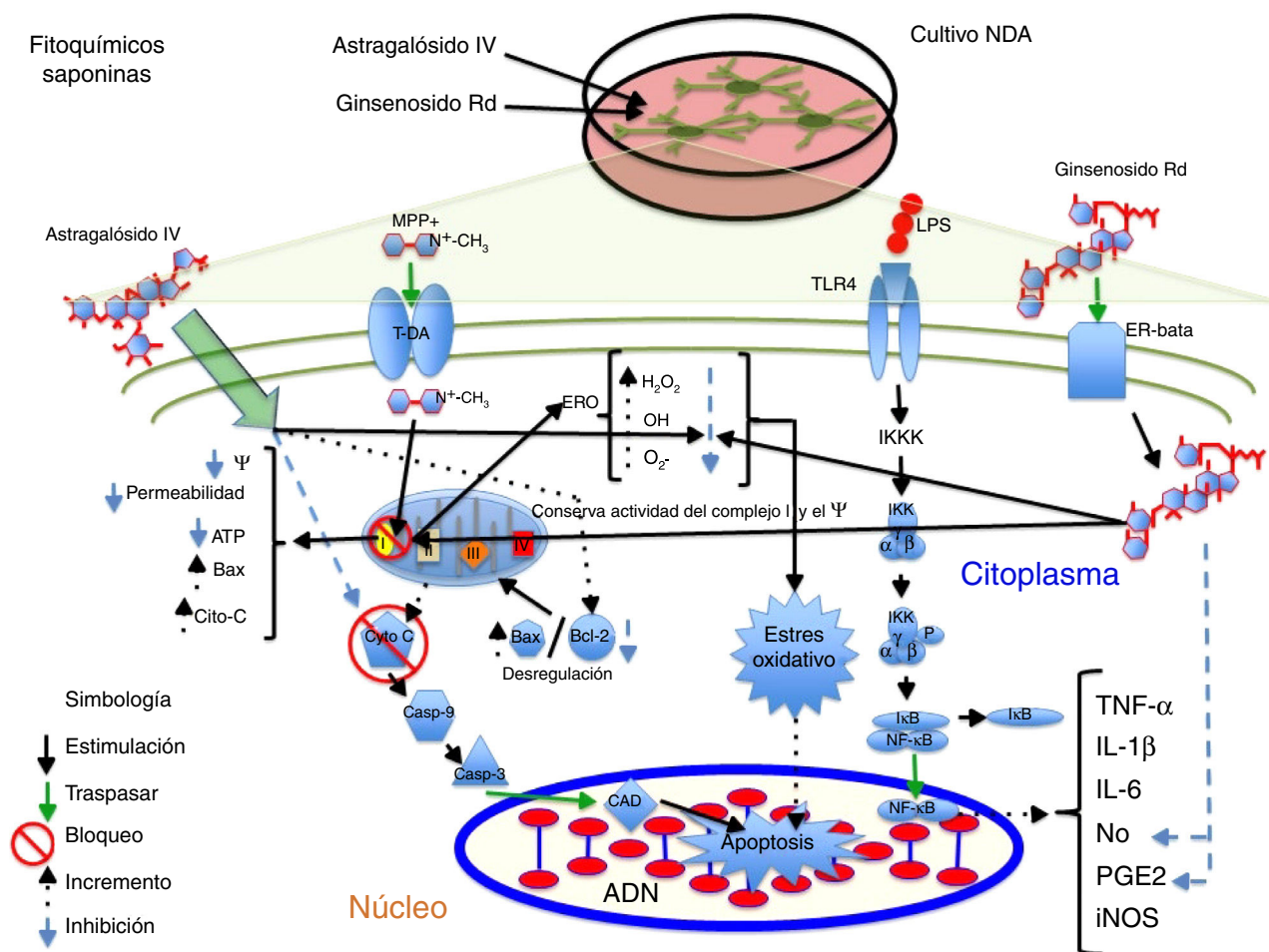


Figura 3 Neuroprotección de los fitoquímicos de tipo saponina en los modelos de daño neuronal MPP⁺ y LPS. Astragalósido IV disminuye las ERO y evita el EO, incrementa la proteína Bcl-2 e inhibe la liberación de citocromo C al citosol, evitando la muerte celular. Ginsenosido Rd conserva la actividad del complejo I y el potencial membrana mitocondrial, disminuye los niveles ERO evitando el EO y provoca decremento en los niveles de NO y PGE2, aumentando la viabilidad celular.

