UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Estudio de los efectos antiparkinsonianos y del perfil toxicológico de análogos cumarínicos selectivos sobre MAO-B

María del Pilar Olaya Osorio

Universidad Nacional de Colombia

Facultad Ciencias, Departamento de Farmacia

Bogotá, Colombia

2015

Estudio de los efectos antiparkinsonianos y del perfil toxicológico de análogos cumarínicos selectivos sobre MAO-B

María del Pilar Olaya Osorio

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:

Doctora en Ciencias Farmacéuticas

Director (a):

DSc Mario Francisco Guerrero Pabón

Línea de Investigación:

Farmacología experimental del sistema nervioso central

Grupo de Investigación:

Farmol

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia

Bogotá, Colombia

2015

Lo que sabemos es una gota de agua; lo que ignoramos es el océano.

Isaac Newton

Agradecimientos

A Dios por acompañarme en el camino de la vida.

A mi director de tesis, Mario Francisco Guerrero, profesor del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia, por su apoyo incondicional, sus orientaciones, paciencia y dedicación en el desarrollo de esta investigación.

A Sonia Luz Albarracin, profesora del Departamento de Nutrición y Bioquímica de la Pontificia Universidad Javeriana, por acogerme en su grupo de investigación, por su apoyo y orientación en los ensayos *in vitro* realizados en el laboratorio de Neurobioquímica de esta universidad.

A José Luis López, profesor de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Salamanca, por su orientación en la síntesis de cumarinas.

A Dolores Viña, profesora de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Santiago de Compostela, por su orientación en la realización de los estudios *in vitro*.

A Yobany Sanchez, profesor del Departamento de Patología de la Universidad Nacional, por el desarrollo de los estudios de patología y especialmente a la profesora Lucia Botero, por la interpretación de estos.

A los profesores de la Pontificia Universidad Javeriana, Alexander Rodríguez y Sonia Luz Albarracin y a la estudiante Daniela Cardozo, por el desarrollo de los estudios de acoplamiento molecular. También, al profesor del Departamento de Nutrición y Bioquímica John Sutachan, por sus consejos en los estudios *in vitro*.

A la Universidad Nacional de Colombia y al Departamento de Farmacia y sus profesores por mi formación profesional y doctoral.

A Marcela Buitrago, Juan Carlos López, Sara Giraldo, Mauricio Pérez, Daniela Andrea Contreras, Lady Mayorquin y a cada una de las personas que estuvieron presentes directa o indirectamente por su colaboración y apoyo en este proceso.

A Joao, William y Olga porque siempre me dieron una palabra de aliento para seguir adelante y culminar este proceso.

A mi familia y seres queridos por su acompañamiento y apoyo incondicional.

Resumen

La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno neurodegenerativo que se estima se ha diagnosticado a más de cuatro millones de pacientes en el mundo. Una alternativa para el tratamiento de esta enfermedad son los inhibidores de monoamino oxidasa B (IMAO-B). En este trabajo se determinaron los posibles efectos antiparkinsonianos y neuroprotectores, así como el perfil toxicológico de análogos cumarínicos inhibidores selectivos de MAO-B obtenidos por semisíntesis. Para esto, se examinó la respuesta de ratones ICR en el modelo de reserpina y los compuestos que resultaron más interesantes se evaluaron en los ensayos de L-dopa y 2-feniletilamina. También se determinó la citotoxicidad, el efecto protector frente al modelo de rotenona en células SH-SY5Y y la toxicidad oral aguda en ratones. Los resultados mostraron que los compuestos FCS303 y FCS005 causaron reversión de la hipocinesia producida en el modelo de reserpina y en el ensayo de L-dopa y potenciaron los efectos producidos por 2-feniletilamina. Además, protegieron a las células SH-SY5Y de la toxicidad causada por rotenona y no presentaron citotoxicidad ni toxicidad aguda significativa. De acuerdo con los resultados estos dos compuestos, podrían ser agentes potencialmente antiparkinsonianos porque, además de controlar síntomas, tienen propiedades neuroprotectoras y un perfil toxicológico considerado como seguro.

Palabras clave: Enfermedad de Parkinson, inhibidores de monoamino oxidasa B, cumarina, modelos animales, agentes neuroprotectores, estudios de toxicidad aguda, ratones

Abstract

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder that affects more than 4 million people worldwide. A therapeutic alternative is monoamine oxidase B (MAO-B) inhibitors. In this study, the antiparkinsonian-like and neuroprotective effects and the toxicological profile of semisynthetic coumarin analogues selective inhibitors of MAO-B were determined. For this, the response of ICR mice in the reserpine model was examined and the molecules more interesting were evaluated in the assays of L-dopa and 2-phenylethylamine. Also, the protective effects against cytotoxicity induced by rotenone in SH-SY5Y cells, as well as acute oral toxicity in mice were evaluated. The results showed that FCS005 and FCS303 compounds caused a reversal of hypokinesia produced in the reserpine model and in the L-dopa assay and potentiated the effects produced by 2-phenylethylamine. Furthermore, FCS005 and FCS303 protected SH-SY5Y cells in the rotenone model and not presented significant acute toxicity or cytotoxicity. According to the results, these two compounds could be potential antiparkinsonian agents, because they control symptoms, have neuroprotective properties and a toxicological profile considered as safe.

Keywords: Parkinson’s disease, monoamine oxidase B inhibitor, coumarin, animal model, neuroprotective agents, acute toxicity test, mice

Contenido

Pág.

Resumen ..... **VII**

Lista de figuras ..... **XII**

Lista de tablas ..... **XIV**

Introducción **1**

1. Objetivos **5**
1.1 Objetivo general 5
1.2 Objetivos específicos 5

2. Marco teórico **7**
2.1 Cumarinas 7
2.1.1 Síntesis y propiedades de compuestos cumarínicos inhibidores de MAO-B 7
2.1.2 Actividad farmacológica de cumarinas 10
2.1.3 Toxicidad de cumarinas 12
2.2 Enfermedad de Parkinson 13
2.2.1 Clínica 13
2.2.2 Etiología 14
2.2.3 Neuropatología y neuroquímica 15
2.2.4 Síntesis y metabolismo de dopamina, noradrenalina y serotonina 15
2.2.5 Monoamino oxidasa (MAO) 17
2.2.6 Neurodegeneración 18
2.2.7 Tratamiento 19
2.2.8 Inhibidores de MAO-B 19
2.2.9 Neuroprotección 21
2.3 Modelos experimentales para evaluar actividad farmacológica 22
2.3.1 Modelos *in vivo* 23
2.3.2 Modelos *in vitro* 24
2.4 Estudios de toxicidad 25
2.4.1 Fundamento 25
2.4.2 Toxicidad aguda 26
2.4.3 Aplicaciones 26
2.5 Citotoxicidad 26

3. Estudios *in vivo* **28**
3.1 Metodología 28
3.1.1 Animales 28

3.1.2 Evaluación de IMAO-B en ratones no tratados con reserpina 28
3.1.3 Modelo de antagonismo de reserpina..... 29
3.1.4 Efecto de IMAO-B y L-dopa en ratones pre-tratados con reserpina.... 30
3.1.5 Potenciación de síntomas inducidos por 2-feniletilamina..... 31
3.1.6 Análisis complementarios de los IMAO-B..... 31
3.1.7 Análisis de datos 34
3.1.8 Aspectos éticos..... 34
3.2 Resultados..... 34
3.2.1 Evaluación de IMAO-B en ratones no tratados con reserpina 35
3.2.2 Modelo de antagonismo de reserpina..... 35
3.2.3 Efecto de IMAO-B y L-dopa en ratones pre-tratados con reserpina.... 41
3.2.4 Potenciación de efectos inducidos por 2-feniletilamina (FEA) 43
3.2.5 Análisis complementarios de los compuestos IMAO-B 48
3.3 Discusión 57

4. Estudios *in vitro* 67
4.1 Metodología 67
4.1.1 Cultivo celular 67
4.1.2 Tratamientos..... 68
4.1.3 Determinación del efecto dosis respuesta de los IMAO-B sobre la viabilidad..... 68
4.1.4 Evaluación de efectos protectores en citotoxicidad inducida por rotenona 68
4.1.5 Cuantificación de la producción de anión superóxido mediante citometría de flujo 69
4.1.6 Análisis de datos 69
4.2 Resultados..... 70
4.2.1 Citotoxicidad 70
4.2.2 Evaluación de efectos protectores en sobre la citotoxicidad inducida por rotenona 73
4.2.3 Cuantificación de la producción de anión superóxido mediante citometría del flujo 78
4.3 Discusión 79

5. Estudios de toxicidad 82
5.1 Metodología 82
5.1.1 Animales 82
5.1.2 Estudio de toxicidad aguda 82
5.1.3 Análisis de datos 83
5.1.4 Aspectos éticos..... 83
5.2 Resultados..... 84
5.2.1 Examen físico 84
5.2.2 Estudio anatomopatológico 88
5.3 Discusión 91

6. Conclusiones 93

7. Recomendaciones..... 94

A. Anexo: Formato examen físico toxicidad aguda..... 95

B. Anexo: Aspectos complentarios de FBO 96

C. Anexo: Modelamiento de la estructura 3D de la enzima MAO-B de ratón 97

Bibliografía 101

Lista de figuras

Figura 1-1: Cumarina
Figura 1-2: Síntesis de Vonn Pechmann para obtención de cumarinas
Figura 1-3: Obtención de furocumarinas a partir de cumarinas 7-hidroxiladas y cloroacetona
Figura 1-4: Síntesis y metabolismo de catecolaminas
Figura 1-5: Síntesis y metabolismo de serotonina
Figura 3-1: Prueba de campo abierto
Figura 3-2: Evaluación de IMAO-B en ratones no reserpinizados
Figura 3-3: Evaluación de IMAO-B en modelo de reserpina
Figura 3-4: Efecto dosis respuesta S1 en ratones no reserpinizados
Figura 3-5: Efecto dosis respuesta FCS005 en ratones no reserpinizados
Figura 3-6: Efecto dosis respuesta FCS303 en ratones no reserpinizados
Figura 3-7: Efecto dosis respuesta S1 en modelo de reserpina
Figura 3-8: Efecto dosis respuesta FCS005 en modelo de reserpina
Figura 3-9: Efecto dosis respuesta FCS303 en modelo de reserpina
Figura 3-10: Efecto dosis respuesta LD/CD en ratones reserpinizados
Figura 3-11: Efecto de LD/CD + IMAO-B en ratones reserpinizados
Figura 3-12: Efecto de LD/CD + FCS303 en ratones reserpinizados
Figura 3-13: Potenciación del comportamiento estereotipado producido por FEA
Figura 3-14: Potenciación del comportamiento estereotipado a través del tiempo
Figura 3-15: Estereotipias más frecuentes producidas por IMAO-B + FEA
Figura 3-16: Potenciación de S1 sobre el comportamiento estereotipado producido por FEA
Figura 3-17: Potenciación de FCS005 sobre el comportamiento estereotipado producido por FEA
Figura 3-18: Potenciación de FCS303 sobre el comportamiento estereotipado producido por FEA
Figura 3-19: Comparación de las secuencias de MAO-B de ratón y humana
Figura 3-21: Interacciones entre dopamina y MAO-B humana
Figura 3-22: Interacciones entre 2-feniletilamina y MAO-B humana
Figura 3-23: Interacciones entre MAO-B humana y moléculas IMAO-B de referencia
Figura 3-24: Interacciones entre S1 y MAO-B humana
Figura 3-25: Interacciones entre FCS303 y MAO-B humana

Figura 3-26: Interacciones entre FCS005 y MAO-B humana
Figura 3-27: Interacciones entre MAO-B de ratón y los compuestos FCS005 Y FCS303 de dopamina.
Figura 4-1: Citotoxicidad de S3 en células SH-SY5Y
Figura 4-2: Citotoxicidad de S11 en células SH-SY5Y
Figura 4-3: Citotoxicidad de S1 en células SH-SY5Y
Figura 4-4: Citotoxicidad de FCS005 en células SH-SY5Y
Figura 4-5: Citotoxicidad de FCS303 en células SH-SY5Y
Figura 4-6: Citotoxicidad de rotenona sobre células SH-SY5Y
Figura 4-7: Efectos protectores de S1 en modelo de rotenona 50 µM
Figura 4-8: Efectos protectores de FCS005 en modelo de rotenona 50 µM
Figura 4-9: Efectos protectores de FCS005 en modelo de rotenona 50 µM
Figura 4-10: Comparación de los efectos protectores de IMAO-B
Figura 4-11: Células SH-SY5Y pre-tratadas con IMAO-B en modelo de rotenona
Figura 4-12: Producción radical superóxido
Figura 5-1: Variación de peso corporal de hembras
Figura 5-2: Variación de peso corporal de machos
Figura 5-3: Peso de órganos de hembras
Figura 5-4: Peso de órganos de machos
Figura 5-5: Piloerección
Figura 5-6: Disnea
Figura 5-7: Lesiones hepáticas
Figura 5-8: Lesiones histopatológicas en hígado

Lista de tablas

Tabla 1-1: Fórmula estructural y algunas propiedades de los análogos cumarínicos sintetizados
Tabla 1-2: Compuestos cumarínicos obtenidos comercialmente (catálogo Sigma-Aldrich)
Tabla 1-3: Compuestos cumarínicos inhibidores selectivos de MAO-B
Tabla 3-2: Energías de interacción de análogos cumarínicos con MAO-B humana
Tabla 3-2: Energías de interacción de análogos cumarínicos con MAO-B de ratón

Introducción

A través de los años el impacto de los trastornos neurológicos sobre la salud global ha sido subestimado, es por esto por lo que la OMS junto con organizaciones no gubernamentales desarrollaron un estudio de estos trastornos dentro de los cuales se encuentran enfermedades tales como Parkinson, Alzheimer, epilepsia, esclerosis múltiple, neuroinfecciones, entre otros. Dicho estudio reportó que la enfermedad de Parkinson es un desorden universal con una tasa de incidencia cruda de 4,5 – 19 por 100000 personas por año; mientras que la prevalencia cruda esta entre 100 y 200 por 100000 personas (WHO, 2006).

Las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por una disminución en el número de células en determinadas poblaciones neuronales; por ejemplo, en la enfermedad de Alzheimer se ha observado una depleción de neuronas colinérgicas fundamentalmente en el hipocampo y la amígdala, mientras que en la enfermedad de Parkinson son las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra y ganglios basales las afectadas (Segura *et al.*, 2003). Estos dos trastornos neurodegenerativos comparten un número de características en común: ambos tienen causas desconocidas (a excepción de las formas genéticas), son inevitablemente progresivos y tienen un periodo preclínico largo (Halperin *et al.*, 2009). Hay tres mecanismos principales de muerte neuronal que pueden actuar por separado o conjuntamente para producir neurodegeneración. Este trío letal es el compromiso metabólico, la excitotoxicidad y el estrés oxidativo (Philippens, 2008). La pérdida neuronal se refleja en la alteración de los procesos de memoria y lenguaje en Alzheimer y la modificación en el control y la coordinación del movimiento en Parkinson (Segura *et al.*, 2003).

La enfermedad de Parkinson afecta a más de cuatro millones de personas en todo el mundo (Philippens, 2008), estos pacientes deben soportar síntomas paralizantes durante muchos años, afectando gravemente su calidad de vida (Emborg, 2004). Aunque se han

propuesto muchas hipótesis con respecto a la patogénesis de esta enfermedad, la etiología específica sigue sin estar clara (Cutillas *et al.*, 2002). Los tratamientos actuales buscan mejorar los síntomas de la enfermedad, al menos temporalmente, mediante la compensación de la disminución de los niveles de dopamina. Sin embargo, este enfoque no es capaz de detener la progresión de la enfermedad (Foley *et al.*, 2000). Por tanto, los tratamientos que reducen la incidencia de esta enfermedad neurodegenerativa por protección o regeneración de neuronas dopaminérgicas pueden ser más atractivos (Barnéoud, 1996).

En el campo de los desórdenes neurológicos el desarrollo de nuevos fármacos está encaminado al hallazgo de nuevas terapias neuroprotectivas y neurorestauradoras (WHO, 2006). Las enfermedades neurodegenerativas, por su frecuencia, morbilidad y complejidad, suponen actualmente el mayor reto terapéutico de la medicina (Segura *et al.*, 2003). Se reúnen esfuerzos investigativos encaminados a desarrollar estrategias para retardar o parar la progresión de la neurodegeneración (Philippens, 2008). Una de esas estrategias se enfoca sobre la monoaminoxidasa (MAO), de la cual se conocen dos isoformas MAO-A y MAO-B. La isoforma MAO-B es una diana en la búsqueda de agentes farmacológicos para el tratamiento de la Enfermedad de Parkinson (Foley *et al.*, 2000; Santana *et al.*, 2008). La inhibición selectiva de MAO-B atenúa el estrés oxidativo, fenómeno que subyace a los procesos degenerativos en las neuronas dopaminérgicas (Palhagen *et al.*, 2006). Esto puede representar una ventaja con respecto a la terapia sintomática que proporciona levodopa, dado que pueden aportar en la reducción de la progresión de la enfermedad.

En la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas, los compuestos cumarínicos son interesantes debido a la actividad biológica que presentan. Las cumarinas son un grupo muy amplio de principios activos fenólicos que se encuentran en plantas medicinales (Carretero, 2000). Estos principios activos aislados e identificados se pueden modificar estructuralmente con el fin de encontrar nuevas alternativas farmacológicas. La evaluación de estos compuestos, tanto naturales como modificados, indica que presentan un amplio rango de acciones farmacológicas; entre ellas: antiinflamatoria, antitumoral, antiviral (Rehman *et al.*, 2005); anticoagulante, antioxidante, fotosensibilizante (Carretero, 2000), además de posibles efectos farmacológicos sobre el sistema nervioso central de tipo sedante, anticonvulsivante, ansiolítico (Ariza *et al.*, 2007), antidepresivo (Vergel *et al.*,

2010) y neuroprotector (Kang *et al.*, 2005; Epifano *et al.*, 2008). Trabajos recientes muestran que análogos cumarínicos sintéticos ejercen efectos selectivos sobre la isoforma monoaminooxidasa B (Vergel *et al.*, 2010). Los inhibidores de MAO-B han encontrado gran aplicación en la terapia de trastornos neurodegenerativos como en la enfermedad de Parkinson (Foley *et al.*, 2000)

En lo referente a la información toxicológica de cumarinas se ha reportado que algunas son tóxicas, como las aflatoxinas, que son micotoxinas que se caracterizan por ser hepatotóxicas, muchas de ellas generan metabolitos carcinogénicos (Klaassen, 2008). También se ha descrito fototoxicidad y fotomutagenicidad para las furanocumarinas (Alvarez, 1994). Se ha demostrado hepatoxicidad en ratas, especie en la cual los metabolitos de cumarina son altamente tóxicos, mientras que, en los seres humanos, el compuesto se metaboliza principalmente a metabolitos no tóxicos. Sin embargo, la toxicidad de las cumarinas en los humanos no se puede subestimar (Kienhuis *et al.*, 2009). Los datos clínicos sobre hepatotoxicidad de pacientes tratados con cumarinas revelan que un subgrupo de la población es más susceptible para los efectos hepatotóxicos que las especies animales investigadas (Abraham *et al.*, 2010).

Por las razones descritas anteriormente, en este trabajo se evaluaron los efectos antiparkinsonianos y el perfil toxicológico de los análogos cumarínicos: 3-metil-7H-furo[3,2-g]cromen-7-ona (FCS005), 8-propil-6H-[1,3]dioxolo[4,5-g]cromen-6-ona (FCS303), 7-metoxicumarina (S_3), 6-metilcumarina (S_{11}) y de la cumarina (S_1), los cuales en trabajos previos presentaron actividad selectiva sobre MAO-B. Para esto, mediante los modelos *in vivo* de reserpina, L-dopa y 2-feniletilamina se evaluaron efectos antiparkisonianos, de potenciación y de inhibición de MAO-B *in vivo* en ratones. La determinación de efectos protectores se evaluó en el modelo de rotenona en células SH-SY5Y, previa evaluación de la citotoxicidad de los compuestos en dichas células. Finalmente, se evaluó la toxicidad aguda en ratones de los compuestos más interesantes a nivel farmacológico.

Este estudio pretende contribuir en la investigación de posibles fuentes farmacológicas para la enfermedad de Parkinson, trastorno que presenta alto impacto en salud pública, mediante la búsqueda de agentes inhibidores de MAO-B, obtenidos a partir de semisíntesis de compuestos cumarínicos, que tengan interés como alternativa terapéutica y aportar información sobre el perfil toxicológico de los mismos.

1. Objetivos

1.1 Objetivo general

Determinar los efectos antiparkinsonianos y el perfil toxicológico de análogos cumarínicos selectivos sobre MAO-B.

1.2 Objetivos específicos

Determinar análogos cumarínicos inhibidores selectivos sobre MAO-B con posibles efectos antiparkinsonianos en modelos experimentales en roedores.

Determinar posibles efectos protectores de análogos cumarínicos inhibidores selectivos de MAO-B con efectos antiparkinsonianos, en modelo *in vitro* de rotenona.

Evaluar la citotoxicidad en cultivo de neuronas de análogos cumarínicos inhibidores selectivos sobre MAO-B con efectos antiparkinsonianos.

