

Actividad de tipo antiparkinsoniano en ratones del inhibidor de MAO-B FCS303

María del Pilar Olaya Osorio, Mario Francisco Guerrero Pabón

RESUMEN

La enfermedad de Parkinson (EP) es el trastorno del movimiento más común. Los inhibidores de monoamino oxidasa B (IMAO-B) son una alternativa en el tratamiento de esta enfermedad. Este estudio evaluó la actividad antiparkinsoniana del compuesto cumarínico inhibidor de MAO-B, FCS303 (8-propil-6H-[1,3]dioxolo[4,5-g]cromen-6-ona) en ratones, aplicando los modelos de reserpina y de potenciación de levodopa, en los que se evaluó la actividad locomotora en campo abierto. También se corroboró la inhibición de MAO-B *in vivo* mediante el modelo de 2-feniletilamina, en el que se determinó la inducción de estereotipias. Los resultados mostraron que FCS303 ejerce incrementos significativos, en función de la dosis, en la actividad locomotora de ratones reserpinizados, efecto que se incrementa en ratones tratados concomitantemente con levodopa. Asimismo, FCS incrementa significativamente el número de estereotipias inducidas por 2-feniletilamina. Estos resultados permiten plantear que este compuesto tiene interés como fuente potencialmente terapéutica para el tratamiento de la Enfermedad de Parkinson.

Palabras Clave—Antiparkinsonianos, inhibidores de monoamino oxidasa B, 2-feniletilamina, levodopa, ratones, reserpina.

I. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Parkinson (EP) es el trastorno del movimiento más común. Se estima que más de 10 millones de personas en el mundo padecen esta enfermedad [1]. En este trastorno neurodegenerativo se presenta disminución de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra y ganglios basales [2]. Además se caracteriza por: rigidez muscular, bradicinesia (lentitud de movimiento), temblor de reposo y alteraciones en el equilibrio y la marcha [3] [4].

El tratamiento estándar continua siendo el precursor de dopamina (DA), L-DOPA, que mejora los síntomas, al menos temporalmente, mediante la compensación de la disminución de los niveles de dopamina [5] [6]. Los inhibidores de la monoamino oxidasa B son otros fármacos

empleados en la enfermedad de Parkinson, se emplean en monoterapia o como coadyuvante en el tratamiento con L-DOPA, los más usados son selegilina y rasagilina [7] [8]. El interés por los inhibidores de la monoamino oxidasa B (IMAO-B) se estimuló inicialmente por el deseo de elevar las concentraciones reducidas de dopamina característica de la EP. Por otra parte, se podría predecir que los IMAO-B pueden reducir el estrés oxidativo en las neuronas dopaminérgicas de los seres humanos mediante la reducción de la producción de H_2O_2 , por tanto, funcionarían como agentes neuroprotectores [5].

En la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas, los compuestos cumarínicos son interesantes debido a la actividad biológica que presentan. Las cumarinas son un grupo de principios activos que se encuentran en plantas medicinales [9]. La evaluación farmacológica de estos compuestos, tanto naturales como modificados, indica que presentan actividad antiinflamatoria, antitumoral, antiviral [10]; anticoagulante, antioxidante, fotosensibilizante [9], además de posibles efectos farmacológicos sobre el sistema nervioso central de tipo sedante, anticonvulsivante, ansiolítico [11], antidepresivo [12] y neuroprotector [13][14]. Vergel demostró, mediante estudios *in vitro*, que el análogo cumarínico sintético FCS303 (8-propil-6H-[1,3]dioxolo[4,5-g]cromen-6-ona) ejerce efectos selectivos sobre la isoforma monoamino oxidasa B [15].