Tabla 3 Algunas saponinas con efecto neuroprotector en células dopaminérgicas

Compuesto	Concentración	Tiempo de exposición	Modelo in vitro	Modelo de toxicidad	Efecto principal	Referencia
AS-IV	100 μ M	24 h	Cultivo primario de NDA de rata	6-OHDA (200 μ M)	↑ viabilidad celular ↑ de neuritas	Chan et al., 2009 ¹⁴
AS-IV	25 y 50 μ M	2 h	SH-SY5Y	MPP ⁺ (3 mM)	↑ supervivencia celular ↓ ERO ↓ tasa Bax/Bcl-2 ↓ caspasa 3	Zhang et al., 2012 ⁴⁴
Ginsenósidos Rb1 y Rg1	0,1, 1, 10 y 20 μ M	4 días	Cultivo primario de NDA de rata	Glutamato (500 μ M)	↑ supervivencia ↑ longitud y número de neuritas ↓ LDH Conservación del Ψ	Radad et al., 2004 ⁴⁵
Ginsenósido Rd	50 μ M	24 h	Cultivo primario de NDA de rata	LPS (100 μ g/ml)	↑ supervivencia celular ↓ de NO y PGE2	Lin et al., 2007 ⁴⁶
Ginsenósido Rd	1 y 10 μ M	2 h	SH-SY5Y	MPP ⁺ (150 μ M)	↑ supervivencia celular ↓ LDH, ERO y Bax ↑ SOD, GPX y ATP Conservación del Ψ	Liu et al., 2015 ⁴⁷

El ginseng, obtenido de la raíz de *Panax ginseng*, contiene más de 30 ginsenósidos dentro de los cuales al Rb1, el Rg1 y el Rd se les atribuyen las actividades farmacológicas por poseer un efecto barrido de radicales libres y mejorar el metabolismo energético de las neuronas. Se ha encontrado que los ginsenósidos Rb1 y Rg1 tienen acciones neurotróficas y neuroprotectoras parciales en cultivos de NDA, al incrementar la supervivencia celular mediante la disminución de LDH y prevenir la pérdida del potencial de membrana mitocondrial. Además, promovió el aumento de la longitud y el número de neuritas en las células SH-SY5Y supervivientes a la toxicidad por glutamato⁴⁵. Por otra parte, el ginsenósido Rd (GSRd) a concentración de 50 μ M presentó un efecto neuroprotector en el daño causado por el LPS (100 μ g/ml) sobre las NDA mediante el aumento de la supervivencia celular y la reducción de la formación de NO y PGE2 mediante la acción antiinflamatoria de este compuesto⁴⁶. Recientemente, el equipo de trabajo de Liu et al. demostraron que el GSRd a concentraciones de 1 y 10 μ M confiere efecto neuroprotector frente al neurotóxico MPP⁺ en células SH-SY5Y al disminuir la muerte neuronal, mediante la disminución de los niveles de LDH, ERO y Bax, así como un incremento de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa; por otra parte, estabilizó el potencial de membrana e incrementó los niveles de ATP y, finalmente, se evidenció que la vía de supervivencia PIK3/Akt está implicada en dicho efecto protector⁴⁷; en la figura 3 se ilustra un posible mecanismo de acción (tabla 3).

Otras moléculas neuroprotectoras

La utilización de Chunghyuldan (CHD), un compuesto herbal utilizado en medicina tradicional china, ha demostrado