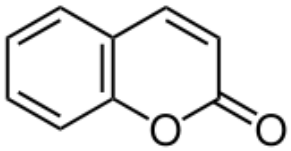
Evaluar la toxicidad oral aguda, en roedores, de análogos cumarínicos inhibidores selectivos sobre MAO-B con efectos antiparkinsonianos.

2. Marco teórico

2.1 Cumarinas

Las cumarinas son un grupo muy amplio de principios activos fenólicos que se encuentran en plantas medicinales y tienen en común una estructura química de 2H-1-benzopiran-2-ona, denominada cumarina. Sobre esta estructura, que se origina biosintéticamente por lactonización del ácido cumarínico (2-hidroxi-Z-cinámico), se disponen sustituyentes de distinta naturaleza química lo que da lugar a distintos tipos de cumarinas: sencillas y complejas. El núcleo básico de las cumarinas se observa en la Figura 2-1, casi todas las cumarinas poseen en la posición 7 un sustituyente hidroxílico que puede estar combinado con cadenas hidrocarbonadas, azúcares etc. (Carretero, 2000).

Figura 2-1: Cumarina



Fuente: Vergel, 2010

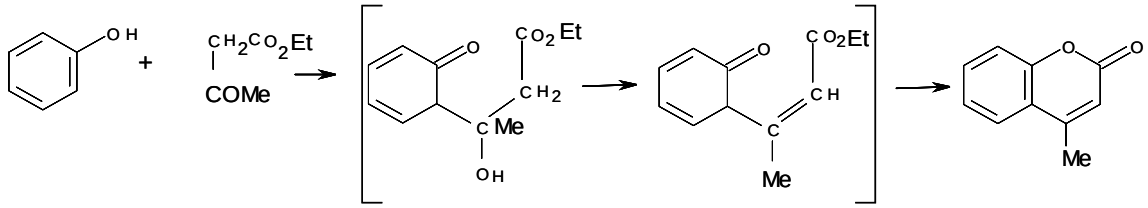
Las cumarinas más complejas poseen gran variabilidad de grupos radicales que pueden estar situados en los carbonos 6 y 8.

2.1.1 Síntesis y propiedades de compuestos cumarínicos inhibidores de MAO-B

Las cumarinas pueden ser obtenidas a través de diferentes rutas experimentales incluyendo las síntesis de von Pechman, Perkin, Knoevenagel, Reformatsky y Witting (Subhas-Bose *et al*., 2002). El compuesto 8-propil-6H-[1,3]dioxolo[4,5-g]cromen-6-ona se obtuvio mediante la síntesis de Von Pechmann (Figura 2-2), que consiste en la sustitución electrofílica de la β-ceto ésteres en anillos bencénicos activados (fenoles). Un éster

cumarínico puede ser intermediario en la mencionada síntesis, los mejores resultados se observan mientras el fenol posea grupos netamente activantes:

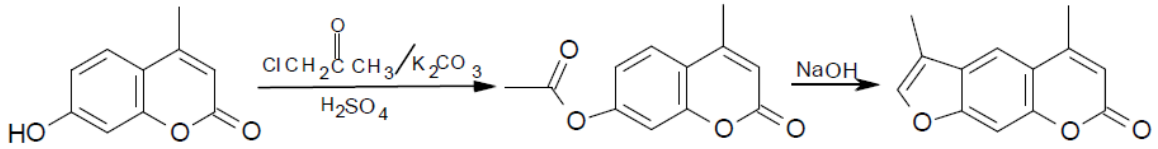
Figura 2-2: Síntesis de Vonn Pechmann para obtención de cumarinas



Fuente: Vergel, 2010

El compuesto 3-metil-7H-furo[3,2-g]cromen-7-ona se obtuvo a partir de cumarinas 7-hidroxiladas, de acuerdo con la metodología descrita por técnica de Garazd y Garazd en 2002, que se esquematiza en la Figura 2-3

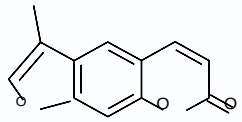
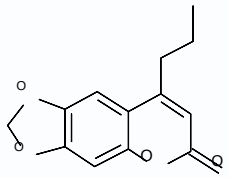
Figura 2-3: Obtención de furocumarinas a partir de cumarinas 7-hidroxiladas y cloroacetona



Fuente: Vergel, 2010

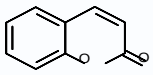
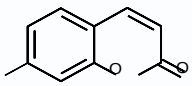
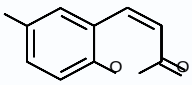
Las características de los análogos cumarínicos inhibidores selectivos sobre monoamina oxidasa B, que se estudiaran en este trabajo se presentan en las tablas 2-1 y 2-2.

Tabla 2-1: Fórmula estructural y algunas propiedades de los análogos cumarínicos sintetizados

Compuesto	Estructura/Nomenclatura	Peso Molecular (g/mol)	Punto de Fusión (ºC)	Rendimiento (%)
FCS005	 3-metil-7*H*-furo[3,2-*g*]cromen-7-ona	200	210-212	40
FCS303	 8-propil-6*H*-[1,3]dioxolo[4,5-*g*]cromen-6-ona	232	147-149	53

Fuente: Vergel, 2010

Tabla 2-2: Compuestos cumarínicos obtenidos comercialmente (catálogo Sigma-Aldrich)

Compuesto	Estructura	Nomenclatura	Peso Molecular (g/mol)
S_1		Cumarina Cromen-2-ona 1,2-Benzopirona, 1-Benzopiran-2-one	146.14
S_3	MeO 	7-metoxicumarina 7-metoxicromen-2-ona	176.04
S_{11}	H_3C 	6-metilcumarina 6-metilcromen-2-ona	160.19

Fuente: Vergel, 2010

Vergel y col. reportaron los valores de IC_{50} y de índices de selectividad relativa [IC_{50} (MAO-A)] / [IC_{50} (MAO-B)] de cumarina y análogos cumarínicos, sobre la actividad enzimática de isoformas de MAO humana recombinante expresada en células BTI infectadas con baculovirus (Vergel *et al*., 2010a; Vergel *et al*., 2010b). En la tabla 2-3, se muestran los compuestos que presentaron inhibición selectiva sobre MAO-B y que se evaluaran en este estudio.

Tabla 2-3: Compuestos cumarínicos inhibidores selectivos de MAO-B

Sustancia		MAO-A (IC_{50})	MAO-B (IC_{50})	Índice de Selectividad
Patrones	Clorgilina	4,46 ± 0,32 nM	61,35 ± 1,13 µM	0,000073
	Selegilina (R-(-)-deprenil)	67,25 ± 1,02 µM	19,60 ± 0,86 nM	3431
	Iproniazida	6,56 ± 0,76 µM	7,54 ± 0,36 µM	0,87
	Moclobemida	361,38 ± 19,37µM	*	< 0,36[d]
S_1	Cumarina	**	45,03 ± 3,02 µM	> 2,2[c]
S_3	7-Metoxicumarina	**	23,49 ± 1,57 µM	> 4,3[c]
S_{11}	6-Metilcumarina	**	32,30 ± 2,16 µM	>3,1[c]
FCS005	3-metil-7*H*-furo[3,2-*g*]cromen-7-ona	**	41,63 ± 2,79 µM	> 2,4[c]
FCS303	8-propil-6*H*-[1,3]dioxolo[4,5-*g*]cromen-6-ona	**	5,46 ±0,36 µM	>18[c]

* Inactivo a 1 mM (mayor concentración ensayada); ** Inactivo a 100 µM (mayor concentración ensayada), a concentraciones más altas los compuestos se precipitan; [c]Valores obtenidos asumiendo que IC_{50} contra MAO-A es la mayor concentración ensayada (100 µM); [c]Valor obtenido asumiendo que IC_{50} contra MAO-B es la mayor concentración ensayada (100 µM).

2.1.2 Actividad farmacológica de cumarinas

El interés farmacológico de las cumarinas se ha centrado principalmente en sus efectos sobre el sistema vascular tanto arterial como venoso y su utilidad en el tratamiento de algunas alteraciones de la piel como por ejemplo la psoriasis debido a sus propiedades fotosensibilizantes (Carretero, 2000).

Estudios recientes atribuyen a las cumarinas propiedades antinociceptivas (Meotti *et al*., 2006). También se ha observado que derivados de las cumarinas presentan actividad antitumoral, anti-inflamatoria y antiviral (Rehman *et al*., 2005).

No obstante, amplias investigaciones sustentan la actividad de las cumarinas sobre el Sistema Nervioso Central. Un estudio en el cual se evaluó la cumarina (1,2-benzopirona),

obtenida de la especie *Hygrophila tyttha* Leonard, indicó que esta molécula es responsable, cuando menos en parte, de los efectos de tipo ansiolítico, anticonvulsivante y sedante descritos para esta especie (Ariza *et al*., 2007).

Otro estudio en el cual se evaluó el efecto de cumarinas sobre los niveles de ácido gamma-aminobutirico (GABA), glutamato, glicina y taurina en el cortex prefrontal y el hipocampo de ratones, indicó que las cumarinas estimulan la liberación endógena aumentando los niveles de aminoácidos inhibitorios y excitatorios en el cortex prefrontal y disminuyen los niveles de glutamato en el hipocampo. Esto hallazgos son interesantes considerando que algunas enfermedades neurodegenerativas y convulsiones esta relacionadas con el desbalance en los niveles de aminoácidos el sistema nervioso central (Pereira *et al*., 2009).

Estudios realizados con compuestos derivados de cumarinas han demostrado que estos actúan como inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa, por esta razón se utilizan en investigaciones relacionadas con la enfermedad de Alzheimer y otros desórdenes cognitivos (Howes *et al*., 2003).

Se ha evidenciado también en investigaciones recientes, que derivados de cumarinas presentan una buena actividad neuroprotectora (Kang *et al*., 2005). Un estudio reportó que las preniloxicumarinas de vegetales comestibles, en concentraciones de 1 a 10 M, ejercieron una buena protección contra la neurotoxicidad inducida por NMDA, en un cultivo de neuronas (Epifano *et al*., 2008). Se han demostrado los potenciales efectos neuroprotectores de cumarinas, como fraxetina (100µM), en modelos de rotenona desarrollados en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. (Molina Jimenez *et al*., 2003; Molina Jimenez *et al.,* 2004). Fraxetina en concentraciones entre 10–100 µM inhibió la formación de especies reactivas de oxígeno, liberación de citocromo C, activación de caspasas 3 y 9 y suprimió la sobrerregulación de Bax (Sanchez Reus *et al*., 2005) Se evaluó el efecto neuroprotector de osthole sobre la citotoxicidad inducina por MPP+ en células PC12 y de acuerdo con los resultados se concluyó que esta cumarina puede ser un agente neuroprotector promisorio (Liu *et al*., 2010)

De igual forma se ha observado que cumarinas aisladas de raíz de *Psoralea corylifolia* han presentado resultados positivos en el modelo de la natación forzada, sugiriendo una posible actividad antidepresiva, que puede estar mediada por inhibición de la MAO y por

acción sobre el eje hipotalámico-hipofisiario-adrenal (Chen *et al*., 2005). Los resultados de la evaluación del perfil farmacológico sobre el SNC del derivado de cumarina 4-propil-2H-benzo[h]-cromen-2-ona sugirieron que este compuesto puede ejercer efectos antidepresivos relacionados con la actividad inhibitoria sobre MAO-A (Vergel *et al*., 2010c).

Los derivados cumarínicos han sido probados contra MAO-B con el fin de analizar su potencia como inhibidores (Chimenti *et al*., 2004). La evaluación de 6-metil-3-fenilcumarinas dio como resultado una alta selectividad a la isoenzima MAO-B de algunos de estos compuestos con valores de IC_{50} en el rango nanomolar. El compuesto más activo de esta serie es varias veces más potente y selectivo sobre MAO-B que el compuesto de referencia (R-(-)-deprenyl) (Matos *et al*., 2004). Otros estudios sobre la serie 3-fenilcumarinas fueron evaluadas como inhibidores de MAO-A y B y la mayoría de estos compuestos mostraron actividad inhibidora sobre MAO-B. Algunos compuestos presentan mayor actividad (IC50 entre 11,05 y 7,12 nM) que la sustancia de referencia selegilina (IC50 = 19,60 nM) y una mayor selectividad sobre MAO-B (Matos *et al*., 2010; Matos *et al*., 2009). Estos estudios son importantes, teniendo en cuenta que los inhibidores de MAO-B han encontrado gran aplicación en la terapia de trastornos neurodegenerativos, incluyendo Parkinson (Foley *et al*., 2000).

2.1.3 Toxicidad de cumarinas

Aunque algunas de las cumarinas son tóxicas para los mamíferos, como las aflatoxinas, y se ha descrito fototoxicidad y fotomutagenicidad para las furanocumarinas, se considera que las cumarinas simples son menos tóxicas. En ratones, la DL_{50} de la cumarina se encuentra en el rango de 196-780 mg/kg, dependiendo de la cepa. (Alvarez, 1994).

Existen diferencias marcadas en el metabolismo de cumarina entre especies roedoras y otras especies incluyendo el hombre (Lake, 1999). En las ratas, los metabolitos de cumarina son altamente tóxicos, mientras que, en los seres humanos, el compuesto se metaboliza principalmente a metabolitos no tóxicos (Kienhuis *et al*., 2009). Sin embargo, la toxicidad de las cumarinas no se puede subestimar, un estudio en el que se evaluó el efecto de la cumarina sobre el perfil de expresión génica en hepatocitos humanos y se comparó con los resultados obtenidos en rata, demostró que ninguna vía o proceso relacionado con hepatotoxicidad en ratas fue observado en hepatocitos humanos. No

obstante, se observó represión del consumo de energía en las vías bioquímicas y deterioro de la función mitocondrial en hepatocitos humanos tratados con altas concentraciones de cumarinas, indicando posible toxicidad (Kienhuis *et al*., 2009).

De acuerdo con estudios de hepatotoxicidad en animales se fijó una ingesta diaria admisible de 0,1mg/kg de peso. Los datos clínicos sobre hepatotoxicidad de pacientes tratados con medicamentos tipo cumarinas revelan que un subgrupo de la población es más susceptible para los efectos hepatotóxicos que las especies animales investigadas, la causa de esta susceptibilidad en la actualidad es desconocida (Abraham *et al*., 2010).

2.2 Enfermedad de Parkinson

En 1817, James Parkinson describió de forma detallada las características clínicas de una serie de seis enfermos con un trastorno que él denominó "parálisis agitante", término que intentaba combinar dos características de la enfermedad: pobreza de movimientos voluntarios y la presencia de temblor. Precisó entre sus observaciones la evolución asimétrica, el curso progresivo de la enfermedad y la marcha festinante de aparición tardía. Trousseau, en 1861, desarrolló el concepto de rigidez, definió el término bradicinesia para referirse a la lentitud característica y observó que en fases avanzadas de la enfermedad aparecía deterioro cognitivo. Otro neurólogo francés, Charcot, fue quien la denominó enfermedad de Parkinson y completó la definición de los signos clínicos. La primera evidencia del trastorno dopaminérgico asociado data de 1960 (Philippens, 2008; Rojo, 2001).

2.2.1 Clínica

Esta es una enfermedad de los ganglios basales, causada por degeneración específica de neuronas dopaminérgicas en la vía nigroestriada lo que produce una alteración en el control y la coordinación del movimiento (Philippens, 2008; Cutillas *et al*., 2002; Pérez, 2006). Los principales síntomas de la enfermedad son pérdida debilitante del movimiento y de la funcionalidad que incluye rigidez muscular, bradicinesia (lentitud de movimiento), temblor de reposo y alteraciones en el equilibrio y la marcha (Alexi *et al*., 2000; Emborg, 2004). Pueden aparecer otros síntomas siendo el más común la depresión y en pacientes ancianos es frecuente la demencia (Dauer *et al.,* 2003).

La enfermedad de Parkinson es un cuadro de carácter progresivo que, sin tratamiento, produce un acortamiento de la esperanza media de vida. Se calcula una evolución media de 20 años desde el diagnóstico. En la fase inicial muchas veces los pacientes no reconocen los síntomas y signos, pero con el paso del tiempo se muestran incapacitados y requieren medicación. De manera general la respuesta a cualquier tratamiento es inicialmente buena, de larga duración, sin fluctuaciones y sin complicaciones, pero progresivamente la mejoría sintomática es insuficiente, de perfil temporal limitado y asociada a efectos secundarios (Rojo, 2001).

2.2.2 Etiología

La etiología específica de la enfermedad sigue sin estar clara, aunque se han propuesto varios factores que pueden contribuir con el proceso neurodegerativo, tales como: defectos genéticos, alteraciones inmunológicas, toxinas endógenas y exógenas, disfunciones mitocondriales, estrés oxidativo, aspectos inflamatorios, trastornos en la homeostasis del calcio y agregación de proteínas (Philippens, 2008; Emborg, 2004; Cutillas *et al*., 2002).

Los daños metabólicos y los tóxicos producen perdida de la función mitocondrial, lo que lleva a depleción de ATP el cual causa neurodegeneración preferencial en el ganglio basal (Alexi *et al*.,2000). El descubrimiento de alteraciones de la función mitocondrial, del metabolismo del hierro, de un aumento de la peroxidación lipídica y de actividades menores de enzimas que intervienen en "mecanismos antioxidación" sugieren que un incremento del estrés oxidativo y el consiguiente exceso en la producción de radicales libres podrían ser mecanismos patogénicos relevantes en la enfermedad de Parkinson. El déficit dopaminérgico podría conducir a una desinhibición de la actividad glutamatérgica y a lesión excitotóxica, mediada por aumento de calcio intracelular y activación de lipasas, proteasa y endonucleasas. Las neuronas dopaminérgicas de la substancia nigra están sometidas a un elevado estrés oxidativo secundario al metabolismo de las catecolaminas, lo que junto a un defecto en la producción de energía puede desencadenar la muerte neuronal tanto por activación de apoptosis como por necrosis mediada a través de excitotoxicidad (Rojo, 2001).

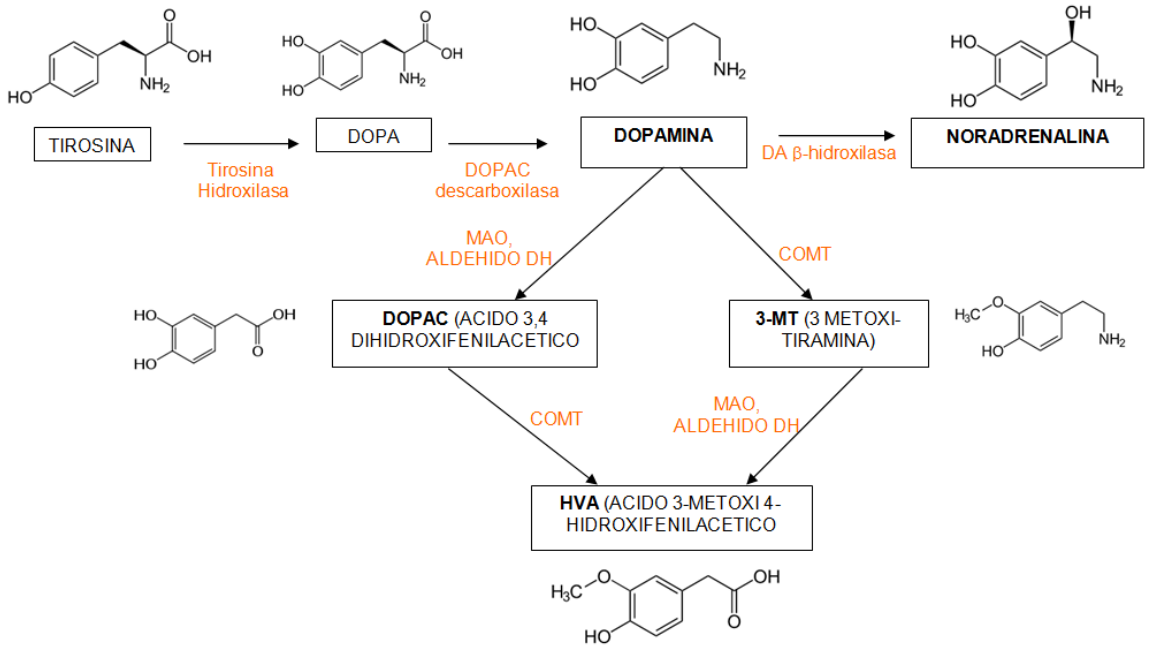
2.2.3 Neuropatología y neuroquímica

La neuropatología de la enfermedad de Parkinson es caracterizada por perdida de neuronas dopaminergicas únicamente (Dauer *et al*., 2003). Esta muerte neuronal provoca una disminución paulatina de los niveles de dopamina en estriado, lo que produce un desequilibrio funcional en los circuitos neuroquímicos cerebrales con el consiguiente desarrollo de los signos y síntomas típicos de esta enfermedad (Rojo, 2001). No obstante, se ha encontrado neurodegeneración en sistemas neuroquímicos como noradrenérgico (pérdida de neuronas del locus coeruleus, niveles disminuidos de noradrenalina, de sus metabolitos y de las enzimas de síntesis), serotoninérgico (degeneración de neuronas del núcleo del rafe, disminución de serotonina y sus metabolitos) y colinérgico. Sin embargo, las vías de lesión serotoninérgica y noradrenergica no están tan claramente caracterizadas como la lesión del sistema dopaminérgico (Dauer *et al*., 2003).