Este trabajo presenta la evaluación de los efectos antiparkinsonianos del análogo cumarínico sintético FCS303 (8-propil-6H-[1,3]dioxolo[4,5-g]cromen-6-ona), inhibidor selectivo de MAO-B.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Animales

Ratones albinos ICR macho, con peso entre 25 y 30 g. Antes de la realización de los ensayos, los ratones se distribuyeron aleatoriamente en jaulas y se aclimataron durante 72 horas. Se mantuvieron a temperatura $22^\circ \pm 1^\circ C$, con ciclos sucesivos de 12 horas de luz y oscuridad y consumo de agua y alimento a libre demanda. Los ensayos fueron realizados siempre a las mismas horas del día con la

finalidad de evitar las posibles modificaciones debidas a los ciclos circadianos.

B. Modelo de reserpina

Este es un modelo clásico de EP, por esta razón se empleó en la evaluación del compuesto IMAO-B. Se siguió el protocolo descrito por Tadaiesky y col. [20], previa estandarización y con ligeras modificaciones. Todos los animales se inyectaron por vía intraperitoneal (i.p.) con 3 mg/kg de reserpina, 30 minutos después se administraron por vía oral (v.o.), el análogo cumarínico (50, 100 y 200 mg/kg), selegilina 10 mg/kg o vehículo (control). Se evaluó la actividad motora en campo abierto durante cinco minutos a las 24 horas después de la reserpinización.

C. Efecto de IMAO-B y L-dopa en ratones reserpinizados

Se evaluó el efecto del pretratamiento con IMAO-B y luego L-dopa, teniendo en cuenta que L-dopa se descarboxila a dopamina, esta última en presencia de inhibidores de MAO no se degrada [16]. Todos los animales se inyectaron (i.p.) con 3 mg/kg de reserpina 30 minutos antes de la administración (v.o.) del compuesto FCS303 (100 y 200 mg/kg), selegilina o vehículo. Levodopa 100 mg/kg y carbidopa 10 mg/kg se administraron i.p. 30 minutos después. Se evaluó la actividad motora en campo abierto durante 5 minutos a las 24 horas después de la reserpinización.

D. Comportamiento estereotipado inducido por 2-feniletilamina

Para verificar la inhibición de MAO-B *in vivo* se administró 2-feniletilamina (FEA), que es un sustrato específico para MAO-B [16], en animales pretratados (v.o.), 30 minutos antes con FCS303 (50, 100 y 200 mg/kg), selegilina (10 mg/kg) o vehículo y se evaluó la potenciación de efectos inducidos por ésta. Inmediatamente después de la administración (i.p.) de FEA en dosis 23 mg/kg [17] se observaron los animales cada 5 min. para detectar la presencia de comportamiento estereotipado. Las estereotipias se midieron por el método propuesto por Youdim y col. con una ligera modificación que incluye estereotipias y grados reportados por Kitanaka y col. y Dourish. Se utilizó el siguiente sistema de puntuación: **0**, comportamiento normal; **1**, olfateo continuo y levantamientos ocasionales, aumento de locomoción, acicalamiento vigoroso o caminar en círculos; **2**, olfateo continuo y levantamientos aumentados con aumento de locomoción, acicalamiento vigoroso o caminar en círculos; **3**, olfateo continuo, movimiento de la cabeza de lado a lado, movimientos clónicos de las patas (forepaw padding), levantamientos aumentados; **4**, movimiento fuerte de la cabeza de lado a lado, movimientos clónicos de las patas (forepaw padding) y locomoción aumentada [17][18][19].

E. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media \pm el error medio estándar ($x \pm e.m.s$) y se analizaron por medio de un análisis de varianza de una vía. Para determinar el o los tratamientos responsables de las diferencias significativas se aplicaron las pruebas de diferencias múltiples de Tukey o Dunnett. En los casos en los que no se presentó homogeneidad de varianzas y/o distribución normal de datos, se aplicó el análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis. Los datos se procesaron con el programa GraphPad Prism (V 5.0). Una $p < 0,05$ fue considerada estadísticamente significativa.

F. Aspectos éticos

El comité de ética de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional, en reunión realizada el 18 de octubre de 2011 (acta No. 06), evaluó y emitió concepto aprobatorio para el presente estudio.