tener un efecto neuroprotector importante. El CHD está compuesto de rizoma de *Coptis japonica*, corteza de *Phe-llo-dendron amurense*, raíz de *Scutellaria baicalensis*, frutos de *Gardenia jasminoides* y rizoma de *Rheum palmatum*. Químicamente, esta mezcla es un compuesto de distintos flavonoides y alcaloides, como berberina, baicaleína, wogonina, genipósido y senósido A. Al realizar un ensayo en un cultivo primario de NDA de rata frente al metabolito MPP⁺, se encontró un efecto neuroprotector a dosis de 10 μ g/ml, al ser evidenciado mediante el incremento en la viabilidad celular⁴⁸. Por otra parte, los polifenoles encontrados en el té verde también confieren efectos neuroprotectores sobre las células dopaminérgicas al bloquear los transportadores de DA impidiendo de manera dependiente de la concentración la captación del neurotóxico MPP⁺ a partir de 10 μ g/ml⁴⁹. El extracto alcohólico de vanilil confiere neuroprotección a las NDA NM9D frente a la neurotoxicidad producida por el MPP⁺, observándose una disminución en el número de células apoptóticas por la supresión de los niveles de ERO y un decremento en los niveles de Bax; por otra parte, se observó un incremento en los niveles de Bcl-2; además, se demostró que el vanilil puede neuroproteger mediante la inhibición de la vía apoptótica mitocondrial⁵⁰. Por otro lado, el extracto alcohólico de *Paullinia cupana* Mart. var. *Sorbilis*, comúnmente llamado guaraná, posee propiedades antioxidantes. Dicho extracto mostró efectos neuroprotectores sobre las NDA SH-SY5Y, tales como incremento de la viabilidad celular (83% y 95%) y disminución significativa del porcentaje de condensación/fragmentación nuclear (30,88% y 36,56%) a concentraciones 0,312 mg/ml y 0,625 mg/ml, respectivamente, frente a la exposición de rotenona⁵¹. El antioxidante natural DI-3-n-butyl ftalida (NBP), desarrollado a partir del l-3-n- butil ftalida, que se extrae de las semillas de *Apium graveolens*, es un potente y novedoso eliminador

Tabla 4 Efectos neuroprotectores de fitoquímicos en células NDA

Compuesto	Concentración	Tiempo de exposición	Modelo in vitro	Modelo de toxicidad	Efecto principal	Referencia
Chunghyuldan	10 µg/ml	23 h	Cultivo primario de NDA de rata	MPP ⁺ (10 µM)	↑ viabilidad celular	Kim et al., 2010 ⁴⁸
Té verde	1, 10, 30, 100 y 200 µg/ml	1 h	Cultivo primario de NDA de rata	MPP ⁺ (50 µM)	Bloquea el transportador de DA ↓ captación de MPP ⁺	Pan et al., 2003 ⁴⁹
Vanilil	1, 10 y 100 µM	4 h	Células MN9D	MPP ⁺ (25 µM)	↑ supervivencia celular ↓ ERO ↓ Bax ↑ Bcl-2	Kim et al., 2011 ⁵⁰
Guaraná	0,312 mg/ml y 0,625 mg/ml	48 h	SH-SY5Y	Rotenona (300 nM)	↑ viabilidad celular ↓ % de fragmentación/condensación nuclear	Olivera et al., 2011 ⁵¹
DI-3-n- butil ftalida	0,1, 1, 10 y 100 µM	24 h	Células SH-SY5Y	Rotenona (200 nM)	↓ apoptosis ↓ ERO Protege la pérdida mitocondrial Ψ	Xiong et al., 2012 ⁵²
Eicosanoil-5-hidroxitriptamida	10 25 µM	6 h	Células SH-SY5Y	MPP ⁺ (3 mM)	↓ NF-κB, NO	Lee et al., 2013 ⁵⁴

de radicales libres. En este estudio se encontró que el NBP mejoró la supervivencia de las NDA SH-SY5Y frente a la toxicidad inducida por rotenona de manera dependiente de la concentración, disminuyendo la tasa de apoptosis y la producción de ERO, y evitando la pérdida del potencial de membrana mitocondrial⁵². Un miembro de la familia morácea la «mora» (*Morus alba*), con altas cantidades de antocianinas, se ha documentado que mejora los parámetros relacionados con la inflamación en ratas artríticas. El grupo de Kim et al., en 2010, demostró que el extracto alcohólico de mora protege contra la neurotoxicidad inducida por 6-OHDA en las NDA SH-SY5Y, encontrándose un efecto neuroprotector al disminuir la muerte celular inducida por el neurotóxico, e inhibe la generación de ERO y NO de manera dependiente de la concentración, así como la inhibición de la apoptosis por la disminución de la actividad de la caspasa 3 y la tasa Bax/Bcl-2. Además, evita la despolarización de la membrana mitocondrial⁵³. Uno de los componentes del café, el eicosanoil-5-hidroxitriptamida (EHT), ha demostrado tener efectos antiinflamatorios directos al reprimir la activación de NF-κB inducida por MPP⁺, la inducción de iNOS y la producción de NO, así como una fuerte actividad antioxidante; un cultivo de células SH-SY5Y expuestas a MPP⁺ resultaron protegidas al ser tratadas con EHT (10-25 µM). Los mecanismos de acción neuroprotectores se basan en la actividad tanto antiinflamatoria como antioxidante del EHT, así como su capacidad para modular la metilación de fosfoproteína fosfatasa 2A (PP2A)⁵⁴ (tabla 4).