2.2.4 Síntesis y metabolismo de dopamina, noradrenalina y serotonina

La tirosina es transportada hacia las neuronas secretoras de catecolaminas, la tiroxina hidroxilasa (TH) convierte tirosina en DOPA, esta su vez pasa a dopamina (DA) gracias a la enzima dopa-decarboxilasa (DDC) (Norris *et al*., 1997). Una vez sintetizada la dopamina es depositada en vesículas de almacenamiento mediante un mecanismo activo en el que participa una proteína de transporte, este mecanismo es inhibido por la reserpina, lo que produce depleción de DA por oxidación de la monoamina oxidasa (MAO) (Mendoza N, 2008). La dopamina es oxidada por acción de la MAO al ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) y la 3 metoxitiramina (3-MT) se produce debido a la metilación de la dopamina vía catecol-O-metil-transferasa (COMT). EI ácido homovanílico (HVA) es el producto final del metabolismo de las catecolaminas por efecto de ambas enzimas (Figura 2-4) (Rojo A, 2001; Velasquez L, 2008).

Figura 2-4: Síntesis y metabolismo de catecolaminas



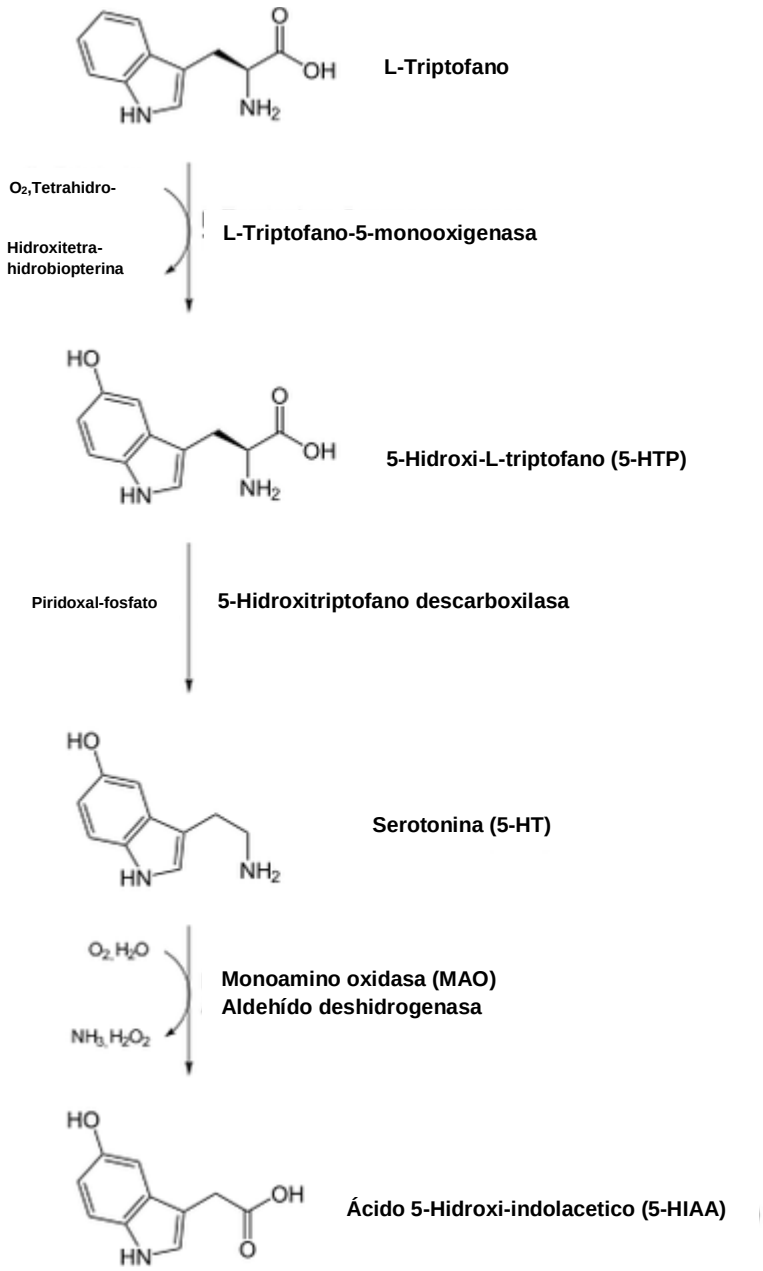
Esquema modificado de Rojo, 2001.

La dopamina ingresa a vesículas presinápticas donde puede ser hidroxilada y pasa a noradrenalina gracias a la enzima dopamina β-hidroxilasa (BDH) que también se encuentra en el interior de la vesícula. En la sinapsis dopaminérgica no se encuentra dicha enzima por lo tanto, la síntesis llega solo hasta dopamina. En la sinapsis adrenérgica, noradrenalina es transformada en adrenalina gracias a la enzima feniletanolamina-N-metiltransferasa (FNMT) (Norris *et al.*, 1997).

Las catecolaminas son recaptadas por la terminación nerviosa en un 70% y el resto sufre degradación enzimática a través de la MAO que se encuentra en la sinapsis. Las que se encuentran circulantes son además degradadas por la enzima COMT (Norris *et al.*, 1997).

Serotonina es una indolamina (5-hidroxitriptamina o 5-HT) que se produce por hidroxilación y descarboxilación del aminoácido esencial triptófano. Después de la liberación desde las neuronas serotoninérgicas, gran parte de la serotonina liberada es recaptada o es oxidada por la MAO a ácido 5-hidroxi-indolacético (5 HIAA) (Figura 2-5) (Norris *et al.*, 1997; Rang *et al.,* 2008).

Figura 2-5: Síntesis y metabolismo de serotonina



Esquema modificado de https://en.wikipedia.org/wiki/Serotonin

2.2.5 Monoamino oxidasa (MAO)

La monoamino oxidasa se encuentra localizada en el exterior de la membrana mitocondrial, existen dos isoformas MAO-A y MAO-B, las cuales tienen estructuras y pesos moleculares

similares (el 70% de la secuencia de aminoácidos es idéntica). La reacción de MAO sobre los diferentes sustratos produce un aldehído y H_2O_2, productos potencialmente tóxicos. En el caso de aminas primarias se libera amoníaco y en aminas secundarias o terciarias se producen otros productos nitrogenados (Finberg, 2014).

La elucidación de la estructura detallada de MAO A y B ha permitido una mayor comprensión del mecanismo de unión al sustrato y la catálisis, así como los requisitos estructurales para ser inhibidor. MAO es una flavoenzima y sustratos e inhibidores se unen al N-5 de flavina que conduce inicialmente a la formación de un aducto inestable, que se descompone en el caso de sustratos, o permite la unión covalente en el caso de los inhibidores irreversibles. El sitio de combinación está dentro de una única cámara cerca de la superficie de la membrana mientras que el sitio de MAO-B tiene una estructura bipartita con una cámara de entrada externa y combinada con una cavidad interior. La cavidad de entrada más pequeña en MAO-B permite el acceso de moléculas hidrofóbicas más pequeñas, como es el caso de 2-feniletilamina, mientras que el acceso de aminas hidroxiladas las más grandes, tales como 5-HT está restringido. La cavidad de entrada más amplia de MAO-A permite la unión a grandes, tales como 5-HT (Binda *et al*., 2002; Finberg, 2014).

2.2.6 Neurodegeneración

La muerte neuronal se puede atribuir a tres mecanismos principales que pueden actuar por separado o conjuntamente para producir neurodegeneración. Este trío letal es el compromiso metabólico, la excitotoxicidad y el estrés oxidativo. Estos eventos causan una serie de respuestas las cuales promueven la recuperación o la muerte de las células. La muerte neuronal ocurre muy probablemente por apoptosis y necrosis (Alexi *et al.,2000*).
Específicamente el estrés oxidativo se ha asociado con el metabolismo de dopamina por parte de MAO, especialmente por la producción de compuestos potencialmente tóxicos como aldehídos y peróxido de hidrógeno. Los productos de aldehído inmediatos son metabolizados rápidamente por enzimas metabolizadoras de aldehídos, y los radicales libres que pueden ser producidos a partir de H_2O_2 son neutralizados por eliminadores de radicales tales como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa y antioxidantes endógenos tales como el glutatión. La posibilidad de que las enzimas que normalmente neutralizan los productos tóxicos puedan ser disfuncionales en condiciones patológicas tales como en EP

ha dado lugar al concepto de que la actividad excesiva o incluso normal de MAO puede ser una causa potencial de estrés oxidativo en estas condiciones (Finberg, 2014).

2.2.7 Tratamiento

La terapia actual busca mejorar los síntomas de la enfermedad, al menos temporalmente, mediante la compensación de la disminución de los niveles de dopamina (Foley *et al., 2000*), para esto se han empleado agonistas de dopamina como L-DOPA, el inconveniente de estos es que con el tiempo los receptores de los pacientes llegan a ser menos sensibles y surgen los síntomas desactivados que no son sensibles al tratamiento, al igual que los efectos secundarios (Philippens, 2008; Emborg, 2004). Este enfoque, sin embargo, no es capaz de detener la progresión de la enfermedad (Foley *et al., 2000*).

Otros fármacos empleados en la enfermedad de Parkinson son los inhibidores de la monoamino oxidasa B, como la selegilina (también conocida como deprenil), la cual es empleada en monoterapia o como coadyuvante en el tratamiento con L-DOPA. El efecto sintomático es de larga duración y puede ser debido a la inhibición de la MAO, de carácter irreversible y con una duración de varias semanas, o a la producción del metabolito intermediario metanfetamina. La inhibición selectiva de MAO-B es importante la inhibición de MAO-A es la responsable de la mayoría de efectos adversos de los inhibidores de MAO. El tratamiento con Selegilina está acompañado de algunos efectos adversos como euforia, trastornos del sueño. Selegilina es metabolizada a metanfetamina, cual puede ser responsable de efectos adversos a nivel de sistema nervioso central y periférico (Finberg & Youdim, 2002).

2.2.8 Inhibidores de MAO-B

El interés por los inhibidores de la MAO-B se estimuló inicialmente por el deseo de elevar las concentraciones reducidas de dopamina característica de la enfermedad de Parkinson. Como la MAO-B por lo general, se presenta en exceso en los tejidos en que está, es necesario inhibir al menos el 80% de la enzima para lograr una acción farmacológica (Foley *et al.,* 2000).

Es importante señalar que el carácter selectivo de los inhibidores de MAO-B es relativo. La cuestión de si un sustrato se metaboliza por MAO-A o B depende en gran medida de las

concentraciones tisulares relativas de las dos isoenzimas y de los sustratos. Concentraciones más altas de un inhibidor selectivo generalmente inhibirán la otra forma de MAO y niveles elevados de un sustrato específico pueden también ser metabolizados, a una velocidad reducida, por la forma de menos sensible. Estas consideraciones son de importancia crucial en la determinación la dosis adecuada de un inhibidor de la MAO-B en los seres humanos, por ejemplo, la selectividad de la MAO-B de la selegilina en el SNC, se pierde cuando se aumenta la dosis y se administra en forma repetida en los animales (Foley *et al.,* 2000).

El análisis post mortem de cerebros de los pacientes tratados con selegilina, sugiere, sin embargo, que la selectividad funcional para la MAO-B se mantiene a pesar de la inhibición significativa de la MAO-A; los niveles de dopamina son muy elevados en comparación con los de pacientes no tratados con inhibidores de la MAO-B, mientras que los niveles de 5-HT y su metabolito oxidado ácido 5-hidroxiindolacético son esencialmente normales. Además, la tiramina, que indirectamente evalúa la inhibición de la MAO-A, no se incrementa después del tratamiento crónico con la dosis de selegilina estándar (Foley *et al.,* 2000).

En el sistema de transporte de monoaminas y la liberación de dopamina, l-selegilina administrada en forma aguda es un inhibidor relativamente débil de la captación de dopamina y se requieren altas concentraciones de inhibidores de MAO-B para un efecto significativo. Relativamente, también se requieren altas concentraciones para inhibir la captación de noradrenalina (NA) y de tiramina en vasos deferentes de rata y para la captación de NA en la línea celular catecolaminérgica PC12 (Foley *et al.,* 2000).

En lo referente a los efectos de neuroquímicos de inhibidores de MAO-B, la selegilina redujo los niveles de DOPAC y HVA, como era de esperar, y elevó los niveles de 3-MT, mientras que la Mofegiline no tuvo efecto significativo en los niveles en plasma de DOPA, DA, DOPAC o adrenalina en voluntarios sanos. Selegilina aumenta la actividad de neuronas catecolaminérgicas en cerebro de rata a dosis a las cuales no hay actividad inhibitoria de MAO-B; 0,01 mg/kg fue suficiente para una mejora del 42% de la actividad noradrenérgica y 0.025 mg/kg para aumentar la actividad dopaminérgica en un 17%. Estos efectos no estaban relacionados con la inhibición de los receptores presinápticos y la

captación de catecolaminas y no implicaron una mayor liberación de catecolaminas (Foley *et al.,* 2000).

La administración crónica de selegilina llevó a una reducción del 40% en la actividad de la tirosina hidroxilasa (TH), la enzima que limita la velocidad en la síntesis de dopamina, en rata, posiblemente secundario a un aumento de las concentraciones extracelulares de dopamina. La administración subcrónica (15 días) de selegilina no afectó la concentración de α-adrenoreceptores, noradrenalina o 5HT en el córtex de rata y el hipocampo estriado (Foley *et al.,* 2000).

Se podría predecir que los inhibidores de la MAO-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. Por otra parte, se espera que los inhibidores de la MAO-B protejan a las neuronas frente a toxinas por inhibición de su activación y en algunos casos de la captación neuronal (Foley *et al.,* 2000).

Se reconoce que ciertas lesiones del sistema nervioso central activan una cadena de respuestas que dan como resultado un daño mayor que el que se esperaría inicialmente. Estos procesos, como excitotoxicidad, no se entienden completamente, pero se espera que pueda ser posible diseñar las intervenciones farmacológicas que representen la detención, o incluso la reversión de estos procesos después de su iniciación (Foley *et al.,* 2000).

2.2.9 Neuroprotección

En la actualidad se investiga para desarrollar estrategias de neuroprotección, cuyo objetivo es retardar o parar la progresión de la neurodegeneración (Philippens, 2008), mediante la protección y preservación de la función de neuronas vulnerables supervivientes a los procesos neurotóxicos, los cuales son responsables de los cambios neuropatológicos observados (Foley *et al., 2000*). En la enfermedad de Parkinson la neuroprotección requiere una intervención temprana en el curso de la enfermedad para proteger, tanto como sea posible, la población de neuronas dopaminérgicas nigrales. Por otro lado, las estrategias regenerativas o de restauración intervienen en fases más avanzadas de la

enfermedad para mantener o reconstruir el sistema nigroestriatal (con o sin efectos neuroprotectores en las neuronas restantes) (Emborg, 2004).

Algunas estrategias de neuroprotección pueden ser, la terapia antioxidante, la terapia anti-excitotoxina, las terapias antiapoptóticas (Alexi *et al.,2000*). Además, se están desarrollando otros enfoques relativamente nuevos como estimulación cerebral profunda y terapia génica (Philippens, 2008). Dentro de las estrategias de neuroprotección, la inhibición de monoamino oxidasa B (MAO-B) ofrece perspectivas emocionantes para una mayor investigación con respecto al tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (Foley *et al., 2000*). Lo anterior teniendo en cuenta que, la monoamino oxidasa (MAO) juega un papel importante en la inactivación *in vivo* de aminas en sistema nervioso central (SNC), sistema nervios periférico (SNP) y tejidos; el más importante sustrato de para estas enzimas en SNC son las catecolaminas dopamina, noradrenalina, serotonina y B-feniletilamina. Se reconocen dos formas MAO-A y MAO-B, siendo dominante MAO-B en la región extrapiramidal del cerebro humano (Foley *et al., 2000*, Weinreb *et al., 2010*). Por tanto, los inhibidores de MAO-B pueden ser usados para prevenir la degradación de la dopamina endógena (Philippens, 2008).

Estudios realizados con moléculas como selegilina, han mostrado que la inhibición de MAO no se requiere para ejercer un efecto neuroprotector. Se encontró que bajas dosis de selegilina, en las cuales no se presenta inhibición de MAO B, mostraron efectos protectores frente al compuesto neurotóxico MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine). Por otra parte, un enantiomero de rasagilina (TVP-1022), que carece de actividad IMAO, presentó propiedades neuroprotectoras (Finberg, 2014).

2.3 Modelos experimentales para evaluar actividad farmacológica

La enfermedad de Parkinson está definida por criterios clínicos, morfológicos y neuroquímicos, en base a éstos se han desarrollado los modelos experimentales y se definen las posibles respuestas esperadas ante estrategias terapéuticas.

2.3.1 Modelos *in vivo*

- **Modelo de antagonismo de reserpina**

Este es un modelo clásico para la enfermedad de Parkinson. La reserpina produce disminución profunda y duradera de catecolaminas, como dopamina y noradrenalina por bloqueo del almacenamiento vesicular. Esto induce los síntomas parkinsonianos en seres humanos y en otras especies con trastornos motores similares. Un efecto sedante se puede observan en ratones poco tiempo después de la inyección de reserpina, seguido por signos de ptosis palpebral, hipocinesia, rigidez, catatonia e inmovilidad (Philippens, 2008; Vogel, 2002). Este modelo ha servido para evaluar la efectividad de distintos tratamientos y el efecto que produce la pérdida de aporte de dopamina sobre el estriado (Rojo, 2001). Además, ha sido desarrollado en varias especies incluyendo ratones, ratas, perros, gatos y primates no humanos (Emborg, 2004).

Puede ser útil en la evaluación de compuestos inhibidores de MAO-B, teniendo en cuenta que la reserpina impide el almacenamiento de dopamina en las vesículas neuronales, como resultado el catabolismo oxidativo de la dopamina citosólica por MAO es acelerado lo que produce desaparición de la dopamina (Bilska *et al.,*2007).

- **Potenciación del comportamiento inducido por L-dopa**

Al administrar L-dopa en animales pretratados con inhibidores de MAO, se pueden potenciar respuestas como saltos que pueden ser contados, esto se debe a sobreestimulación dopaminérgica. La L-dopa se descarboxila a dopamina, la cual no es degradada por efecto de los inhibidores de MAO (Vogel, 2002).

El modelo de potenciación de L-dopa / carbidopa (LD / CD) en ratones pretratados con reserpina, tiene como objetivo destacar la posible potenciación del efecto de LD, que presente la molécula evaluada, en ratones tratados con reserpina. La reserpina bloquea el transportador vesicular de monoaminas, impidiendo el adecuado almacenamiento de DA sintetizada, causando el agotamiento de terminales nerviosas dopaminérgicas que incluyen la vía nigrostriatal, lo que conduce a hipocinesia en animales de experimentación. Si la nueva molécula actúa como un inhibidor de la MAO-B *in vivo* a la dosis probada, inhibiendo el metabolismo de la DA, un aumento en la residencia se observaría momento

de la DA en hendidura sináptica nigroestriatal (Matos *et al.*, 2013), lo que se vería refleja en reversión de la hipocinesia.

- **Potenciación síntomas inducidos por 2-feniletilamina (FEA)**

La β-feniletilamina (FEA) es un sustrato específico para MAO-B y se metaboliza rápidamente en cerebro (Vogel, 2002; Dourish, 1982). Se reporta que después de la administración de FEA, en ratones, bien sea sola o después de la inhibición de MAO, se produce un síndrome de hiperactividad visible (Dourish, 1982)., esto ha sido catalogado como estereotipias.

El mecanismo por el cual FEA ejerce las estereotipias en roedores aún no se ha eludidado completamente. Se supone que el principal blanco molecular de FEA es un transportador de dopamina (DAT), que conduce a la liberación de dopamina en la región del cuerpo estriado (Kitanaka J *et al.*, 2005).

Se ha demostrado que FEA actúa como un modulador dopaminérgico y que la potenciación que ejerce sobre los potenciales de actividad dopaminergica es similar a la de la anfetamina y puede ser aumentada por los inhibidores de monoamino oxidasa (Youdim & Tipton, 2002). Kitanaka y col. encontraron que las estereotipias inducidas por FEA, en roedores, fueron potenciadas cuando se combinaron con inhibidores de MAO (Kitanaka J *et al.*, 2005)**.** Por tanto, se espera que al administrar FEA a animales pretratados con inhibidores de MAO-B, los efectos inducidos por ésta se potencien.

Varios autores reportan las estereotipias que se presentan en roedores cuando se les administra FEA, dentro de las cuales se encuentran: olfateo continuo, movimiento de la cabeza (lado a lado), movimientos clónicos en las patas, miembros posteriores extendidos, caminar en círculos, acicalamiento vigoroso, aumento de actividad motora y de levantamientos (Dourish, 1982; Kitanaka J *et al.*, 2005; Youdim *et al.*, 2002).