III. RESULTADOS

A. Modelo de reserpina

El modelo de reserpina se empleó para evaluar los efectos antiparkinsonianos. El compuesto FCS303 a las 24 h presentó diferencia estadísticamente significativa frente al control a las dosis de 100 y 200 mg/kg, al igual que selegilina (fig. 1).

Curva dosis - respuesta FCS303 Modelo Reserpina (24h)

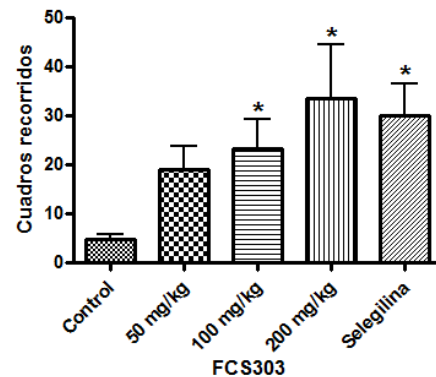


Fig. 1 Actividad motora después de la administración de FCS303 en dosis 50, 100 y 200 mg/kg, control (0 mg/kg) o patrón de referencia (10 mg/kg), evaluada en modelo de reserpina. Evaluación a las 24 h de la administración de reserpina.

B. Efecto de IMAO-B y L-dopa en ratones reserpinizados

El modelo de levodopa/carbidopa (LD/CD) se desarrolló en ratones reserpinizados, por tanto se evaluaron las dosis del compuesto FCS303 que presentaron mejor respuesta en el modelo de Parkinson de reserpina. Selegilina y el compuesto FCS303 mejoraron la respuesta de LD/CD y causaron

reversión del efecto de reserpina de forma significativa con respecto al control (fig. 2).

Efecto de LD/CD + IMAO-B en ratones reserpinizados (24h)

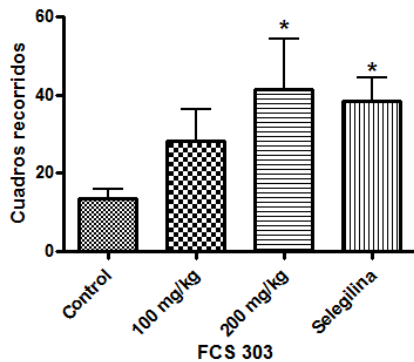


Fig. 2 Efectos de levodopa/carbidopa (LD/CD) más FCS303 en dosis 100 y 200 mg/kg, control (0 mg/kg) o patrón de referencia (10 mg/kg) en ratones pretratados con reserpina. Evaluación a las 24 h de la administración de reserpina. * Diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control ($p < 0,05$).

C. Comportamiento estereotipado

El modelo de 2-feniletilamina (FEA) se emplea para verificar posibles efectos potenciadores y la inhibición de MAO-B *in vivo*, teniendo en cuenta que es un sustrato específico de dicha enzima. Selegilina y el compuesto FCS303 en dosis de 100 y 200 mg/kg, presentaron diferencia significativa, frente al control (fig. 3).

Modelo FEA: curva dosis respuesta FCS303

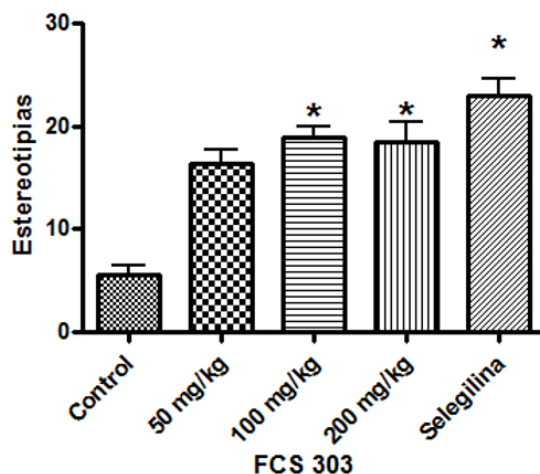


Fig. 3 Comportamiento estereotipado después de administrar FEA (23 mg/kg), en ratones pretratados 50, 100 y 200 mg/kg de FCS303, control (0 mg/kg) o patrón de referencia (10 mg/kg). * Diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control ($p < 0,05$).