Conclusión

Los estudios *in vitro* anteriormente mencionados demuestran que algunos fitoquímicos confieren neuroprotección en

modelos de EP al prevenir la muerte celular dopaminérgica a través de múltiples mecanismos de acción, principalmente la inhibición de NF-κB, caspasa 3, Bax y disminución ERO, así como el aumento sobre la expresión de las enzimas antioxidantes endógenas y el mantenimiento de la actividad mitocondrial. En esta revisión se compilan los resultados de potenciales candidatos naturales para el futuro tratamiento de la EP, como los polifenoles, los alcaloides, las saponinas y otros fitoquímicos. En la actualidad, no existen terapias neuroprotectoras probadas como tratamientos disponibles para la EP, por lo que quizás la combinación de varios fitoquímicos podría ofrecer nuevos enfoques terapéuticos al actuar en múltiples blancos moleculares que conducen a la degeneración de las NDA de la *sustancia nigra pars compacta*.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

Bibliografía

1. Lin TK, Chen SD, Chuang YC, Lin HY, Huang CR, Chuang JH, et al. Resveratrol partially prevents rotenone-induced neurotoxicity in dopaminergic SH-SY5Y cells through induction of heme oxygenase-1 dependent autophagy. *Int J Mol Sci*. 2014;15:1625–46. PubMed PMID: 24451142. Pubmed Central PMCID: 3907890.
2. Choi BS, Kim H, Lee HJ, Sapkota K, Park SE, Kim S, et al. Celastrol from “Thunder God Vine” protects SH-SY5Y cells through the preservation of mitochondrial function and inhibition of p38 MAPK in a rotenone model of Parkinson's disease. *Neurochem Res*. 2014;39:84–96. PubMed PMID: 24214023.