2.3.2 Modelos *in vitro*

- **Modelo rotenona**

El modelo rotenona de PD se ha usado para identificar potenciales agentes neuroprotectores en los últimos años (Greenamyre *et al.*, 2010). Rotenona es un plaguicida

lipófilo que puede cruzar la membrana celular fácilmente para inducir la inhibición específica del complejo I mitocondrial y causar la degeneración selectiva dopaminérgica nigroestriatal, se ha demostrado que en ratas produce efectos que se asemejan estrechamente con la enfermedad de Parkinson. Rotenona es uno de los agentes que se emplean para inducir parkinsonismo *in vitro* e i*n vivo* (Halperin *et al.*, 2009; Song *et al*., 2012). La disminución en la actividad del complejo de la cadena respiratoria mitocondrial así como el estrés oxidativo derivado de la mitocondria se han implicado en enfermedades neurodegenerativas (Molina-Jimenez *et al*, 2003; Song *et al*., 2012). Por otra parte, se ha tidemostrado que la rotenona es capaz de inducir apoptosis, en células SH-SY5Y, neuroblastoma humano, se encontró que dicha apoptosis estaba mediada por la generación de especies reactivas del oxígeno mitocondrial (ROS) (Watabe *et al*., 2007; Molina-Jimenez *et al,* 2003).

- **Cuantificación de la producción de anión superóxido mediante citometría de flujo**

La cuantificación de la producción de superóxido en células SH-SY5Y se fundamenta en el hecho que se exponen a rotenona, que es inhibidor del complejo I mitocondrial y por tanto aumenta la formación de ubisemiquinina que es el principal donante de electrones para la generación de superóxido mitocondrial. Rotenona estimula la producción, en primer lugar, de radical superóxido y en segundo de peróxido de hidrogeno (Li N *et al.*, 2002). Para la cuantificación se emplea dihidroxietidina (DHE), un compuesto fluorescente comúnmente usado en citometría de flujo para determinar la producción de ROS en tejidos y células, ya que puede penetrar libremente a través de las membranas celulares. La reacción de DHE y aniones superóxido, produce un producto rojo fluorescente (de etidio), que se intercala con el ADN (Seetapun *et al*, 2013). La fluorescencia de DHE depende de la cantidad de anión superóxido producido por NADPH oxidasa ligada a la membrana de la mitocondria.

2.4 Estudios de toxicidad

2.4.1 Fundamento

El propósito de las pruebas de toxicidad es obtener información útil sobre la sustancia estudiada para lograr la protección de los organismos vivos frente a la misma. Existen

varios tipos de pruebas de toxicidad, aguda, en dosis repetidas, subcrónica y crónica (Klaassen & Watkins, 2001; OECD, 2001).

2.4.2 Toxicidad aguda

Es la primera prueba de toxicidad que se realiza a una nueva sustancia, para cuantificar los efectos adversos que ocurren dentro de un breve lapso de tiempo con posterioridad a la administración de una dosis única, muy elevada. Las especies de uso más frecuentes son el ratón y la rata (Klaassen & Watkins, 2001).

Los objetivos de las pruebas de toxicidad aguda son: 1) proporcionar un estimado cuantitativo como la dosis letal 50 (DL_{50}) que sirve como parámetro de comparación frente a otras sustancias, 2) proporcionar información sobre los posibles órganos blanco y otras manifestaciones clínicas de toxicidad, 3) establecer la reversibilidad de la reacción tóxica y 4) proporcionar información que ayude en el diseño y selección de la dosis para los estudios a largo plazo. La dosis letal 50 está definida como una expresión estadísticamente derivada de una sola dosis de una sustancia que previsiblemente matará al 50% de los animales (Klaassen, 2008).

La observación de los animales se lleva a cabo después de la administración en dosis única de la sustancia y durante los 14 días siguientes, después de los cuales los animales son sacrificados y llevados a necropsia (Klaassen & Watkins, 2001; OECD, 2001).

2.4.3 Aplicaciones

En general los test de toxicidad desarrollan una evaluación de la toxicidad característica de una sustancia química, dicha sustancia puede ser un fármaco, un aditivo, un excipiente, un componente del medio ambiente, etc. De acuerdo con la dosis y el tiempo en el cual se desarrolle el estudio puede ser aguda, en dosis repetida, subcrónica o crónica (Klaassen & Watkins 2001; Klaassen, 2008).

2.5 Citotoxicidad

En citotoxicidad se observan las interferencias producidas por un xenobiótico o sus metabolitos, sobre los procesos basales comunes a la mayor parte de las células (Cameán

& Repetto, 2006). El efecto citotóxico de las sustancias evaluadas sobre los distintos tipos celulares se puede evaluar mediante varios métodos, uno de ellos es el ensayo de rezasurina que se basa en la reducción de este colorante (azul no fluorescente) en dos pasos, el primero es irreversiblemente a resorufina (rosado altamente fluorescente), y en una segunda etapa reversible, a dihidroresorufina, compuesto incoloro y no fluorescente, estos procesos se llevan a cabo por oxidorreductasas que se encuentran principalmente con la mitocondria de células viables. (Escobar *et al*., 2009; Escobar & Aristizabal, 2010; Escobar *et al*, 2010)

El método es descrito como un indicador de oxido-reducción que tiene propiedades de fluorescencia y responde a la actividad metabólica tanto de células humanas como de bacterias. Hace poco tiempo esta técnica empezó a ser usada en la valoración de la proliferación celular y citotoxicidad en diferentes tipos de células como fibroblastos, linfocitos humanos y de ratones, cultivos primarios de células neuronales y líneas tumorales (Escobar *et al.,* 2009). La fluorescencia es un indicador del metabolismo energético de la célula. Varios estudios reportan el uso de resazurina en sus procedimientos para detectar cambios metabólicos en las células PC12 tras la privación de suero. (Magnani & Bettini. 2000), también para evaluar la viabilidad celular en neuroblastoma (Mazzio & Soliman 2012; Jamil *et al*., 2013) o en línea celular SH-SY5Y (Franco *et al.,* 2009, Stephenson *et al.,* 2013).

El valor predictivo del modelo *in vitro* depende de la buena combinación entre el sustrato biológico y los indicadores de toxicidad aplicados (Arboleda *et al.*, 2010). Este colorante es poco tóxico para las células (no así otras técnicas descritas), y permite la continuidad de estudios en las mismas células, economizando tiempo y dinero, especialmente en cultivos primarios donde las células son muy escasas y preciadas. Además, es sensible y altamente reproducible (Escobar *et al.*, 2010)

3. Estudios *in vivo*

3.1 Metodología

3.1.1 Animales

Para todos los ensayos *in vivo* se emplearon 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° ± 1° 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.

3.1.2 Evaluación de IMAO-B en ratones no tratados con reserpina

En este ensayo los ratones se distribuyeron aleatoriamente en los diferentes grupos. Los tratamientos se administraron por vía oral (vo) así: grupo control (vehículo 0,1mL/10g), grupo patrón (selegilina 10 mg/kg) y los grupos de los análogos cumarínicos con efectos selectivos MAO-B: FCS005, FCS303, S1, S3 y S11 (100 mg/kg). La actividad motora se evaluó una hora y media después de la administración de los compuestos, al igual que 24 h después, en la prueba de campo abierto durante 5 minutos.

Los compuestos se trabajaron en dosis de 100 mg/kg, dado que esta dosis fue empleada en trabajos preliminares (Vergel, 2010a).

La prueba de campo abierto se llevó a cabo en una arena cuadrada negra con líneas blancas que la dividen en 16 cuadrados (Figura 3-1). Los animales se colocaron individualmente en el centro del campo abierto y se evaluó el número de cuadros

atravesados por el ratón durante 5 minutos. El campo abierto se limpió con una solución de agua-alcohol después de la evaluación de cada animal para eliminar posibles sesgos debido a los olores dejados por el sujeto anterior.

Figura 3-1: Prueba de campo abierto

3.1.3 Modelo de antagonismo de reserpina

Este es un modelo clásico de enfermedad de Parkinson en el que, la reserpina induce los síntomas parkinsonianos en seres humanos y en otras especies con trastornos motores similares (Philippens, 2008; Vogel, 2002). Por esta razón se utilizó en el tamizado farmacológico inicial de posibles agentes antiparkinsonianos.

Los ratones se distribuyeron aleatoriamente en los siguientes grupos: control (vehículo), patrón (selegilina) y los grupos de tratamiento correspondientes a los análogos cumarínicos con efectos selectivos MAO-B: FCS005, FCS303, S1, S3 y S11.

Se siguió el protocolo descrito por Tadaiesky y col. (Tadaiesky *et al.*, 2006), previa estandarización y con ligeras modificaciones. Todos los animales se inyectaron intraperitonealmente (i.p.) con 3 mg/kg de reserpina, 30 minutos después se administraron por vía oral (v.o.) los análogos cumarínicos 100 mg/kg, selegilina 10 mg/kg o vehículo para el grupo control. Se evaluó la actividad motora en campo abierto durante 5 minutos a las 2 y 24 horas después de la reserpinización.

A los compuestos que resultaron más interesantes, se les realizó la evaluación del efecto dosis respuesta y posteriormente se evaluaron en las demás pruebas planteadas tanto *in vivo* como *in vitro*.

Se evaluó el efecto dosis respuesta de los compuestos en dosis de 50, 100 y 200 mg/kg de peso, durante 2 y 24h., tanto en los ratones no tratados con reserpina como en el modelo de reserpina.

3.1.4 Efecto de IMAO-B y L-dopa en ratones pre-tratados con reserpina

La L-dopa se descarboxila a dopamina, esta última en presencia de inhibidores de MAO no es degradada (Vogel, 2002). Por tanto, se evaluó el efecto del pretratamiento con IMAO-B y luego L-dopa en ratones reserpinizados.

Para identificar cual es la dosis de L-dopa/carbidopa a emplear, se realizó una relación dosis respuesta en ratones reserpinizados.

En este modelo se ensayaron los compuestos que resultaron más interesantes en el ensayo de reserpina, en las dosis que presentaron diferencia significativa: S1, FCS005 y FCS303.

Los ratones se distribuyeron aleatoriamente en grupo control (vehículo), grupo patrón (selegilina 10 mg/kg) y los grupos de tratamiento correspondientes a: S1 (100 mg/kg), FCS005 (100 mg/kg) y FCS303 (100 y 200 mg/kg).

Todos los animales se inyectaron intraperitonealmente (i.p.) con 3 mg/kg de reserpina 30 minutos antes de la administración por vía oral (v.o.) de los análogos cumarínicos con efectos selectivos MAO-B, 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 2 y 24 horas después de la reserpinización.

3.1.5 Potenciación de síntomas inducidos por 2-feniletilamina

La 2-feniletilamina (FEA) es un sustrato específico para MAO-B (Vogel, 2002). Se administró FEA en animales pretratados con inhibidores de MAO-B y se evaluó la potenciación de efectos inducidos por ésta.

Los ratones se distribuyeron aleatoriamente en los siguientes grupos: control (vehículo), patrón (selegilina) y los grupos de tratamiento correspondientes a los análogos cumarínicos con efectos selectivos MAO-B, que mostraron ser más interesante en el modelo de reserpina: FCS005, FCS303 y S1.

Los compuestos a evaluar, el vehículo y el compuesto de referencia se administraron por vía oral, 30 min. antes de la administración i.p. de FEA 23 mg/kg (Youdim *et al.*, 2002). Inmediatamente después de la administración de FEA y cada 5 min. los animales se observaron 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 (Kitanaka J *et al.*, 2005; Youdim & Tipton, 2002; Dourish, 1982; Kato *et al.*, 1998)

Los compuestos se evaluaron en el modelo de potenciación de síntomas inducidos por FEA en dosis de 50, 100 y 200 mg/kg de peso.

3.1.6 Análisis complementarios de los IMAO-B

Con el fin de tener más herramientas para el análisis de los resultados obtenidos en los modelos *in vivo*, se procedió a desarrollar un análisis *in sílico* y una evaluación teórica de aspectos que tienen importancia farmacocinética de los análogos cumarínicos IMAO-B.

- **Análisis *in sílico* de compuestos IMAO-B**,

Para identificar la capacidad de interacción de MAO-B con los análogos cumarínicos se realizó un análisis *in sílico* por docking, en colaboración con el grupo de investigación en terapia celular y molecular y específicamente con el laboratorio de Neurobioquímica de la Pontificia Universidad Javeriana. La metodología fue la siguiente:

- Secuencia de la enzima monoamino oxidasa B

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la enzima MAO B de ratón, fueron obtenidas de la base de datos ensembl (Flicek *et al.* 2013) y se comparó con la base de datos Swiss-Protdatabase, Uniprot (http://www.uniprot.org/; código: Q8BW75).
Las secuencias de monoamino oxidasa de humano y ratón fueron comparadas de forma independiente; mediante la herramienta BIOEDIT (Biological Sequence Alignment Editor) (Hall, 2004).

- Modelaje de la estructura terciaria de monoamino oxidasa B

La estructura terciaria de MAO B de ratón fue modelada usando el servidor I-TASSER (http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu) (Zhang, 2008). Para esto se seleccionó la estructura terciaria de la MAO B humana reportada en el Protein Data Bank (PDB) con la referencia 4A79 y se utilizó como plantilla para la predicción de la estructura tridimensional de la enzima. Se seleccionó la estructura obtenida por I –TASSER con el C-score más bajo y con todos los aminoácidos de la secuencia primaria, visualizando el modelo en UCSF Chimera, Yasahara, Molegro v1.6.2 y Swiss-PdbViewer v4.1. La estructura de la proteína fue validada usando la herramienta PROCHECK y mediante PDBsum (Laskowski et al. 2005), disponible en el EBI server para determinar la geometría de los residuos entre estructuras a partir de parámetros estequiometricos de alta resolución y minimización energética. El cofactor FAD (flavín adenín dinucleótido), utilizado para los dockings de la enzima MAO B de ratón, fue obtenido de RCSB PDB protein data bank del PDB ID: 1GOS y se realizó un docking entre el FAD y la proteína modelada previamente, mediante la herramienta Molegro Virtual Docker (MVD) (Thomsen *et al.* 2006). Los aminoácidos del sitio activo, así como, el área y volumen de la cavidad fueron calculados usando la herramienta Molegro Virtual Docker (MVD).

- Estructura terciaria de los inhibidores cumarínicos

Los inhibidores cumarínicos fueron construidos a partir de moléculas básicas obtenidas en el programa chemspider (http://www.chemspider.com) y/o modificadas mediante el programa ACD/ChemSketch V. 14.01 (http://www.acdlabs.com).

- Docking molecular computacional

El análisis de Docking Molecular del modelo de la estructura terciaria de MAO B humana y de ratón con sus sustratos naturales y artificiales se realizó empleando el programa Molegro Virtual Docker v5.5 (MVD, CLC bio, Aarhus N, Denmark) (Thomsen *et al.* 2006). Las interacciones de los diferentes modelos con cada ligando fueron evaluadas al realizar la comparación utilizando como referente la estructura de la MAO B humana reportada en el Protein Data Bank (PDB) con la referencia 4A79, 1S2Q, 1S2Y y 1GOS. Las interacciones de los sustratos con los aminoácidos del sitio activo y el cofactor, fueron analizadas mediante el programa LigPlot+ V. 1.4.5 (Wallace et al. 1996), donde los puentes de hidrógeno se indican con líneas de trazos (verde) entre los átomos involucrados, mientras que los contactos hidrofóbicos están representados por un arco (rojo) con los rayos que irradian hacia los átomos del ligando que entran en contacto. Los átomos de contacto se muestran con rayos irradiando hacia atrás.

- **Evaluación teórica de propiedades moleculares con importancia farmacocinética de compuestos IMAO-B**

Con el fin de comprender mejor las respuestas obtenidas en los modelos *in vivo* de los compuestos de estudio, mediante el programa de cálculo de las propiedades Molinspiration (Cheminformatics, 2015), se obtuvieron, de acuerdo con la estructura, propiedades moleculares que tienen relevancia farmacocinética, tales como: el carácter lipofílico de las moléculas (expresado como coeficiente de reparto octanol /agua; log P), peso molecular, número de donantes y aceptores de hidrógeno. De igual forma el programa reportó si existen o no violaciones a la regla de Lipinski (Lipinski, 2004)

3.1.7 Análisis de datos

Los resultados de los estudios *in vivo* se expresaron en términos de promedio ± el error medio estándar (ems) y se analizaron por medio de un análisis de varianza de una vía o de dos dependiendo del caso. Para determinar el o los tratamientos responsables de las diferencias significativas se aplicaron las pruebas de diferencias múltiples de Tukey, Dunnett o Bonferroni. 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 los programas: Excel^{R}, GraphPad Prism (V 5.0) y Stata 12. El nivel de significancia estadística adoptado fue $P<0.05$

3.1.8 Aspectos éticos

Se tuvieron en cuenta consideraciones éticas tales como: las fijadas por el Consejo Internacional de Organizaciones Médicas para la investigación biomédica en animales, las establecidas en la Ley número 84 de 1989, capítulo sexto (en la cual se hace referencia al uso de animales vivos en experimentos e investigación en nuestro país) y la Resolución 8430 de 1993, titulo V, en el cual se dan pautas de la investigación biomédica con animales.

Por otra parte, 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 los estudios *in vivo* que se desarrollaron. Para esto, el comité tuvo en cuenta que en esta investigación se contó con un diseño metodológico apropiado con el cual se minimizó al máximo cualquier malestar que se pudo ocasionar a los animales. Además, se utilizó el numero adecuado de animales, se garantizó poner punto final a cualquier ensayo si el deterioro de los animales sobrepasaba las expectativas y el investigador contaba con la habilidad necesaria para el cuidado y manejo de los animales.

3.2 Resultados

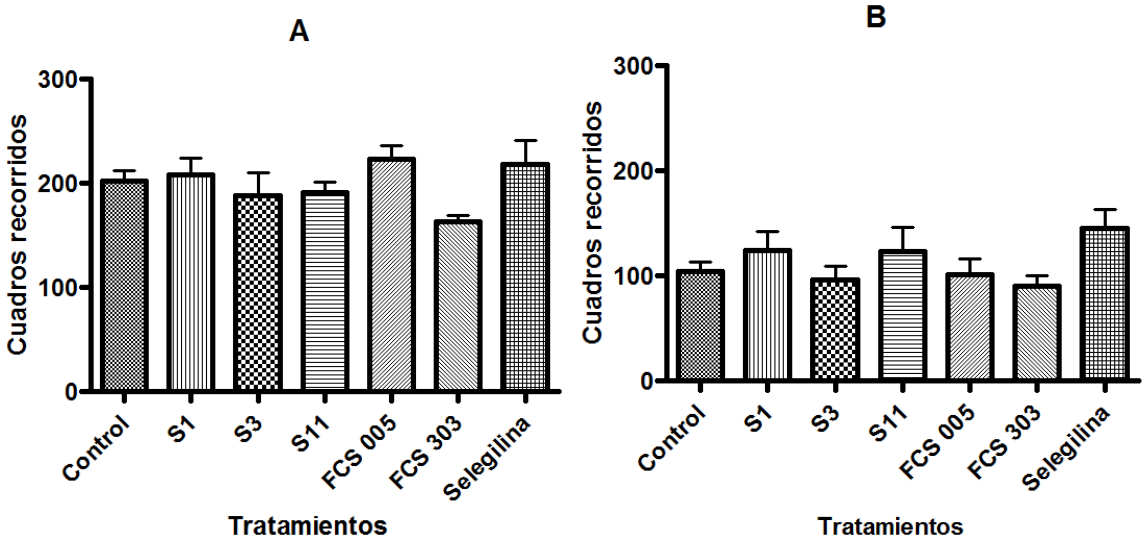
Los resultados obtenidos para los compuestos inhibidores selectivos de MAO-B: cumarina (S_1) y los análogos cumarínicos 3-metil-7H-furo[3,2-g]cromen-7-ona (FCS005), 8-propil-

6H-[1,3]dioxolo[4,5-g]cromen-6-ona (FCS303), 7-metoxicumarina (S_3) y 6-metilcumarina (S_{11}), en los modelos *in vivo*, son los siguientes:

3.2.1 Evaluación de IMAO-B en ratones no tratados con reserpina

Se evaluó el efecto de los compuestos sobre la actividad motora de los ratones, en dosis de 100 mg/kg (Vergel, 2010a) y el patrón de referencia (selegilina), en dosis de 10 mg/kg (Finberg, 2002; Matos *et al.*, 2013). Se encontró que presentaron un comportamiento similar al control. A las 2 horas de evaluación el compuesto FCS303 muestra una tendencia a la disminución en la actividad motora y a las 24 horas se observa una disminución de la locomoción generalizada, tanto del control como de los tratamientos. Sin embargo, de acuerdo con la sensibilidad de la prueba estadística aplicada, en ninguno de los dos casos se detectaron diferencias significativas entre los compuestos y el control (Figura 3-2).