IV. DISCUSIÓN

Los efectos de reserpina sobre la actividad locomotora espontánea se emplean frecuentemente como un modelo de la perturbación motora propia de la enfermedad de

Parkinson. La evaluación de varios fármacos comercializados en la actualidad, sugiere que este modelo mostró validez predictiva [20][21][22].

Reserpina bloquea el transportador vesicular de monoaminas y produce disminución profunda y duradera de catecolaminas, situación que condiciona la depleción de todas las terminaciones nerviosas dopaminérgicas incluyendo la vía nigroestriada, dando lugar a hipocinesia en los animales [23][24]. Los inhibidores de MAO evitan la degradación enzimática de dopamina a través de monoamino oxidasa, elevando las concentraciones reducidas de dopamina [5], la cual actúa sobre receptores post-sinápticos D1 y D2 que controlan el movimiento [21], lo anterior podría dar explicación a la reversión de la hipocinesia que se observó.

Reserpina promueve el catabolismo oxidativo por parte de MAO [22]. Se ha reportado que este alcaloide induce un aumento de la relación glutatión oxidado / glutatión reducido (GSSG / GSH) en el cuerpo estriado [25][26]. Esta relación se propuso como un índice sensible de estrés oxidativo [20]. En estudios posmortem de cerebros con enfermedad de Parkinson se encontraron niveles bajos de GSH, específicamente en la sustancia negra [27]. El análogo cumarinico IMAO-B, evaluado en este trabajo, disminuye el catabolismo oxidativo y podría ayudar de manera positiva en el desequilibrio GSSG / GSH producido en el modelo de reserpina y característico de la EP, teniendo en cuenta que, como se ha reportado, monoamino oxidasa B puede contribuir a la formación de niveles altos de peróxido de hidrógeno, el cual por interacción con metales, especialmente hierro, produce radicales libres [28][22].

La respuesta del compuesto FCS303, en el modelo de levodopa/carbidopa, fue ligeramente superior a los resultados obtenidos en el modelo de reserpina, siendo significativa su respuesta en la dosis de 200 mg/kg y mostrando una marcada tendencia al aumento de la locomoción en la dosis de 100 mg/kg, lo que sugiere que pudo presentarse potenciación con dosis reducidas de L-DOPA. Esto probablemente porque el compuesto IMAO-B es capaz de evitar la degradación de la dopamina derivada de L-DOPA después de la acción de la L-aminoácido aromático descarboxilasa, en el cerebro. Esta es una característica importante porque en la actualidad uno de los usos clínicos de inhibidores selectivos de MAO-B, como selegilina y rasagilina, es el de mejorar la respuesta a L-DOPA en etapas posteriores al inicio de la enfermedad [29].

En el modelo de 2-feniletilamina (FEA), tanto selegilina como FCS303 potenciaron las estereotipias características de FEA, lo que coincide con lo reportado en la literatura donde se indica que al combinar dosis bajas de FEA con inhibidores selectivos de MAO-B se produce estimulación de la respuesta, ya que, dicha amina es un sustrato específico de monoamino oxidasa B, que se metaboliza rápidamente en el cerebro, pero al inhibir la enzima que la degrada, la duración de la acción de la FEA puede extenderse [18], lo anterior

corroborar, a nivel *in vivo*, que el análogo cumarínico FCS303 es inhibidor de monoamino oxidasa B.

Por otra parte, es importante tener en cuenta que la administración de FCS303 (50, 100 y 200 mg/kg), en ratones sin reserpinizar, no modificó la actividad locomotora ni produjo estereotipias (datos no mostrados).

V. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos de los ensayos realizados se concluye que el análogo cumarínico sintético FCS303 (8-propil-6H-[1,3]dioxolo[4,5-g]cromen-6-ona), presenta interés como fuente potencialmente terapéutica para el tratamiento de la Enfermedad de Parkinson.

AGRADECIMIENTOS

Al Fondo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Colombia (VRI/DIB, proyecto: 15259). Al Bioterio del Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, UNCSB.