3. Hang L, Thundiyil J, Lim KL. Mitochondrial dysfunction and Parkinson disease: A Parkin-AMPK alliance in neuroprotection. *Ann N Y Acad Sci.* 2015;1350:37–47. PubMed PMID: 26121488.
4. Spittau B, Zhou X, Ming M, Kriegstein K. IL6 protects MN9D cells and midbrain dopaminergic neurons from MPP+-induced neurodegeneration. *Neuromolecular Med.* 2012;14:317–27. PubMed PMID: 22772723.
5. Monteiro-Junior RS, Cevada T, Oliveira BR, Lattari E, Portugal EM, Carvalho A, et al. We need to move more: Neurobiological hypotheses of physical exercise as a treatment for Parkinson's disease. *Med Hypotheses.* 2015. PubMed PMID: 26209418.
6. Blesa J, Trigo-Damas I, Quiroga-Varela A, Jackson-Lewis VR. Oxidative stress and Parkinson's disease. *Front Neuroanat.* 2015;9:91. PubMed PMID: 26217195. Pubmed Central PMCID: 4495335.
7. Diaz-Martinez NE, Tamariz E, Diaz NF, Garcia-Pena CM, Varela-Echavarría A, Velasco I. Recovery from experimental parkinsonism by semaphorin-guided axonal growth of grafted dopamine neurons. *Mol Ther.* 2013;21:1579–91. PubMed PMID: 23732989. Pubmed Central PMCID: 3734661.
8. Caruana M, Vassallo N. Tea Polyphenols in Parkinson's Disease. *Adv Exp Med Biol.* 2015;863:117–37. PubMed PMID: 26092629.
9. Hu X, Weng Z, Chu CT, Zhang L, Cao G, Gao Y, et al. Peroxiredoxin-2 protects against 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic neurodegeneration via attenuation of the apoptosis signal-regulating kinase (ASK1) signaling cascade. *J Neurosci.* 2011;31:247–61. PubMed PMID: 21209210. Pubmed Central PMCID: 3078571.
10. Lee JA, Son HJ, Park KD, Han SH, Shin N, Kim JH, et al. A novel compound ITC-3 activates the Nrf2 signaling and provides neuroprotection in Parkinson's disease models. *Neurotox Res.* 2015;28:332–45. PubMed PMID: 26233727.
11. Le Douaron G, Schmidt F, Amar M, Kadar H, Debortoli L, Latini A, et al. Neuroprotective effects of a brain permeant 6-aminoquinoxaline derivative in cell culture conditions that model the loss of dopaminergic neurons in Parkinson disease. *Eur J Med Chem.* 2015;89:467–79. PubMed PMID: 25462259.
12. Morales-Garcia JA, Susin C, Alonso-Gil S, Perez DI, Palomo V, Perez C, et al. Glycogen synthase kinase-3 inhibitors as potent therapeutic agents for the treatment of Parkinson disease. *ACS Chem Neurosci.* 2013;4:350–60. PubMed PMID: 23421686. Pubmed Central PMCID: 3582296.
13. Orme RP, Bhargal MS, Fricker RA. Calcitriol imparts neuroprotection in vitro to midbrain dopaminergic neurons by upregulating GDNF expression. *PloS One.* 2013;8:e62040. PubMed PMID: 23626767. Pubmed Central PMCID: 3633905.
14. Chan WS, Durairajan SS, Lu JH, Wang Y, Xie LX, Kum WF, et al. Neuroprotective effects of astragaloside IV in 6-hydroxydopamine-treated primary nigral cell culture. *Neurochem Int.* 2009;55:414–22. PubMed PMID: 19409437.
15. Quinones M, Miguel M, Aleixandre A. [The polyphenols, naturally occurring compounds with beneficial effects on cardiovascular disease]. *Nutr Hosp.* 2012;27:76–89. PubMed PMID: 22566306.
16. Alvarez-Parrilla E, Adolfo González-Aguilar G, Ayala-Zavala JF. Antioxidantes en alimentos y salud. México: AM EDITORES; 2012.
17. Batista AG, Ferrari AS, da Cunha DC, da Silva JK, Cazarin CB, Correa LC, et al. Polyphenols, antioxidants, and antimutagenic effects of *Copaifera langsdorffii* fruit. *Food Chem.* 2016;197(Pt B):1153–9. PubMed PMID: 26675852.
18. Costa G, Ferreira JP, Vitorino C, Pina ME, Sousa JJ, Figueiredo IV, et al. Polyphenols from *Cymbopogon citratus* leaves as topical anti-inflammatory agents. *J Ethnopharmacol.* 2015. PubMed PMID: 26702504.
19. Moosavi F, Hosseini R, Saso L, Firuzi O. Modulation of neurotrophic signaling pathways by polyphenols. *Drug Des Devel Ther.* 2016;10:23–42. PubMed PMID: 26730179. Pubmed Central PMCID: 4694682.