Figura 3-2: Evaluación de IMAO-B en ratones no reserpinizados



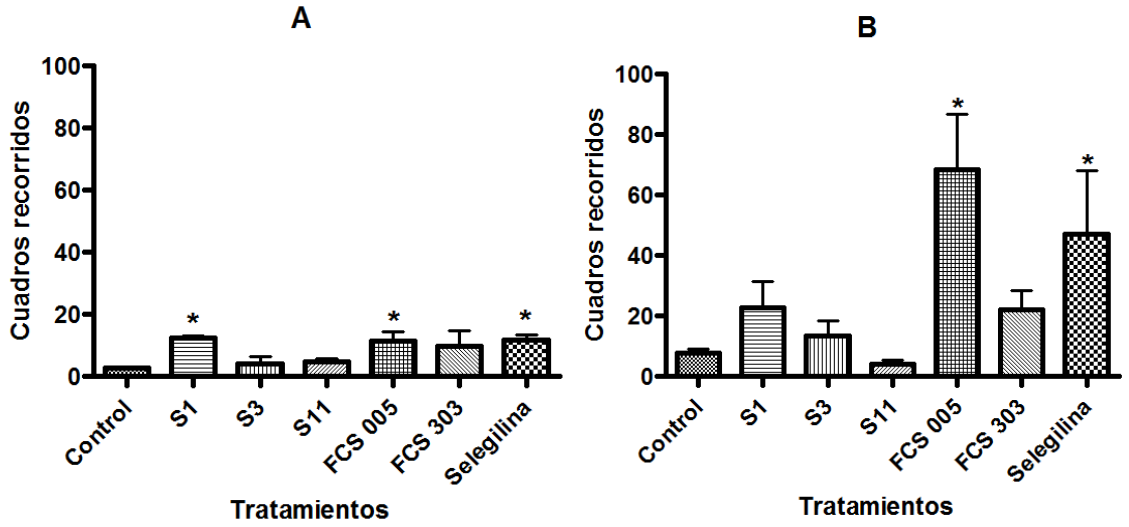
Actividad motora después de la administración de análogos cumarínicos IMAO-B (100 mg/kg), control (0 mg/kg) o patrón de referencia (10 mg/kg), en ratones no tratados con reserpina. Evaluación a las 1,5 h (A) y a las 23,5 h (B) después de la administración de los IMAO-B.

3.2.2 Modelo de antagonismo de reserpina

El modelo de reserpina se empleó para evaluar los efectos antiparkinsonianos de todos los analogos cumarínicos en dosis de 100 mg/kg. Se observó que los compuestos S1, FCS005

y el patrón de referencia (10 mg/kg), causaron reversión de la hipocinesia en los ratones, presentando diferencia significativa con respecto al control. Los demás compuestos no mostraron diferencia cuando se evaluaron a las 2 h después de la administración de reserpina, sin embargo, el compuesto FCS303 mostró una tendencia importante en el aumento de la actividad motora (Figura 3-3 (A)). En la evaluación a las 24 h solamente selegilina y FCS005, mostraton diferencia significativa y S1 y FCS303 presentan una ligera tendencia de reversión de la hipocinesia (Figura 3-3 (B)), que la prueba estadística no detectó como significativa.

Figura 3-3: Evaluación de IMAO-B en modelo de reserpina

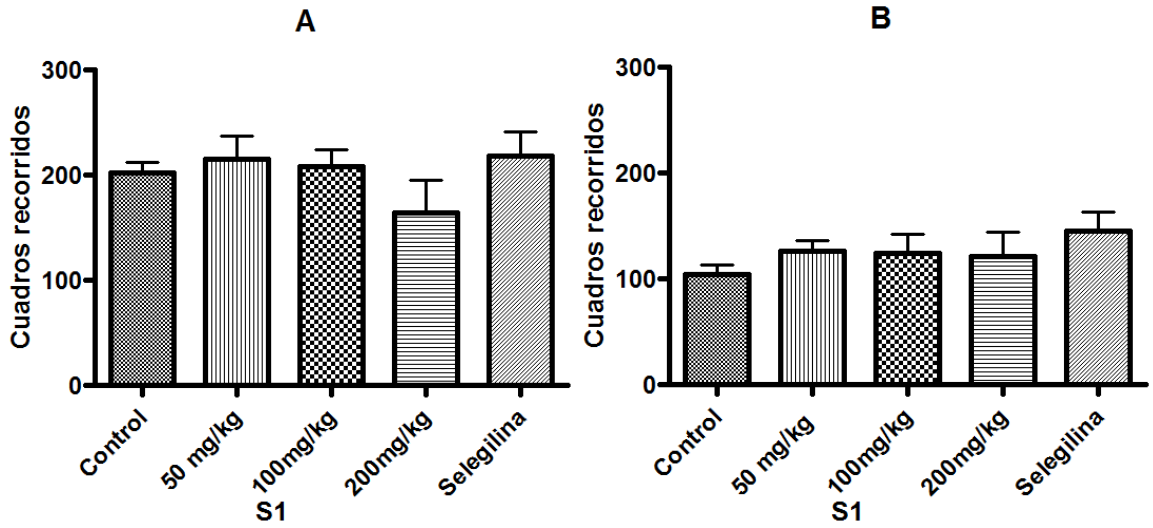


Actividad motora después de la administración de análogos cumarínicos IMAO-B (100 mg/kg), control (0 mg/kg) o patrón de referencia (10 mg/kg), evaluada en modelo de reserpina. Evaluación a las 2 h (A) y a las 24 h (B) después de la administración de reserpina. * Diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control ($p<0,05$)

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la evaluación de todos los análogos cumarínicos, se procedió a evaluar a diferentes dosis los compuestos S1, FCS005 y FCS303, los cuales presentaron respuestas más interesantes. Cada compuesto se evaluó en dosis de 50, 100 y 200 mg/kg de peso, a las 2 y a las 24h. Este procedimiento se realizó tanto en los ratones no tratados con reserpina como en el modelo de reserpina, con el fin de verificar el efecto de las diferentes dosis.

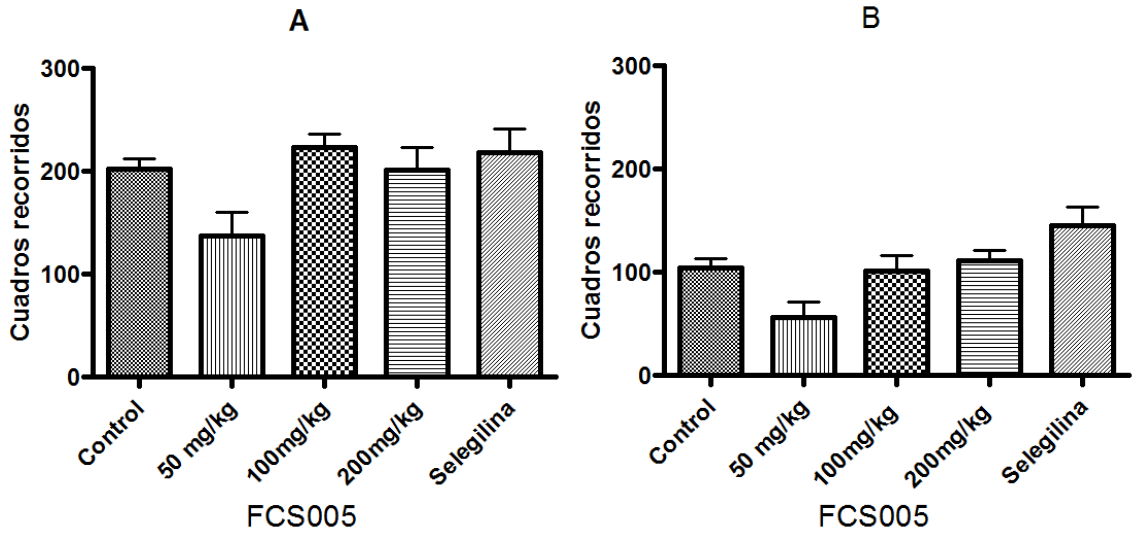
No se observó ningún efecto de los compuestos S1, FCS005 y FCS303 en ratones no reserpinizados, ya que, mostraron un comportamiento similar al control, las dosis evaluadas no presentaron diferencias significativas ni efecto dosis respuesta. El compuesto S1, a las 2 h de evaluación en la dosis de 200 mg/kg mostró una tendencia a la disminución de la actividad motora (Figura 3-4). El mismo comportamiento se presentó con la dosis 50 mg/kg del compuesto FCS005, tanto a las 2 h como a las 24 h (Figura 3-5). Finalmente, para el compuesto FCS303, al igual que en los casos anteriores, a las 24h se presenta una ligera tendencia a la disminución en las dosis de 50 y 100 mg/kg (Figura 3-6). La tendencia de disminución en la actividad motora, descrita anteriormente, no fue detectada por la prueba estadística aplicada como significativa.

Figura 3-4: Efecto dosis respuesta S1 en ratones no reserpinizados



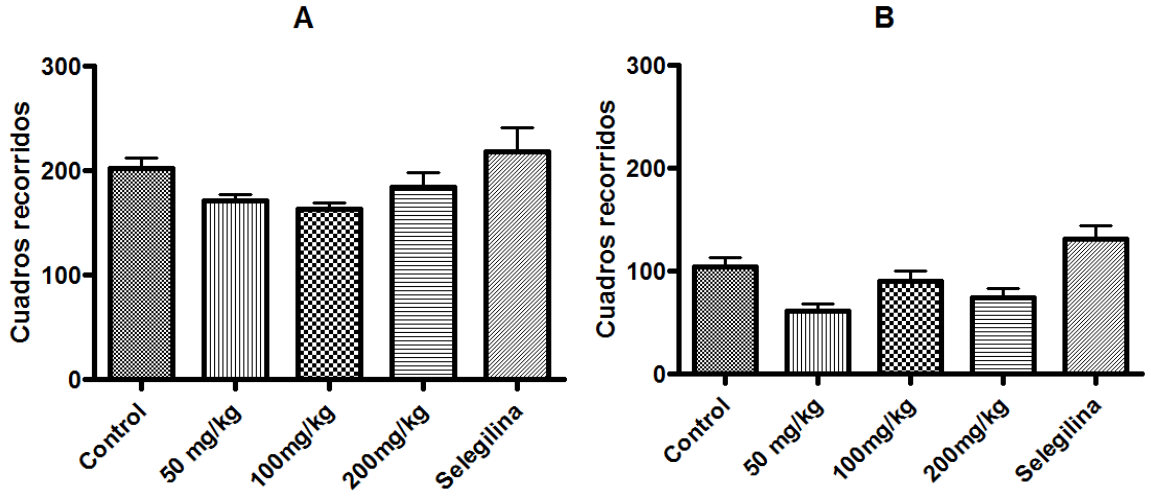
Actividad motora después de la administración de S1 en dosis 50, 100 y 200 mg/kg, control (0 mg/kg) o patrón de referencia (10 mg/kg), evaluada en ratones no reserpinizados. Evaluación a las 1,5 h (A) y a las 23,5 h (B) después de la administración de S1

Figura 3-5: Efecto dosis respuesta FCS005 en ratones no reserpinizados



Actividad motora después de la administración de FCS005 en dosis 50, 100 y 200 mg/kg, control (0 mg/kg) o patrón de referencia (10 mg/kg), evaluada en ratones no reserpinizados. Evaluación a las 1,5 h (A) y a las 23,5 h (B) después de la administración de FCS005

Figura 3-6: Efecto dosis respuesta FCS303 en ratones no reserpinizados



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 ratones no reserpinizados. Evaluación a las 1,5 h (A) y a las 23,5 h (B) después de la administración de FCS303

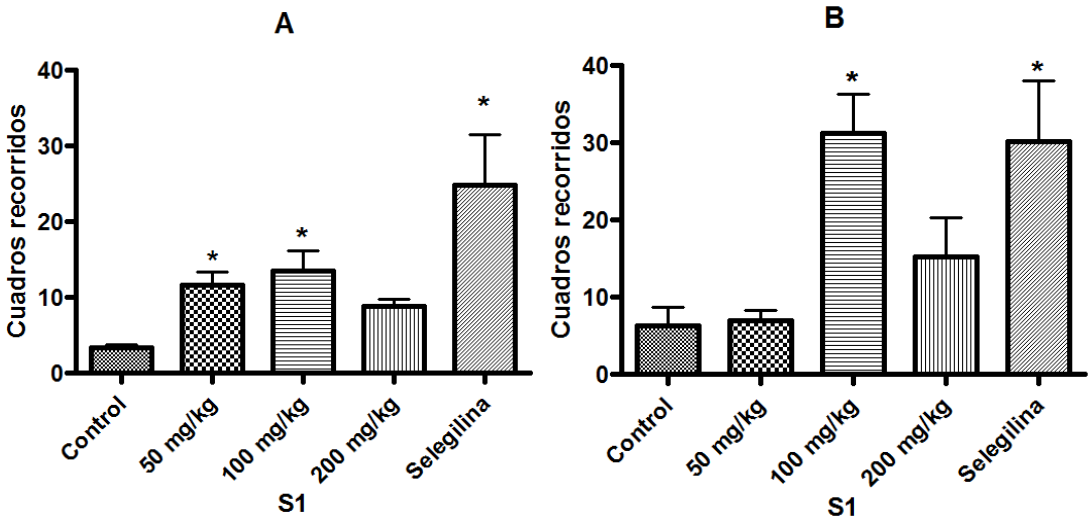
En el modelo de reserpina las dosis del compuesto S1 que presentaron reversión significativa de la hipocinesia en comparación con el control fueron 50 y 100 mg/kg, a las dos horas de evaluación y a las 24 h la dosis de 100 mg/kg (Figura 3-7). Selegililina (10

mg/kg), también presentó diferencia significativa en los dos tiempos. La dosis de 200 mg/kg presentó una tendencia al aumento, que la prueba estadística no detectó como significativa.

El compuesto FCS005 no tuvo un efecto dosis dependiente. A las dos horas de evaluación, la dosis de 100 mg/kg y selegilina mostraron diferencia significativa frente al control y la dosis de 200 mg/kg presentó una tendencia a la reversión del efecto de reserpina. A las 24h, únicamente, el efecto de la dosis de 100 mg/kg fue significativo, mientras que selegilina y la dosis de 200 mg/kg mostraron tendencia a la reversión, pero no fue detectada como significativa (Figura 3-8).

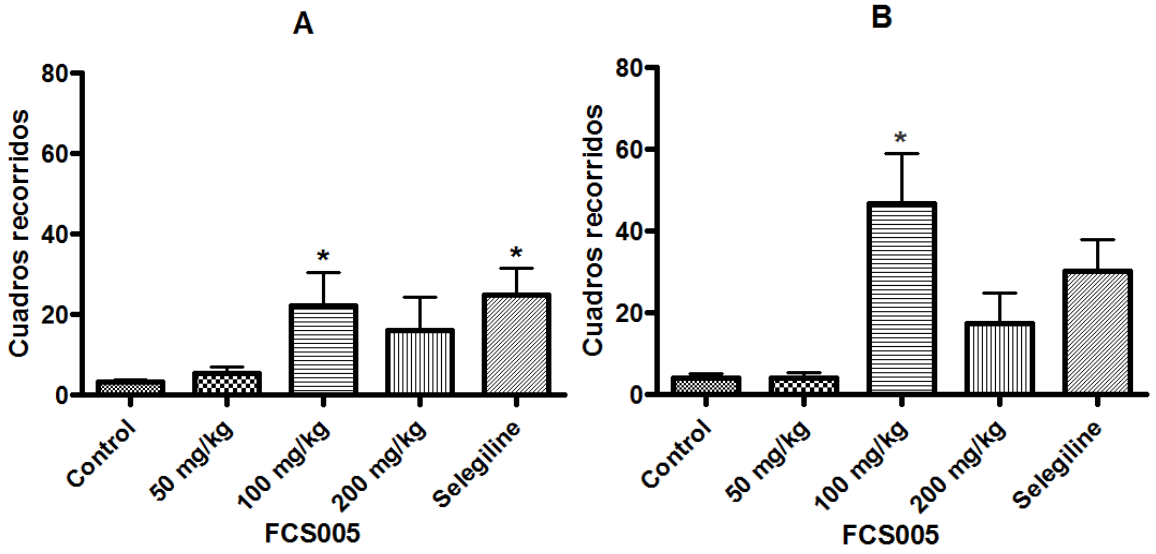
En el modelo de reserpina, el compuesto FCS303 a las 2 h presentó una ligera tendencia en la reversión de la hipocinesia, especialmente las dosis de 100 y 200 mg/kg, mientras que selegilina fue significativamente diferente. A las 24 h se observó que las dosis de 100, 200 mg/kg y selegilina mostraron diferencia significativa frente al control (Figura 3-9).

Figura 3-7: Efecto dosis respuesta S1 en modelo de reserpina



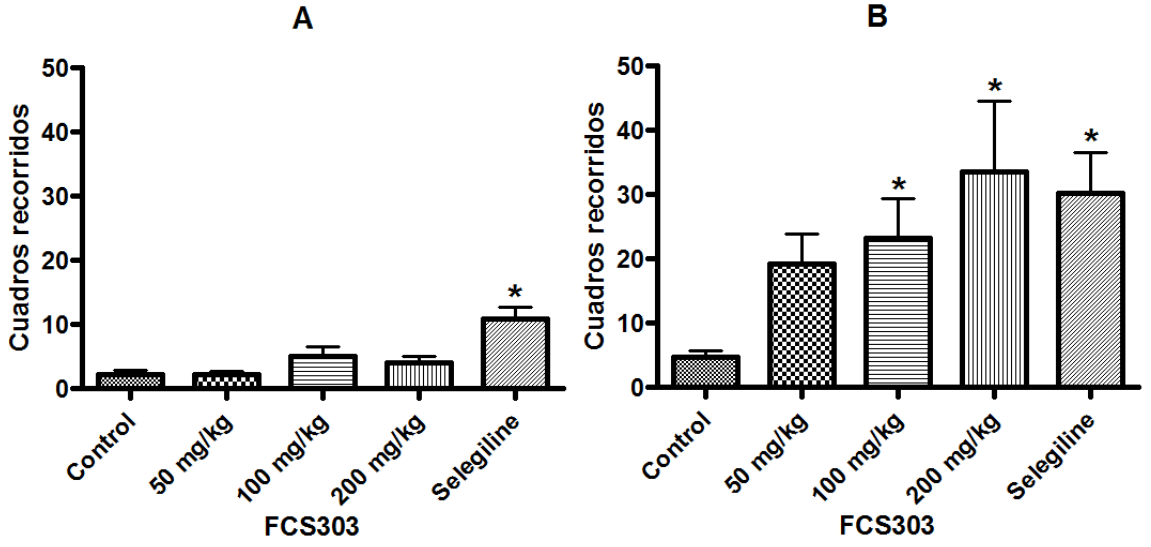
Actividad motora después de la administración de S1 en dosis 50, 100 y 200 mg/kg, control (0 mg/kg) o patrón de referencia (10 mg/kg), evaluada en modelo de reserpina. Evaluación a las 2 h (A) y a las 24 h (B) después de la administración de reserpina. * Diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control ($p<0,05$).

Figura 3-8: Efecto dosis respuesta FCS005 en modelo de reserpina



Actividad motora después de la administración de FCS005 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 2 h (A) y a las 24 h (B) después de la administración de reserpina. * Diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control (p<0,05).

Figura 3-9: Efecto dosis respuesta FCS303 en modelo de reserpina

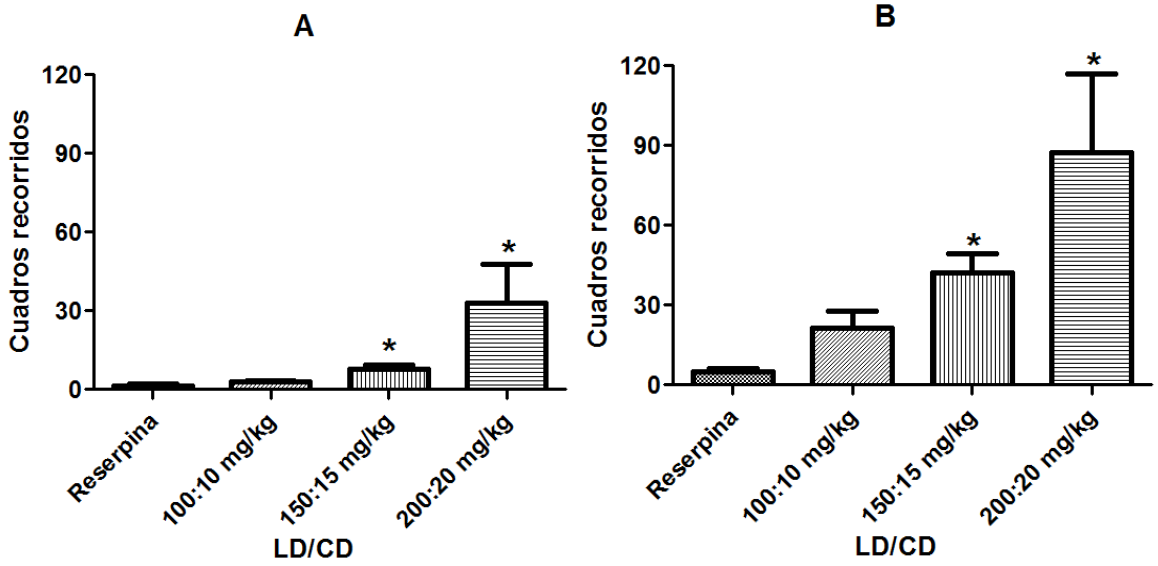


Actividad motora después de la administración de FCS303 en dosis 50, 100 y 200 mg/kg, control (0 mg/kg) o patrón de referencia (10 mg/kg), evaluada en modelo de reserpina. Evaluación a las 2 h (A) y a las 24 h (B) después de la administración de reserpina. *Diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control (p<0,05).

3.2.3 Efecto de IMAO-B y L-dopa en ratones pre-tratados con reserpina

En la relación dosis respuesta de Levodopa/carbidopa (LD:CD), se observó que, a las 2 y a las 24 horas, todas las dosis ensayadas presentaron un efecto significativo en la reversión de la hipocinesia, excepto la dosis 100:10 mg/kg de LD:CD (Figura 3-10), que no presentó diferencia significativa con respecto al control. Esta última dosis se empleó para evaluar el posible efecto de la administración concomitante de los IMAO-B y L-dopa, dado que este modelo verificó la respuesta que se produce al reducir la dosis de levodopa.