REFERENCIAS

- [1] R. Abdullah, I. Basak, K.S. Patil, G. Alves, J.P. Larsen, S.G. Moller. "Parkinson's disease and age: The obvious but largely unexplored link", *Exp Gerontol*, vol. 68, pp. 33-38, Agosto 2015.
- [2] T. Segura, M. Galindo, B. Rallo-Gutierrez, V. Ceña, J. Jordan, "Dianas farmacológicas en las enfermedades neurodegenerativas", *Rev Neurol.*, vol. 36, pp 1047-1057, Junio 2003.
- [3] M. Emborg, "Evaluation of animal models of Parkinson's disease for neuroprotective strategies", *J Neurosci Methods*, vol. 139, pp. 121-143, Octubre 2004.
- [4] T. Alexi, C. Borlongan, R. Faull, C. Williams, R. Clark, P. Gluckman, "Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's diseases", *Prog Neurobiol*, vol. 60, pp. 409-416, Abril 2000.
- [5] P. Foley, M. Gerlach, M. Youdim, P. Riederer, "MAO-B inhibitors: multiple roles in the therapy of neurodegenerative disorders?", *Parkinsonism Relat Disord.*, vol. 6, pp. 25-32, Enero 2000.
- [6] H. Rang, M. Dale, J. Ritter, R. Flower, *Rang and Dale's Pharmacology*. Barcelona: Elsevier, 2008, pp. 519.
- [7] S. Thobois, F. Deleamarre-Damier, P. Derkinderen, "Treatment of motor dysfunction in Parkinson's disease: an overview", *Clin Neurol Neurosurg*, vol 107, pp. 269-281, Febrero 2005.
- [8] S. García, B. López, E. Meza, J.L. Castillo, A.J: Villagómez, R. Coral-Vázquez, "Una perspectiva racional y vigente del uso de los inhibidores de la enzima monoamino-oxidasa tipo B (IMAOs-B) en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. *Med Int Mex*, vol 27, No. 2, pp. 168-178, abril 2011.
- [9] M. Carretero, "Compuestos fenólicos: Sikimatos (II)", *Panorama Actual Med.*, vol 24, pp. 432-435, Julio 2000.
- [10] S. Rehman, Z. Chohan, F. Gulnaz, C. Supuran, "In-vitro antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of some coumarins and their metal complexes", *J Enzyme Inhib Med Chem*, vol. 20, pp. 333-340, Agosto 2005.
- [11] S. Ariza S, D. Rueda, J. Rincón, E. Linares, M. Guerrero, "Efectos farmacológicos sobre el sistema nervioso central inducidos por cumarina aislada de *Hygrophila tytha* Leonard", *Vitae*, vol. 14, pp. 51-58, Diciembre 2007.
- [12] N. Vergel, J. López, F. Orallo, D. Viña, D. Buitrago, E. Olmo, J.A. Mico, M.F. Guerrero, "Antidepressant-like profile and MAO-A inhibitory activity of 4-propyl-2H-benzo[h]-chromen-2-one", *Life Sciences*, vol. 86, pp. 819-824, mayo 2010.
- [13] S. Kang, K. Lee, S. Sung, Y. Kim, "Four new neuroprotective dihydropyranocoumarins from *Angelica gigas*", *J Nat Prod*, vol. 68, pp. 56-59, Enero 2005.
- [14] F. Epifano, G. Molinaro, S. Genovese, R. Ngomba, F. Nicoletti, M. Curini, "Neuroprotective effect of prenyloxycoumarins from edible vegetables", *Neurosci Lett*, vol. 443, pp. 57-60, Octubre 2008.
- [15] N. Vergel, "Estudio de la actividad anticonvulsivante de metabolitos secundarios tipo cumarina", Tesis doctoral, Universidad de Nacional de Colombia, 2010.
- [16] H. Vogel, *Drug Discovery and evaluation*. Alemania: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2002, pp. 580.