20. Arteaga O, Revuelta M, Uriguen L, Alvarez A, Montalvo H, Hilario E. Pretreatment with resveratrol prevents neuronal injury and cognitive deficits induced by perinatal hypoxia-ischemia in rats. *PloS One.* 2015;10:e0142424. PubMed PMID: 26544861. Pubmed Central PMCID: 4636303.
21. Okawara M, Katsuki H, Kurimoto E, Shibata H, Kume T, Akaike A. Resveratrol protects dopaminergic neurons in mid-brain slice culture from multiple insults. *Biochem Pharmacol.* 2007;73:550–60. PubMed PMID: 17147953.
22. Moldzio R, Radad K, Krewenka C, Kranner B, Duvigneau JC, Rausch WD. Protective effects of resveratrol on glutamate-induced damages in murine brain cultures. *J Neural Transm (Vienna).* 2013;120:1271–80. PubMed PMID: 23459926.
23. Ren J, Fan C, Chen N, Huang J, Yang Q. Resveratrol pretreatment attenuates cerebral ischemic injury by upregulating expression of transcription factor Nrf2 and HO-1 in rats. *Neurochem Res.* 2011;36:2352–62. PubMed PMID: 21850487.
24. Bureau G, Longpre F, Martinoli MG. Resveratrol and quercetin, two natural polyphenols, reduce apoptotic neuronal cell death induced by neuroinflammation. *J Neurosci Res.* 2008;86:403–10. PubMed PMID: 17929310.
25. Mercer LD, Kelly BL, Horne MK, Beart PM. Dietary polyphenols protect dopamine neurons from oxidative insults and apoptosis: Investigations in primary rat mesencephalic cultures. *Biochem Pharmacol.* 2005;69:339–45. PubMed PMID: 15627486.
26. Lahaie-Collins V, Bournival J, Plouffe M, Carange J, Martinoli MG. Sesamin modulates tyrosine hydroxylase, superoxide dismutase, catalase, inducible NO synthase and interleukin-6 expression in dopaminergic cells under MPP+-induced oxidative stress. *Oxid Med Cell Longev.* 2008;1:54–62. PubMed PMID: 19794909. Pubmed Central PMCID: 2715194.
27. Bournival J, Plouffe M, Renaud J, Provencher C, Martinoli MG. Quercetin and sesamin protect dopaminergic cells from MPP+-induced neuroinflammation in a microglial (N9)-neuronal (PC12) coculture system. *Oxid Med Cell Longev.* 2012;2012:921941. PubMed PMID: 22919443. Pubmed Central PMCID: 3418684.
28. Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin as "Curecumin": From kitchen to clinic. *Biochem Pharmacol.* 2008;75:787–809. PubMed PMID: 17900536.
29. Qualls Z, Brown D, Ramlochan Singh C, Hurley LL, Tizabi Y. Protective effects of curcumin against rotenone and salsolinol-induced toxicity: Implications for Parkinson's disease. *Neurotox Res.* 2014;25:81–9. PubMed PMID: 24122264. Pubmed Central PMCID: 3945160.
30. Meesarapee B, Thampithak A, Jaisin Y, Sanvarinda P, Suksamrarn A, Tuchinda P, et al. Curcumin I mediates neuroprotective effect through attenuation of quinoprotein formation, p-p38 MAPK expression, and caspase-3 activation in 6-hydroxydopamine treated SH-SY5Y cells. *Phytother Res.* 2014;28:611–6. PubMed PMID: 23857913.
31. Yang S, Zhang D, Yang Z, Hu X, Qian S, Liu J, et al. Curcumin protects dopaminergic neuron against LPS induced neurotoxicity in primary rat neuron/glia culture. *Neurochem Res.* 2008;33:2044–53. PubMed PMID: 18368483.
32. Yu S, Zheng W, Xin N, Chi ZH, Wang NQ, Nie YX, et al. Curcumin prevents dopaminergic neuronal death through inhibition of the c-Jun N-terminal kinase pathway. *Rejuvenation Res.* 2010;13:55–64. PubMed PMID: 20230279.
33. Park G, Kim HG, Ju MS, Ha SK, Park Y, Kim SY, et al. 6-Shogaol, an active compound of ginger, protects dopaminergic neurons in Parkinson's disease models via anti-neuroinflammation. *Acta Pharmacol Sin.* 2013;34:1131–9. PubMed PMID: 23811724. Pubmed Central PMCID: 4003157.
34. Jung CH, Kim JH, Hong MH, Seog HM, Oh SH, Lee PJ, et al. Phenolic-rich fraction from *Rhus verniciflua* Stokes (RVS) suppress inflammatory response via NF-kappaB and JNK pathway in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages. *J Ethnopharmacol.* 2007;110:490–7. PubMed PMID: 17112694.