Figura 3-10: Efecto dosis respuesta LD/CD en ratones reserpinizados



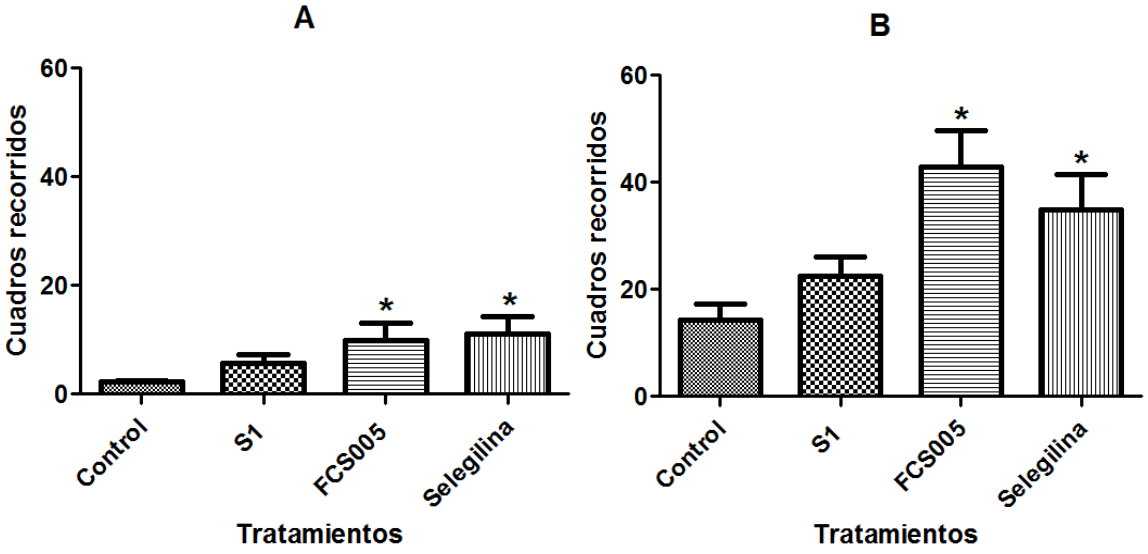
Actividad después de la administración de diferentes dosis de LD/CD en ratones pretratados con reserpina (3 mg/kg). Evaluación a las 2 h (A) y a las 24 h (B) después de la administración de reserpina. * Diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control reserpina ($p<0,05$).

En este modelo se evaluaron los análogos cumarínicos que presentaron mejor respuesta en el modelo de Parkinson de reserpina, teniendo en cuenta que el modelo de LD/CD se desarrolló en ratones reserpinizados. Por tanto, para S1 y FCS005 se escogió la dosis de 100 mg/kg, ya que mostró diferencia significativa en los dos tiempos de evaluación y para FCS303 se emplearon las dosis 100 y 200 mg/kg, dado que presentaron una tendencia a las 2 h y fueron significativas a las 24 h.

En el modelo de LD/CD, a las dos y a las 24 horas de evaluación, selegilina y el compuesto FCS005 mejoraron la respuesta de LD/CD y causaron reversión del efecto de la reserpina de una forma significativa con respecto al control, el compuesto S1 solamente mostró tendencia al mejoramiento sin ser significativa (Figura 3-11).

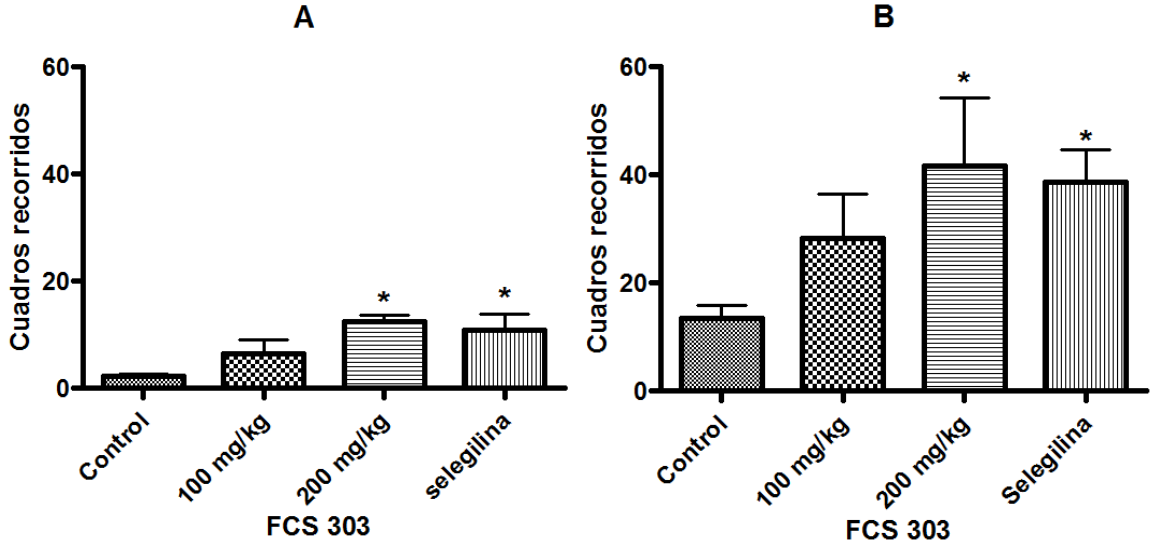
Por otra parte, el compuesto FCS303 en la dosis de 200 mg/kg y selegilina, mostraron diferencia significativa a las dos y a las 24 horas de evaluación. La dosis de 100 mg/kg solo presentó una tendencia de reversión de hipocinesia, sin que se detectara como significativa con respecto al control (Figura 3-12).

Figura 3-11: Efecto de LD/CD + IMAO-B en ratones reserpinizados



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

Figura 3-12: Efecto de LD/CD + FCS303 en ratones reserpinizados

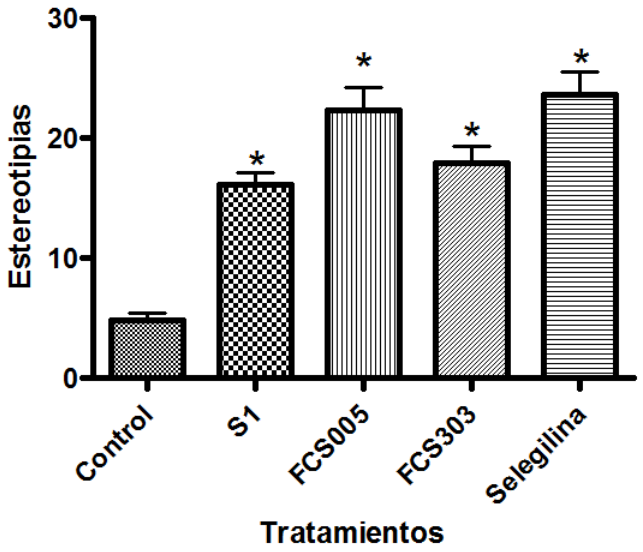


Efectos de levodopa/carbidopa (LD/CD) más FCS303 en dosis 100 Y 200 mg/kg, control (0 mg/kg) o patrón de referencia (10 mg/kg) en ratones pretratados con reserpina. Evaluación a las 2 h y a las 24 h después de la administración de reserpina. * Diferencia estadísticamente significativa con respecto al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

3.2.4 Potenciación de efectos inducidos por 2-feniletilamina (FEA)

Se evaluaron los análogos de cumarina en el modelo de 2-feniletilamina (FEA), para verificar posibles efectos potenciadores y la inhibición de MAO-B *in vivo*. Los compuestos S1, FCS005 y FCS303 en dosis de 100 mg/kg y selegilina en dosis de 10 mg/kg potenciaron la presencia de estereotipias de manera tal que al compararlos con el grupo control se presentó diferencia significativa (Figura 3-13). La dosis de 2-feniletilamina empleada fue de 23 mg/kg (Youdim & Tipton, 2002).

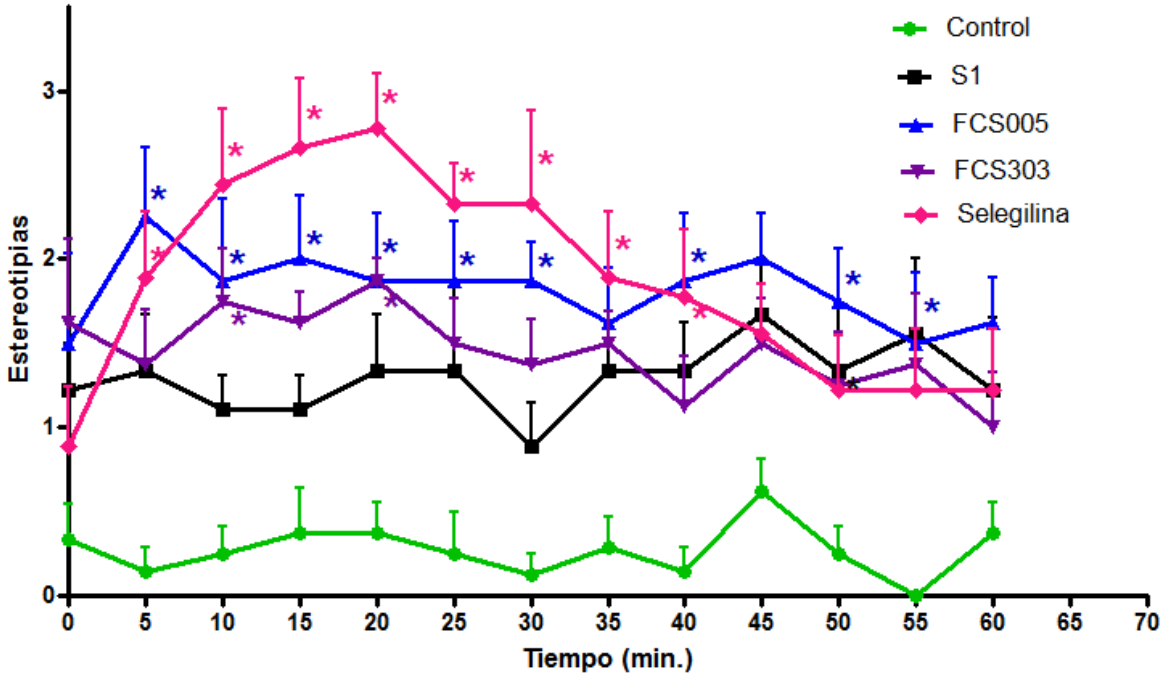
Figura 3-13: Potenciación del comportamiento estereotipado producido por FEA



Comportamiento estereotipado después de administrar FEA (23 mg/kg), en ratones pretratados con S1, FCS005 y FCS303 en dosis 100 mg/kg, control (0 mg/kg) o patrón de referencia (10 mg/kg). * Diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control ($p<0,05$)

El comportamiento de las estereotipias a través del tiempo se observa en la Figura 3-14. Selegilina presentó un aumento de las estereotipias en los primeros tiempos de evaluación superior al de los compuestos y hacia los 20 min. disminuyó la respuesta, al comparar con el control se presenta diferencia significativa desde el tiempo 5 hasta el minuto 40. Por otra parte, los compuestos también mostraron aumento de las estereotipias, presentando mayor aumento el compuesto FCS005, seguido por FCS303 y luego por S1. A partir del tiempo 40 los ratones administrados con FCS005 presentaron mayor puntaje en estereotipias que selegilina. Con respecto al control presentan diferencia significativa FCS005 desde el min. 5 hasta el min. 30 y a los 40, 50 y 55 min., mientras que FSC303 a los 10 y 20 min.

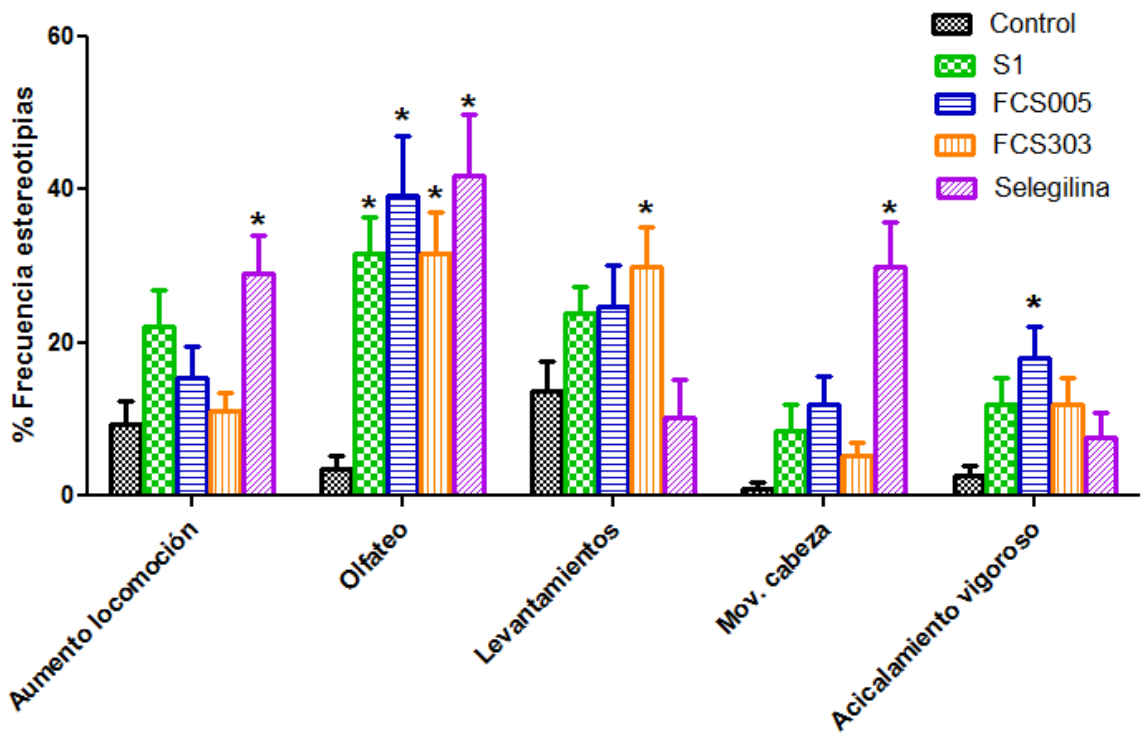
Figura 3-14: Potenciación del comportamiento estereotipado a través del tiempo



Puntaje de estereotipias a través del tiempo después de administrar FEA (23 mg/kg), en ratones pretratados con S1, FCS005 y FCS303 en dosis 100 mg/kg, control (0 mg/kg) o patrón de referencia (10 mg/kg). * Diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control ($p<0,05$)

Los comportamientos estereotipados que se presentaron con mas frecuencia se observan en la Figura 3-15. El olfateo continuo fue la esterotipia en la cual, todos los tratamientos y el patrón de referencia fueron significativamente diferentes en comparación con el control. Adicionalmente, selegilina en aumento de locomoción y movimiento de cabeza de lado a lado; FCS303 en levantamentos y acicalamiento vigoroso y FCS005 en acicalamiento vigoroso fueron significativamente diferentes. Solo el grupo de ratones tratados con selegilina presentó movimientos circulares con una frecuencia inferior a uno (dato no presentado en la figura 3-15).

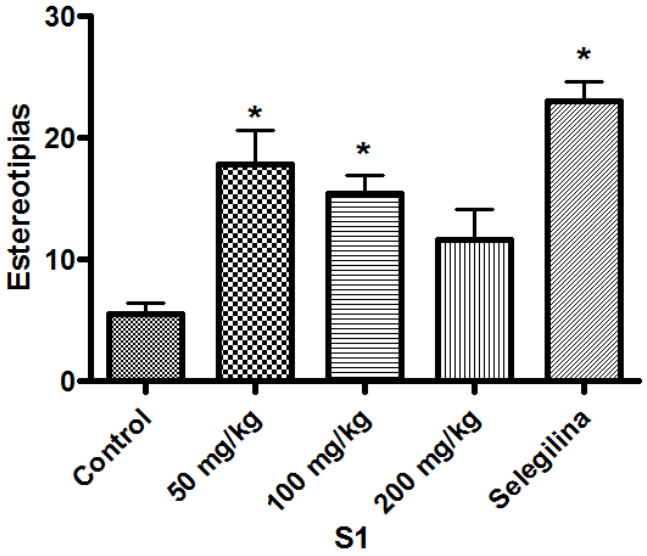
Figura 3-15: Estereotipias más frecuentes producidas por IMAO-B + FEA



Frecuencia de cada estereotipia después de administrar FEA (23 mg/kg), en ratones pretratados con S1, FCS005 y FCS303 en dosis 100 mg/kg, control (0 mg/kg) o patrón de referencia (10 mg/kg).
* Diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control ($p<0,05$)

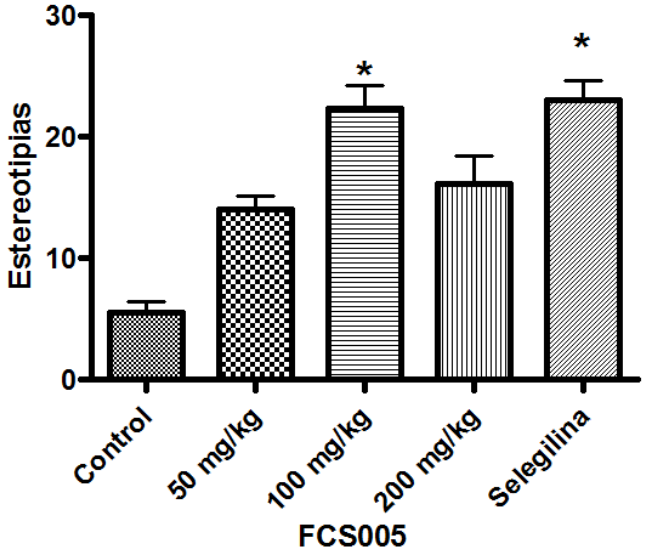
Se evaluó la potenciación de las moléculas IMAO-B a diferentes dosis (50, 100 y 200 mg/kg de peso), sobre el comportamiento estereotipado producido por FEA. Ningún compuesto presentó una relación dosis dependiente y todos mostraron aumento de las estereotipias en las diferentes dosis. Sin embargo, solo se presentó diferencia significativa frente al control en los siguientes casos: para S1 en 50 y 100 mg/kg (Figura 3-16); FCS005 en 100 mg/kg (Figura 3-17) y las dosis de 100 y 200 mg/kg para FCS303 (Figura 3-18).

Figura 3-16: Potenciación de S1 sobre el comportamiento estereotipado producido por FEA



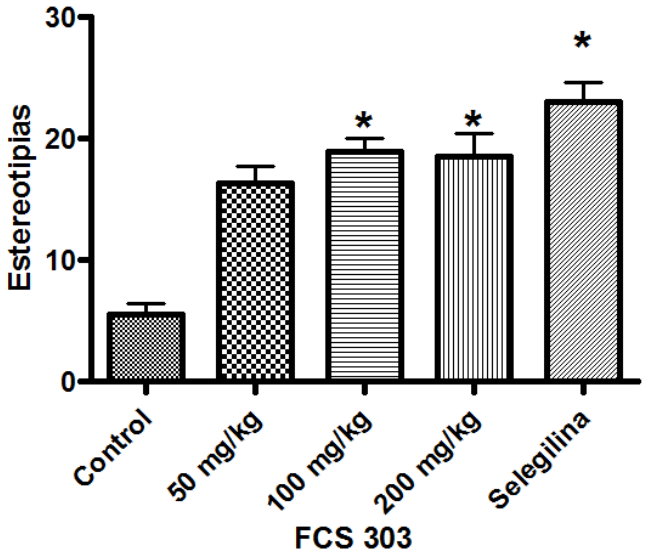
Comportamiento estereotipado después de administrar FEA (23 mg/kg), en ratones pretratados 50, 100 y 200 mg/kg de FCS303, control (0 mg/kg) o patrón de referencia (10 mg/kg). * Diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control (p<0,05)

Figura 3-17: Potenciación de FCS005 sobre el comportamiento estereotipado producido por FEA



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)

Figura 3-18: Potenciación de FCS303 sobre el comportamiento estereotipado producido por FEA



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 ($p<0,05$)

3.2.5 Análisis complementarios de los compuestos IMAO-B

Para complementar el análisis de los resultados obtenidos en los modelos *in vivo*, se procedió a desarrollar un análisis *in silico* y una evaluación teórica para predecir propiedades moleculares con importancia farmacocinética, de los análogos cumarínicos IMAO-B.

- **Análisis *in sílico* de compuestos IMAO-B**

Para identificar la capacidad de interacción de los análogos cumarinicos (S1, FCS303 y FCS005) con IMAO-B, se realizó un análisis *in silico* por docking. Para lo anterior se obtuvieron las secuencias de las monoamino oxidasa de humano y ratón. El alineamiento de secuencias de MAO-B, tanto para la enzima de ratón como la humana se muestra en la Figura 3-19. En él se observa que las dos secuencias presentan 520 aminoácidos, no se encontraron gaps en el alineamiento, el porcentaje de identidad es de 88,98 y solo un 3,1% de mutaciones son no conservativas. Adicionalmente, los aminoácidos del sitio activo son conservados en un 99,9% para ambas enzimas y solo se reporta un cambio

conservativo de Ile-316 por Val. Debido a la naturaleza de este cambio se espera que no afecte las interacciones con los ligandos.