- [17] M.B. Youdim, K.F. Tipton, "Rat striatal monoamine oxidase-B inhibition by l-deprenyl and rasagiline: its relationship to 2-phenylethylamine-induced stereotypy and Parkinson's disease", *Parkinsonism Relat Disord*, vol. 8, pp. 247-253, Marzo 2002.
- [18] J. Kitanaka, N. Kitanaka, T. Tatsuta, M. Takemura, "2-Phenylethylamine in combination with l-deprenyl lowers the striatal level of dopamine and prolongs the duration of the stereotypy in mice", *Pharmacol Biochem Behav*, vol. 82, pp. 488-94, Noviembre 2005.
- [19] C.T. Dourish, "A pharmacological analysis of the hyperactivity syndrome induce by beta-phenylethylamine in the mouse", *Br J Pharmacol*, vol. 77, pp. 129-39, Septiembre 1982.
- [20] M. T. Tadaiesky, R. Andreatini, M.A. Vital, "Different effects of 7-nitroindazole in reserpine-induced hypolocomotion in two strains of mice", *Eur J Pharmacol*, vol. 535, pp. 199-207, Marzo 2006.
- [21] A. Fisher, C.S. Biggs, O. Eradiri, M.S. Starr, "Dual effects of L-3,4-dihydroxyphenylalanine on aromatic L-amino acid decarboxylase, dopamine release and motor stimulation in the reserpine-treated rat: evidence that behavior is dopamine independent", *Neuroscience*, vol. 1, pp. 97-111. Enero 2000.
- [22] A.M. Teixeira, F. Trevizol, G. Colpo, S.C. Garcia, M. Charao, R.P. Pereira, R. Fachinetto, J.B. Rocha, M.E. Burger, "Influence of chronic exercise on reserpine-induced oxidative stress in rats: Behavioral and antioxidant evaluations", *Pharmacol Biochem Behav*, vol. 88, pp. 465-72, Febrero 2008.
- [23] I. Philippens, "Non-human primate models for Parkinson's disease", *Drug Discov Today Dis Models*, vol. 5, pp 105-111, Agosto 2008.
- [24] M.J. Matos, S. Vilar, R.M. Gonzalez-Franco, E. Uriarte, L. Santana, C. Friedman, N.P. Tatonetti, D. Viña, J.A. Fontenla, "Novel (coumarin-3-yl) carbamates as selective MAO-B inhibitors: Synthesis, in vitro and in vivo assays, theoretical evaluation of ADME properties and docking study", *Eur J Med Chem*, vol. 63, pp. 151-61, Febrero 2013.
- [25] V.C. Afílio, C.C.S. Araujo, M. Bergamo, P.V.R. Calvente, V.D. Almeida, R.A. Ribeiro, R. Frussa-Filho, "Vitamin E attenuates reserpineinduced oral dyskinesia and striatal oxidized glutathione/reduced glutathione ratio (GSSG/GSH) enhancement in rats", *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry*, vol. 27, pp. 109-114, Febrero 2003.
- [26] A. Bilska, M. Dubiel, M. Sokolowska-jezewicz, E. Lorenc-koci, L. Wlodek, "Alpha-lipoic acid differently affects the reserpine-induced oxidative stress in the striatum and prefrontal cortex of rat brain" *Neuroscience*, vol. 146, pp. 1758-1771, Junio 2007.
- [27] M. Smeyne, R.J. Smeyne, "Glutathione metabolism and Parkinson's disease", *Free Radic Biol Med*, vol. 62, pp. 13-25, Septiembre 2013.
- [28] M.B. Youdim, M. Fridkin, H. Zheng, "Bifunctional drug derivatives of MAO-B inhibitor rasagiline and iron chelator VK-28 as a more effective approach to treatment of brain ageing and ageing neurodegenerative diseases", *Mech Ageing Dev*, vol. 126, pp. 317-326, Febrero 2005.
- [29] J. Finberg, "Update on the pharmacology of selective inhibitors of MAO-A and MAO-B; focus on modulation of CNS monoamine neurotransmitter release", *Pharmacol Ther*, vol. 143, pp. 133-152, Agosto 2014.