35. Park KY, Jung GO, Lee KT, Choi J, Choi MY, Kim GT, et al. Anti-mutagenic activity of flavonoids from the heartwood of *Rhus verniciflua*. *J Ethnopharmacol.* 2004;90:73–9. PubMed PMID: 14698512.
36. Park BC, Lee YS, Park HJ, Kwak MK, Yoo BK, Kim JY, et al. Protective effects of fustin, a flavonoid from *Rhus verniciflua* Stokes, on 6-hydroxydopamine-induced neuronal cell death. *Exp Mol Med.* 2007;39:316–26. PubMed PMID: 17603285.
37. Chen HQ, Jin ZY, Li GH. Biochanin A protects dopaminergic neurons against lipopolysaccharide-induced damage through inhibition of microglia activation and proinflammatory factors generation. *Neurosci Lett.* 2007;417:112–7. PubMed PMID: 17399896.
38. Kim HG, Ju MS, Ha SK, Lee H, Lee H, Kim SY, et al. Acacetin protects dopaminergic cells against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neuroinflammation in vitro and in vivo. *Biol Pharm Bull.* 2012;35:1287–94. PubMed PMID: 22863927.
39. Mu X, He G, Cheng Y, Li X, Xu B, Du G. Baicalein exerts neuroprotective effects in 6-hydroxydopamine-induced experimental parkinsonism in vivo and in vitro. *Pharmacol Biochem Behav.* 2009;92:642–8. PubMed PMID: 19327378.
40. Zhang Y, Shi K, Wen J, Fan G, Chai Y, Hong Z. Chiral HPLC determination and stereoselective pharmacokinetics of tetrahydroberberine enantiomers in rats. *Chirality.* 2012;24:239–44. PubMed PMID: 22271601.
41. Wu C, Yang K, Liu Q, Wakui M, Jin GZ, Zhen X, et al. Tetrahydroberberine blocks ATP-sensitive potassium channels in dopamine neurons acutely-dissociated from rat substantia nigra pars compacta. *Neuropharmacology.* 2010;59(7-8):567–72. PubMed PMID: 20804776.
42. Bae J, Lee D, Kim YK, Gil M, Lee JY, Lee KJ. Berberine protects 6-hydroxydopamine-induced human dopaminergic neuronal cell death through the induction of heme oxygenase-1. *Mol Cells.* 2013;35:151–7. PubMed PMID: 23329300. Pubmed Central PMCID: 3887902.
43. Kannaiyan R, Shanmugam MK, Sethi G. Molecular targets of celastrol derived from thunder of god vine: Potential role in the treatment of inflammatory disorders and cancer. *Cancer Lett.* 2011;303:9–20. PubMed PMID: 21168266.
44. Zhang ZG, Wu L, Wang JL, Yang JD, Zhang J, Zhang J, et al. Astragaloside IV prevents MPP(+)-induced SH-SY5Y cell death via the inhibition of Bax-mediated pathways and ROS production. *Mol Cell Biochem.* 2012;364(1-2):209–16. PubMed PMID: 22278385.
45. Radad K, Gille G, Moldzio R, Saito H, Rausch WD. Ginsenosides Rb1 and Rg1 effects on mesencephalic dopaminergic cells stressed with glutamate. *Brain Res.* 2004;1021:41–53. PubMed PMID: 15328030.
46. Lin WM, Zhang YM, Moldzio R, Rausch WD. Ginsenoside Rd attenuates neuroinflammation of dopaminergic cells in culture. *J Neural Transm Suppl.* 2007;105–12. PubMed PMID: 17982883.
47. Liu Y, Zhang RY, Zhao J, Dong Z, Feng DY, Wu R, et al. Ginsenoside Rd protects SH-SY5Y cells against 1-Methyl-4-phenylpyridinium induced injury. *Int J Mol Sci.* 2015;16:14395–408. PubMed PMID: 26114390. Pubmed Central PMCID: 4519848.
48. Kim HG, Ju MS, Kim DH, Hong J, Cho SH, Cho KH, et al. Protective effects of Chunghyuldan against ROS-mediated neuronal cell death in models of Parkinson's disease. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2010;107:958–64. PubMed PMID: 20629656.
49. Pan T, Fei J, Zhou X, Jankovic J, Le W. Effects of green tea polyphenols on dopamine uptake and on MPP+ —induced dopamine neuron injury. *Life Sci.* 2003;72:1073–83. PubMed PMID: 12495785.
50. Kim IS, Choi DK, Jung HJ. Neuroprotective effects of vanillyl alcohol in *Gastrodia elata* Blume through suppression of oxidative stress and anti-apoptotic activity in toxin-induced dopaminergic MN9D cells. *Molecules.* 2011;16:5349–61. PubMed PMID: 21705974.
51. De Oliveira DM, Barreto G, Galeano P, Romero JI, Holubiec MI, Badorrey MS, et al. *Paullinia cupana* Mart. var. *Sorbilis* protects human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cell line against rotenone-induced cytotoxicity. *Hum Exp Toxicol.* 2011;30:1382–91. PubMed PMID: 21081703.
52. Xiong N, Huang J, Chen C, Zhao Y, Zhang Z, Jia M, et al. DL-3-n-butylphthalide, a natural antioxidant, protects dopamine neurons in rotenone models for Parkinson's disease. *Neurobiol Aging.* 2012;33:1777–91. PubMed PMID: 21524431.
53. Kim HG, Ju MS, Shim JS, Kim MC, Lee SH, Huh Y, et al. Mulberry fruit protects dopaminergic neurons in toxin-induced Parkinson's disease models. *Br J Nutr.* 2010;104:8–16. PubMed PMID: 20187987.
54. Lee KW, Im JY, Woo JM, Grosso H, Kim YS, Cristovao AC, et al. Neuroprotective and anti-inflammatory properties of a coffee component in the MPTP model of Parkinson's disease. *Neurotherapeutics.* 2013;10:143–53. PubMed PMID: 23296837. Pubmed Central PMCID: 3557367.