Figura 3-19: Comparación de las secuencias de MAO-B de ratón y humana

```
MSNKCDVVVVGGGISGMAAAKLLHDSGLNVVVLEARDRVGGRTYTLRNQK 50
MSNKSDVIVVGGGISGMAAAKLLHDCGLSVVVLEARDRVGGRTYTIRNKN 50
****.**:*****************.**.****************:**::

VKYVDLGGSYVGPTQNRILRLAKELGLETYKVNEVERLIHHVKGKSYPFR 100
VKYVDLGGSYVGPTQNRILRLAKELGLETYKVNEVERLIHFVKGKSYAFR 100
**************************************.******.**

GPFPPVWNPITYLDHNNFWRTMDDMGREIPSDAPWKAPLAEEWDNMTMKE 150
GPFPPVWNPITYLDNNNLWRTMDEMGQEIPSDAPWKAPLAEEWDYMTMKE 150
**************:**:*****:**:***************** *****

LLDKLCWTESAKQLATLFVNLCVTAEIHEVSALWFLWYVKQCGGTTRIIS 200
LLDKICWTKSTKQIATLFVNLCVTAEIHEVSALWFLWYVKQCGGTTRIIS 200
****:***:*:**:************************************

TTNGGQERKFVGGSGQVSERIMDLLGDRVKLERPVIYIDQTRENVLVETL 250
TTNGGQERKFIGGSGQVSERIKDILGDRVKLERPVIHIDQTGENVIVKTL 250
**********:********** *:************:**** ***:*:**

NHEMYEAKYVISAIPPTLGMKIHFNPPLPMMRNQMITRVPLGSVIKCIVY 300
NHEIYEAKYVISAIPPALGMKIHYSPPLPMLRNQLISRVPLGSVIKCMVY 300
***:************:******:.*****:***:*:***********:**

YKEPFWRKKDYCGTMIIDGEEAPVAYTLDDTKPEGNYAAIMGFILAHKAR 350
YKEPFWRKKDFCGTMVIEGEEAPIAYTLDDTKPDGTYAAIMGFILAHKAR 350
**********:****:*:*****:*********:*.**************

KLARLTKEERLKKLCELYAKVLGSLEALEPVHYEEKNWCEEQYSGGCMTT 400
KLVRLTKEERLRKLCELYAKVLNSQEALQPVHYEEKNWCEEQYSGGCMTT 400
**.********:**********.* ***:*********************

YFPPGILTQYGRVLRQPVDRIYFAGTETATHWSGYMEGAVEAGERAAREI 450
YFPPGILTQYGRVLRQPVGKIFFAGTETASHWSGYMEGAVEAGERAAREI 450
******************.:*:*******:********************

LHAMGKIPEDEIWQSEPESVDVPAQPITTTFLERHLPSVPGLLRLIGLTT 500
LHAIGKIPEDEIWQPEPESLDVPARPITSTFLERHLPSVPGLLKLFGLTT 500
***:**********.****:****:***:**************:*:****

IFSATALGFLAHKRGLLVRV 520
ILSATALGFLAHKRGLFVHF 520
*:**************:*:.
```

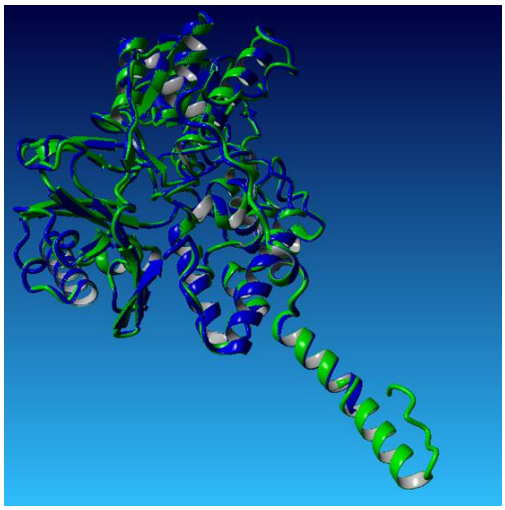
Alineamiento de las secuencias de MAO-B, donde los residuos superiores corresponden a MAO-B humana y los residuos inferiores a MAO-B de ratón, los aminoácidos reportados para el sitio activo están resaltados en rojo, en verde se muestra el cambio conservativo en el sitio activo. Los asteriscos indican identidad, mientras que los (:) representan cambios conservativos y los (.) muestran los cambios no conservativos.

- **Modelamiento de la Estructura 3D de la enzima MAO-B de ratón**

Debido a que no existe estructura 3D resuelta por cristalografía de rayos X o modelamientos *in silico* para la enzima MAO-B de ratón, se efectuó la predicción de la estructura utilizando el reporte de la MAO-B humana como molde. Los parámetros a tener en cuenta para evaluar la calidad de los modelos fueron RMSD (raíz cuadrada media de desviación) que calcula la calidad estructural del alineamiento y ángulos diédricos Phi y Psi. La descripción detallada del modelamiento de la estructura 3D de la enzima MAO-B de ratón y su validación, se presenta en el anexo C.

El alineamiento estructural entre los dos objetos tuvo un RMSD de 0,305 Å, con una identidad de secuencias del 88,98%. Al observar las combinaciones de ángulos diedrícos de la MAO-B de ratón a través de la estructura generada por i-Tasser utilizando el test Ramachandran plot (anexo C), se encontró un 81% de aminoácidos en las zonas más favorables. Lo que es coherente con los porcentajes de ángulos diédricos de estructuras cristalizadas para MAO-B humana. Estos porcentajes son menores a 90% debido a que la estructura 3D fue modelada con el cofactor FAD, sin embargo, se considera que el 81% obtenido genera un buen criterio de calidad y confiabilidad en el modelaje de la estructura 3D (Figura 3-20). Lo anterior, se hace evidente cuando se comparan las estructuras 3D para la enzima resuelta por cristalografía y la MAO-B modelada para este trabajo.

Figura 3-20: Comparación de las estructuras 3D de MAO-B de ratón y humana



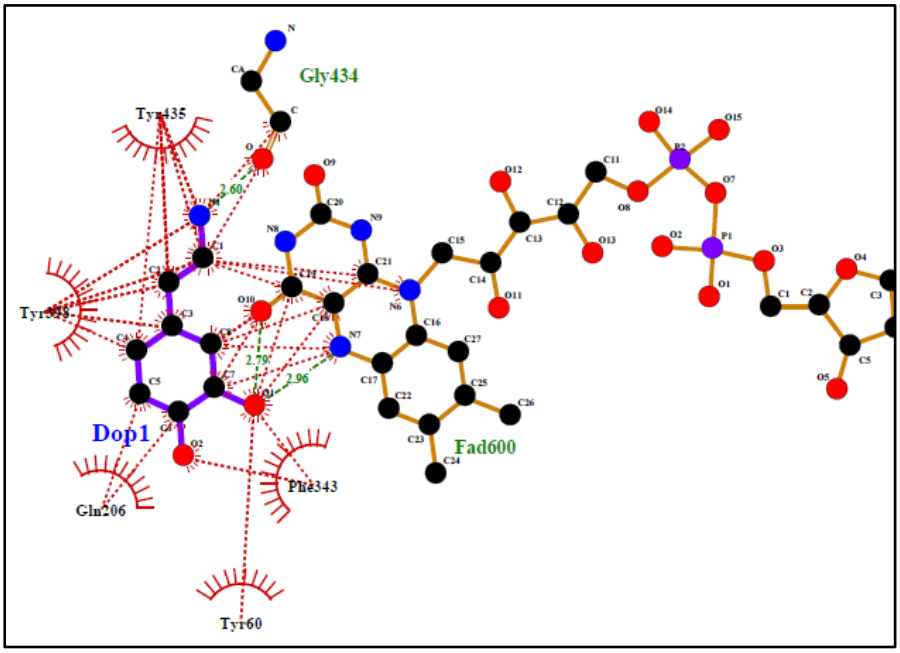
Las estructuras 3D de las enzimas MAO-B de ratón y humana se observan superpuestas. En verde se muestra la estructura predicha de MAO-B de ratón y en azul MAO-B 4A79 resuelta por cristalografia de Rayos X

- **Posibles interacciones de la enzima MAO-B humana con sus sustratos e inhibidores conocidos**

El acoplamiento molecular se desarrolló entre MAO-B humana y dos de sus sustratos naturales (dopamina y 2-feniletilamina), también con compuestos IMAO-B reconocidos (selegilina y rasagilina) y finalmente con las moléculas que presentaron actividad en los diferentes modelos *in vivo* (S1, FCS303 y FCS005). Para este análisis de docking se modelóel sitio activo en interaccion con la coenzima Flavina Adenin Dinucleotido oxidada (FAD), debido a que es imprescindible para la reacción. Las características de las interacciones se presentan a continuación.

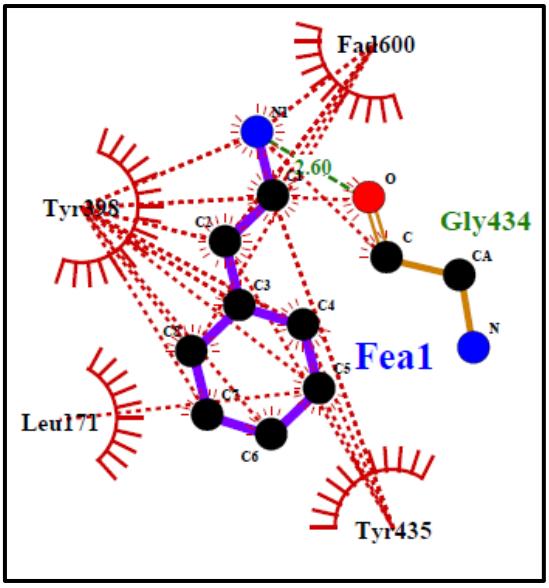
Dopamina mostró puentes de hidrogeno con Gly434 y FAD (se presenta la estructura completa) y con Tyr435, Tyr398, Gln206, Tyr60 y Phe343, estas últimas interacciones se caracterizan por ser de naturaleza hidrofóbica (Figura 3-21). Mientras que 2-feniletilamina mostró interacciones tipo puente de hidrógeno con Gly434 e interacciones hidrofóbicas con Tyr435, Tyr398, Leu171 y FAD (Figura 3-22).

Figura 3-21: Interacciones entre dopamina y MAO-B humana



Se evidencian los residuos del sitio activo de la enzima en interacción con FAD indispensable para la reacción enzimática. Las interacciones hidrofóbicas se muestran como un arco con radios en los cuales se destaca con líneas punteadas rojas el átomo responsable, mientras que los puentes de hidrogeno se muestran con líneas punteadas verdes.

Figura 3-22: Interacciones entre 2-feniletilamina y MAO-B humana

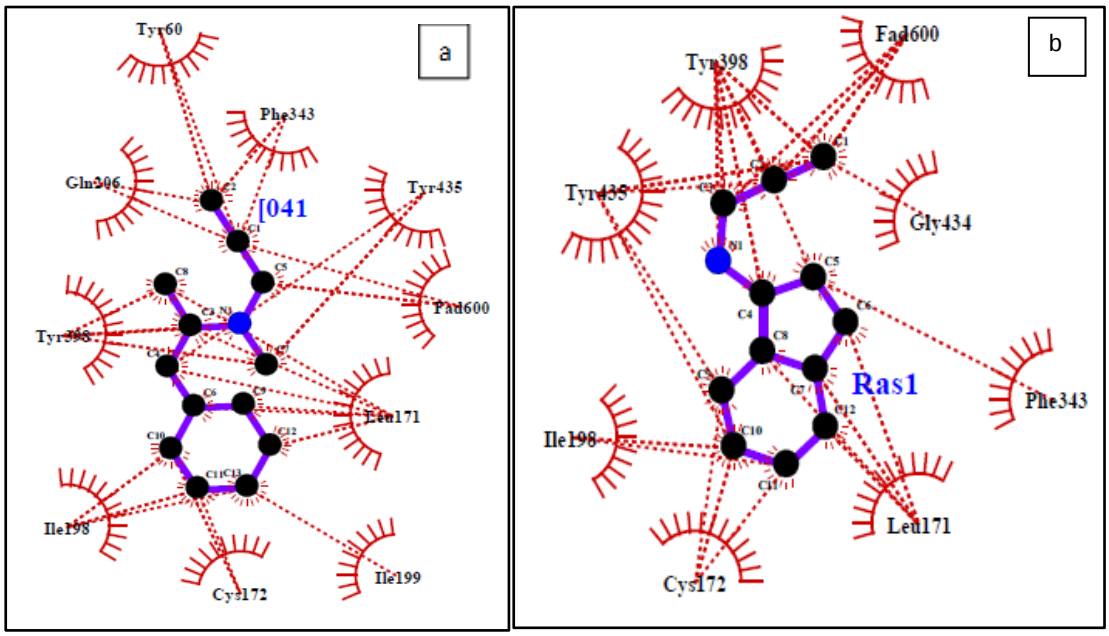


Se evidencian los residuos del sitio activo de la enzima en interacción con FAD (no se presenta la estructura). Las interacciones hidrofóbicas se muestran como un arco con radios en los cuales se destaca con líneas punteadas rojas el átomo responsable, mientras que los puentes de hidrogeno se muestran con líneas punteadas verdes.

Los IMAO-B comercializados presentaron únicamente interacciones hidrofóbicas con FAD y con los residuos Tyr435, Tyr398, Ile198, Cys172, Leu171 y Phe343, además de estos aminoácidos rasagilina también presentó interacción con Gly434 y selegilina con Tyr60, Gln206 y Ile199 (Figura 3-23 a y b). Es importante anotar que para estos inhibidores no se presentaron interacciones tipo puente de hidrogeno, esto sugiere que una de las características de la inhibición es la prevalencia de interacciones hidrofóbicas que pueden ser incluso más fuertes cuando se comparan con otro tipo de interacciones débiles.

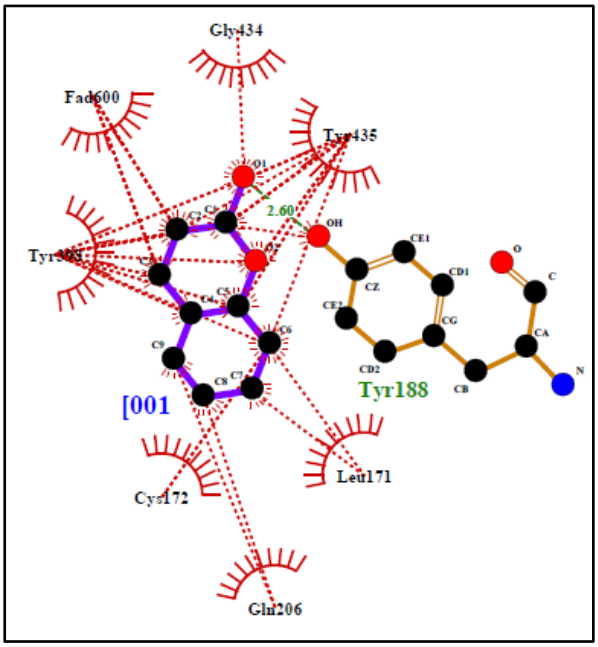
En las interacciones que se presentaron con las moléculas de estudio se apreciaron puentes de hidrógeno entre Tyr188 y S1 y entre Cys172 y los compuestos FCS303 y FCS005. Los tres análogos cumarínicos mostraron interacciones hidrofóbicas en común con FAD, Leu171, Gln206, Tyr398, Tyr435. Para el compuesto S1 adicionalmente se evidenciaron otras interacciones con Gly 434 y FAD, para FCS005 con Ile198, Ile199, Phe343 y para el compuesto FCS303 con Ile198, Tyr60, Phe343, Leu328, Tyr326 (Figuras 3-24, 3-25, 3-26).

Figura 3-23: Interacciones entre MAO-B humana y moléculas IMAO-B de referencia



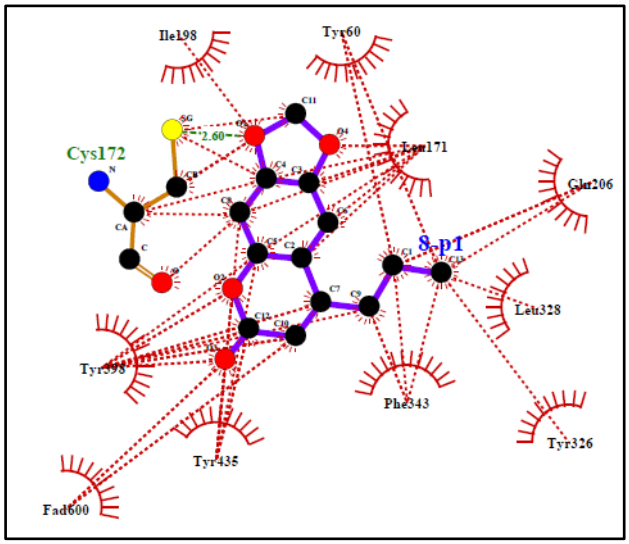
Interacciones entre MAO-B humana y (a) selegilina, (b) rasagilina. Se evidencian los residuos del sitio activo de la enzima en interacción con FAD (no se presenta la estructura). Las interacciones hidrofóbicas se muestran como un arco con radios en los cuales se destaca con líneas punteadas rojas el átomo responsable.

Figura 3-24: Interacciones entre S1 y MAO-B humana



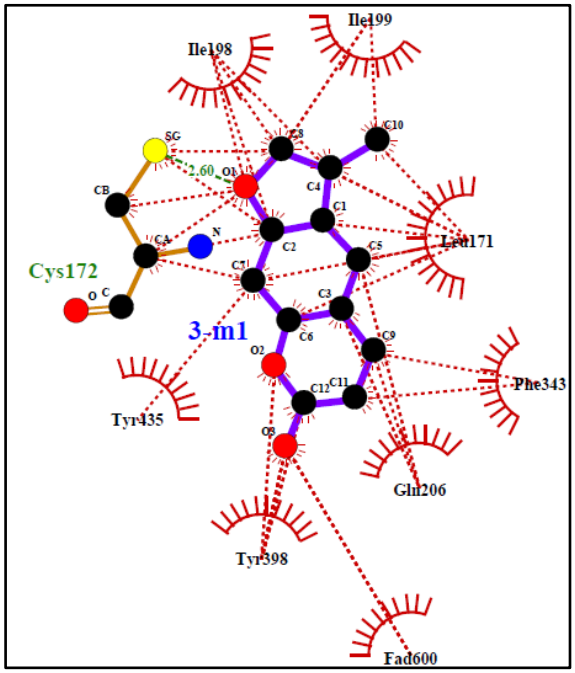
Se evidencian los residuos del sitio activo de la enzima en interacción con FAD (no se presenta la estructura). Las interacciones hidrofóbicas se muestran como un arco con radios en los cuales se destaca con líneas punteadas rojas el átomo responsable, mientras que los puentes de Hidrogeno se muestran con líneas punteadas verdes.

Figura 3-25: Interacciones entre FCS303 y MAO-B humana



Se evidencian los residuos del sitio activo de la enzima en interacción con FAD (no se presenta la estructura). Las interacciones hidrofóbicas se muestran como un arco con radios en los cuales se destaca con líneas punteadas rojas el átomo responsable, mientras que los puentes de Hidrogeno se muestran con líneas punteadas verdes.

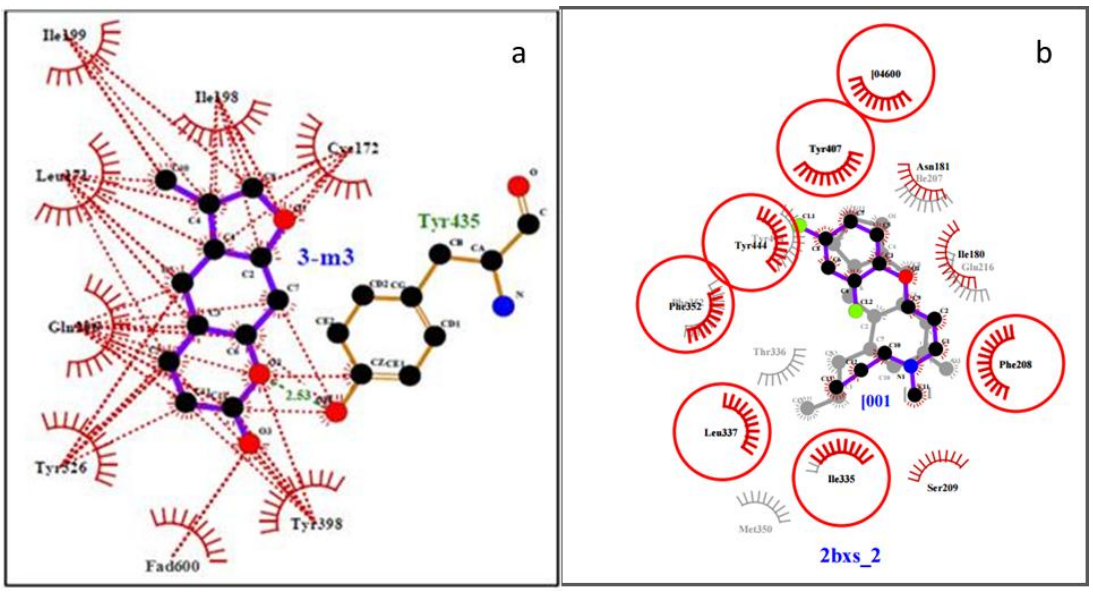
Figura 3-26: Interacciones entre FCS005 y MAO-B humana



Se evidencian los residuos del sitio activo de la enzima en interacción con FAD (no se presenta la estructura). Las interacciones hidrofóbicas se muestran como un arco con radios en los cuales se destaca con líneas punteadas rojas el átomo responsable, mientras que los puentes de Hidrogeno se muestran con líneas punteadas verdes.

Adicionalmente, se desarrolló el acoplamiento molecular entre MAO-B de ratón y los compuestos que mostraron mejor respuesta en los modelos *in vivo*. La molécula FCS005 presentó las mismas interacciones que se observaron con MAO-B humana, la única diferencia es que en cuatro poses, de las cinco calculadas, la interacción con Cys172 se identificó de tipo hidrofóbica y solo una pose se muestra interacción tipo puente de hidrógeno, al igual que la molécula FSC303 (Figura 3-27).

Figura 3-27: Interacciones entre MAO-B de ratón y los compuestos FCS005 Y FCS303



Interacciones de los compuestos FCS005 (a) y FCS303 (b) con la enzima MAO-B de ratón. Se evidencian los residuos del sitio activo de la enzima en interacción con FAD (no se presenta la estructura). Las interacciones hidrofóbicas se muestran como un arco con radios en los cuales se destaca con líneas punteadas rojas el átomo responsable, mientras que los puentes de hidrogeno se muestran con líneas punteadas verdes.

El cálculo de las energías de interacción entre MAO-B humana y de ratón con los sustratos naturales, compuestos IMAO-B reconocidos, y con las moléculas de estudio se presentan en las Tablas 3-1 y 3-2. Se aprecia que en todos los casos los valores de energía son negativos (termodinámicamente muy favorables), lo que sugiere una alta estabilidad de la interacción. De esta forma cuando se comparan las energías totales calculadas para dopamina (rango de -86.17 a -80.98 KJ/mol) y -2-feniletilamina (-74.69 a -63.93 KJ/mol) (Tabla 3-1) con las obtenidas con las moléculas IMAO-B comerciales y de estudio se destacan las siguientes características:

Rasagilina y selegilina mostraron valores de energía más negativos en el rango de -107.29 a -92.17 y -105.26 a -91.10 KJ/mol respectivamente, lo anterior explica la actividad inhibitoria comprobada experimentalmente y evidencia que la interacción es aún más favorable que la de los sustratos naturales.

Mientras que el compuesto S1 mostro valores en el rango -76.62 a -71.38 KJ/mol, cercanos a los valores obtenidos para -2-feniletilamina que se sabe interactúa con MAO-B, pero no es su principal sustrato.

De forma particular se observa que las energías totales para los compuestos FCS005 y FCS303 fueron notablemente más bajas (-116.12 a -109.98 y -133.75 a -124.41 KJ/mol respectivamente) que dopamina el sustrato natural de MAO-B. Lo anterior permite sugerir que la interacción entre la enzima y cada uno de estos compuestos es altamente favorable. Cuando se comparan las energías de interacción con la enzima de ratón se observa la misma tendencia en el comportamiento que con la enzima humana, a excepción de selegilina que mostró valores, no más altos sino, cercanos a los de dopamina.

Tabla 3-1: Energías de interacción de análogos cumarínicos con MAO-B humana

Moléculas	Poses				
	00	01	02	03	04
S1	-76,62	-75,62	-73,47	-73,48	-71,38
FCS005	-116,12	-114,09	-113,95	-112,90	-109,98
FCS303	-133,75	-130,86	-129,21	-125,92	-124,41
S3	-93,75	-93,05	-91,13	-86,36	-85,64
S11	-84,90	-82,81	-79,32	-81,25	-80,53
Dopamina	-82,78	-86,17	-80,98	-83,52	-84,50
2- feniletilamina	-74,69	-64,40	-63,93	-64,73	-64,71
Selegilina	-105,23	-99,35	-95,42	-94,85	-91,10
Rasagilina	-107,29	-98,62	-96,97	-98,72	-92,17

Energías de interacción en kJ/mol

Tabla 3-2: Energías de interacción de análogos cumarínicos con MAO-B de ratón

Moléculas	Poses				
	00	01	02	03	04
S1	-55,53	-53,37	-52,58	-51,59	-52,28
FCS005	-74,07	-65,35	-64,30	-64,45	
FCS303	-82,35	-70,45	-70,85	-62,57	-58,47
S3	-63,66	-62,63	-55,78	-57,21	-54,40
S11	-63,68	-62,65	-60,02	-55,02	-57,62
Dopamina	-62,39	-66,16	-60,88	-60,97	-59,79
2- feniletilamina	-59,77	-61,80	-56,15	-51,42	-49,92
Selegilina	-66,35	-64,95	-58,98	-56,51	-54,51
Rasagilina	-72,45	-66,87	-62,66	-67,33	-64,29

Energías de interacción en kJ/mol

3.3 Discusión

En este estudio se buscó ahondar en el conocimiento farmacológico de tipo antiparkinsoniano de los compuestos cumarínicos inhibidores selectivos de MAO-B, obtenidos por síntesis: 3-metil-7H-furo[3,2-g]cromen-7-ona (FCS005), 8-propil-6H-[1,3]dioxolo[4,5-g]cromen-6-ona (FCS303), 7-metoxicumarina (S_3) y 6-metilcumarina (S_{11}) y de la cumarina (S_1)).

Los compuestos IMAO-B que presentaron posibles efectos antiparkinsonianos en modelo de reserpina fueron S1, FCS005 y FCS303. En el modelo de potenciación de LD/CD, FCS005 y FCS303 mostraron efectos favorables, mientras que S1 presentó una tendencia. Lo anterior sugiere que FCS005 y FCS303 podrían controlar síntomas tanto en monoterapia como en asociación con LD/CD y S1 sería el menos efectivo en asociación. En lo referente a las propiedades protectoras, evaluadas en el modelo de rotenona, solo FCS005 y FCS303 las presentaron, por tanto, estos compuestos se perfilan como los más promisorios del estudio porque además de mejorar los signos motores tienen propiedades neuroprotectoras y no presentaron citotoxicidad sobre neuroblastoma humano, ni toxicidad aguda relevante.

Inicialmente se evaluaron todos los compuestos en el modelo de reserpina, teniendo en cuenta que, los efectos de este agente sobre la actividad locomotora espontanea se emplean frecuentemente como un modelo de la perturbación motora propia de la enfermedad de Parkinson. Varios fármacos comercializados en la actualidad, en sus etapas de evaluación farmacológica, presentaron mejoramiento de la alteración motora inducida por reserpina, lo que sugiere que este modelo mostró buen prospecto y validez predictiva (Tadaiesky *et al.*, 2006; Fisher *et al.*, 2000; Teixeira *et al.*, 2008). Se evaluó el síndrome de hipocinesia en ratones porque parece ser el que mejor representa la enfermedad de Parkinson en este modelo animal (Tadaiesky *et al.*, 2006; Fisher *et al.*, 2000).

En el modelo de reserpina, los compuestos cumarínicos inhibidores selectivos de MAO-B, FCS005, FCS303 y S1, lograron la reversión de la hipocinesia. 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 (Philippens, 2008; Matos *et al.*, 2013). Los inhibidores de MAO evitan la degradación enzimática de dopamina a través de la monoamino oxidasa, elevando las concentraciones reducidas de dopamina (Foley *et al.*, 2000), la cual actúa sobre receptores post-sinapticos D1 y D2 que controlan el movimiento (Fisher *et al.*, 2000), lo anterior podría dar explicación a la reversión de la hipocinesia que se observó.

Estos resultados sugieren que FCS005, FCS303 y S1 podrían eventualmente retrasar el intervalo de tiempo que transcurre desde el diagnóstico de la enfermedad de Parkinson hasta el empleo de L-DOPA (Shimazu *et al.*, 2003). Esta es una propiedad interesante, ya que, en la actualidad los inhibidores de MAO-B, tales como selegilina y rasagilina, son agentes eficaces en el tratamiento de los síntomas de la enfermedad en estadio temprano (Finberg, 2014).

Kannari y col. reportaron que la reserpina produce una disminución gradual de los niveles de dopamina hasta llegar a un 4% de los niveles basales, reducción que persiste por más de 6 horas. También observaron aumento en los niveles de los metabolitos DOPAC y HVA 253±34% y 180±13% de los valores basales, respectivamente. Estos resultados pueden

reflejar la liberación de DA inducida por reserpina de los sitios de almacenamiento vesiculares en el citoplasma, donde DA se metaboliza inmediatamente por acción de abundantes enzimas disponibles (Kannari *et al.*, 2000). Al administrar compuestos IMAO-B podrían ayudar en cierta medida a conservar los niveles de DA, dejándola disponible en el citoplasma, para una liberación no vesicular mediada por el transportador de dopamina (DAT), que opera en sentido inverso liberando dopamina a la región del cuerpo estriado (Sotnikova *et al.*, 2004; Kitanaka J, *et al.* 2005; Kannari *et al.*, 2000; Bahena-Trujillo *et al.*, 2000). Sin embargo, el aporte por esta vía podría no ser muy significativo, dado que las neuronas dopaminérgicas en el estriado contienen relativamente poca MAO-B (Jenner, 2012). MAO-B se expresa en mayor medida en el estriado y en general en todo el cerebro. En el estudio post mortem de pacientes que se trataron con selegilina se reportó aumento en los niveles de DA en núcleo caudado, globo pálido, putamen y sustancia negra. Estos hallazgos sugieren que la DA liberada de neuronas dopaminérgicas puede ser captada por neuronas no dopaminérgicas locales y metabolizada por MAO-B (Goldstein *et al*., 2014), probablemente es por la inhibición de este metabolismo que los compuestos de estudio ejercen, principalmente, sus efectos.

La reserpina promueve el catabolismo oxidativo por parte de MAO (Teixeira *et al*., 2008). Se ha reportado que este alcaloide induce un aumento de la relación glutatión oxidado / glutatión reducido (GSSG / GSH) en el cuerpo estriado (Abílio *et al.*, 2003, Bilska *et al*., 2007). Esta relación se propuso como un índice sensible de estrés oxidativo (Tadaiesky *et al*., 2006). En estudios posmortem de cerebros con enfermedad de Parkinson se encontraron niveles bajos de GSH, específicamente en la sustancia negra (Smeyne *et al*., 2013). Los análogos cumarinicos IMAO-B, evaluados en este trabajo, disminuyen el catabolismo oxidativo y podrían 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 hidrogeno, el cual por interacción con metales, especialmente hierro, produce radicales libres (Youdim *et al.*, 2005, Teixeira *et al*., 2008).

En la evaluación de la posible potenciación por parte de las moléculas del efecto de LD en ratones tratados con reserpina, FCS005 y FCS303 (100 y 200 mg/kg, respectivamente), presentaron respuesta significativa. Esto sugiere que estos nuevos compuestos actúan

como IMAO-B *in vivo* a las dosis probadas, inhibiendo el metabolismo de DA y por tanto presentando un aumento en el tiempo de residencia de DA en la hendidura sináptica nigroestriatal (Matos *et al*., 2013), lo que se ve reflejado en la reversión de la hipocinesia.

Kannari y col. estudiaron la influencia de L-DOPA y reserpina en los niveles de dopamina extracelular (DA) en el cuerpo estriado de ratas y encontraron que la reducción en los niveles de DA que causa la reserpina, persiste incluso después de administrar L-DOPA, mientras que los niveles de los metabolitos presentan dos picos, uno después de la administración de reserpina (DOPAC 253±14% y HVA 180±13%) y otro luego de la administración de L-DOPA (DOPAC 356±20% y HVA 298±35%) (Kannari *et al*., 2000). Esto es consistente con un metabolismo activo tanto de DA endógena como de la derivada de L-DOPA. Sin embargo, se podría pensar que los compuestos IMAO-B intervienen en dicho metabolismo disminuyendo los niveles de metabolitos y conservando los de DA extracelular tanto endógena como los aportados de forma exógena.

L-DOPA se emplea para la mejoría de los síntomas de la enfermedad, al menos temporalmente, mediante la compensación de la disminución de los niveles de dopamina (Foley *et al*, 2000), el inconveniente es que con el tiempo el uso frecuente causa movimientos espasmódicos excesivos (disquinesia) y otros efectos secundarios (Philippens, 2008; Emborg, 2004). Para reducir dichos efectos, se emplean técnicas que tienden a disminuir la dosis de L-DOPA. En la actualidad la administración de L-DOPA y la terapia adyuvante con inhibidores selectivo MAO-B, se considera útil para este propósito (Shimazu *et al.*, 2003). En este aspecto, FCS005 y FCS303 mostraron buena respuesta teniendo en cuenta que a pesar de emplear una dosis reducida de L-DOPA, que por sí sola no tenía efecto, en el modelo de potenciación los animales presentaron reversión de la hipocinesia.

La respuesta del compuesto FCS303, en las dosis ensayadas, fue ligeramente superior a los resultados obtenidos en el modelo de reserpina, siendo significativas sus respuestas en los dos tiempos de evaluación, lo que sugiere que a las dosis ensayadas 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 (Finberg, 2014).

Por otra parte, es importante tener en cuenta que la administración de S1, FCS005 y FCS303 en dosis de 50, 100 y 200 mg / kg, no modificaron la actividad locomotora en ratones no tratados con reserpina, lo que sugiere que estos agentes atenúan, específicamente la hipolocomoción inducida por reserpina (Tadaiesky *et al.*, 2006). Todos los animales mostraron, en todos los tratamientos incluido el control, disminución de la actividad motora a las 24h, esto coincide con lo reportado en varios estudios donde se evidencia que la exposición repetida al campo abierto produce habituación y por tanto disminución en la conducta exploratoria inducida por la novedad (Haleem *et al.*, 2015; Brenes *et al.*, 2009; Deacon *et al.*, 2009). En estos ratones tampoco se observó estereotipias, lo que indica que los compuestos IMAO-B no la inducen.

Por otra parte, 2-feniletilamina (FEA) es una amina endógena que se ha encontrado en trazas en cerebros de mamíferos, tiene una estructura similar a la de anfetamina y cuando se administra en dosis altas induce respuestas parecidas tales como hiperlocomoción y estereotipias (Kitanaka J *et al.*, 2005; Dourish, 1982). En este modelo S1, FCS005 y 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 podría extenderse (Kitanaka J *et al.*, 2005).

La estereotipia que presentó mayor frecuencia y en la cual S1, FCS005, FCS303 y selegilina fueron significativamente diferentes, fue olfateo continuo, esto coincide con la literatura donde se sugiere que el aumento de ésta estereotipia inducida por FEA, se da bajo la influencia y el grado de inhibición de la MAO-B. Adicionalmente, se tiene evidencia de que a dosis crecientes de selegilina se potencia el olfateo inducido por FEA en ratas (Kitanaka J *et al.*, 2005).

Selegilina mostró aumento significativo de la locomoción, lo que en parte puede deberse a que se metaboliza a metanfetamina y desmetil-deprenil (Finberg, 2014). Se ha reportado que la metanfetamina causa comportamientos específicos en ratones tales como hiperlocomoción (Kitanaka N, 2005). Otras estereotipias que presentaron diferencia significativa en los tratamientos FCS303, selegilina y FCS005, fueron levantamientos, movimiento de cabeza y acicalamiento vigoroso, respectivamente. Se sugiere que los levantamientos inducidos por FEA se producen por estimulación dopaminérgica, el acicalamiento vigoroso envuelve mecanismos de catecolaminas y serotonina y los movimientos de cabeza son asociados con esta última monoamina (Dourish, 1982). Lo anterior coincide con lo que han demostrado estudios *in vivo* e *in vitro* que indican que 2-feniletilamina inhibe la captación y la liberación de varias aminas neurotransmisoras, incluyendo dopamina (Youdim *et al.*, 2002).

En el análisis del ensayo de 2-feniletilamina a través del tiempo se observó que selegilina presenta un ligero comportamiento en tres fases, características de FEA (inicio, meseta y recuperación) (Kitanaka J *et al.*, 2005; Dourish 1982), mientras que en los compuestos no son tan claras las tres fases, probablemente porque la dosis de FEA empleada (23 mg/kg) fue menor a la utilizada en otros estudios (75 y 100 mg/kg) (Kitanaka J *et al.*, 2005; Dourish 1982).

Los resultados del estudio dosis respuesta, tanto del modelo de FEA como del resto de modelos *in vivo* mostraron que casi todos los compuestos, especialmente FCS005, presentaron efectos en dosis de 100 mg/kg, sin embargo, al aumentar la dosis a 200 mg/kg no se observó el efecto. Esto coincide con comportamientos reportados en la literatura para inhibidores de monoamino oxidasa B selectivos. Un ensayo con rasagilina, mostró que a la dosis clínica normal de 1 mg al día, hubo disminución de la progresión de la enfermedad, pero este efecto no fue estadísticamente significativo en la dosis más alta de 2 mg diarios. Otro caso es el de Safinamida, que a dosis de 100 mg produjo mejoramiento significativo a nivel motor y en la calidad de vida, pero no se vio lo mismo a dosis de 200 mg (Finberg, 2014). Este comportamiento de los IMAO-B podría deberse al hecho de que en altas concentraciones estos compuestos pierden selectividad y por tanto inhiben las dos isoformas de MAO A y B (Finberg & Youdim, 2002; Finberg, 2014).

Los compuestos FCS005 y FCS303 presentaron mejor respuesta en los modelos *in vivo,* incluso en algunos casos mostraron un efecto mayor que selegilina, especialmente FCS005 en el modelo de reserpina y LD/CD, a las 24 horas y en el modelo de FEA del minuto 40 al 60. Esto podría atribuirse a parámetros farmacocinéticos tales como, absorción, tiempo de vida media, distribución, etc. La evaluación teórica de las propiedades moleculares con importancia farmacocinética de estas moléculas indicó que los análogos cumarínicos poseen valores de log P (coeficiente de reparto octanol/agua) compatibles con los requeridos para atravesar las membranas (Matos et al., 2013) y dentro del rango recomendado para permeabilidad cerebral 1-3 (Clark, 2003). El valor de TPSA (área de superficie polar) también se encuentra por debajo de límite 60 a 70 $Å^2$ sugerido para una buena permeación en cerebro (Clark, 2003). Además, no presentaron violaciones de la regla de Lipinski. Lo anterior sugiere que FCS005 y FCS303 pueden atravesar membranas celulares y también la barrera hematoencefálica, lo que apoya los resultados obtenidos *in vivo* y el potencial de estas moléculas.

Los resultados en modelos *in vivo* y el análisis teórico de las propiedades con importancia farmacocinética son consistentes con los resultados obtenidos en el acoplamiento molecular (docking) desarrollado para MAO-B humana y de ratón, teniendo en cuenta que al comparar las secuencias de estas dos enzimas se encontró un 89% de identidad y un sitio activo altamente conservado en el que se presentan el mismo tipo de residuos responsables de las interacciones con sustratos y co-sustratos. Lo anterior sugiere que la inhibición presentada en ratón puede ser similar a la mostrada en MAO B humana.

Los resultados del acoplamiento molecular (docking) entre MAO-B humana y las moléculas de estudio, mostraron una probable interacción en el sitio activo de la enzima, que puede causar la inhibición de la misma, lo cual corroboró los resultados obtenidos en estudios previos *in vitro* de S1, S3, S11, FCSS005 y FCS303, donde estos compuestos mostraron tener propiedades inhibidoras de MAO-B humana (Vergel, 2010a).

La interacción de la enzima con rasagilina y selegilina (inhibidores de MAO-B de referencia), concuerda por lo reportado en la literatura, donde se indica que se unen al sitio activo por medio del grupo propargilamino y la unión se realiza mediante enlace covalente a FAD, específicamente al N-5 de flavina (Jenner, 2012; Finberg, 2014). Los compuestos

S1, FCS005 y FCS303 también presentaron interacción hidrofóbica con FAD, mientras que con DA se establece un puente de hidrógeno. Lo anterior es interesante porque los compuestos presentan interacción en el mismo sitio que los IMAO-B de referencia.

La simulación por docking de los compuestos FCS303 y FCS005, concuerdan con estudios similares de cumarinas (Matos *et al.*, 2013; Matos *et al.*, 2015). Uno de los estudios presentó un análogo cumarínico con actividad *in vivo* en modelo de ratones reserpinizados más LD/CD, el cual evidenció interacción de los residuos de aminoácidos Leu171, Gln206, Tyr398, Ile198. Los compuestos del presente estudio también mostraron interacción con estos aminoácidos y adicionalmente FCS005 con Ile199 y FCS303 con Tyr326. Otro estudio de una serie de cumarinas expuso un modo de unión hipotético en el cual el núcleo de cumarina se orienta hacia el cofactor FAD y muestra buena disponibilidad para establecer un puente de hidrógeno con el residuo Cys172 (Matos *et al.*, 2013). En el acoplamiento molecular de los compuestos cumarinicos S1, FCS005 y FCS303, también se evidenció que el núcleo de cumarina interaccionó con FAD y formó puente de hidrógeno con Cys172 para los análogos FCS005 y FCS303, mientras con S1 la interacción fue hidrofóbica.

Al comparar las interacciones entre FCS005 (compuesto que presentó mejores efectos en los modelos *in vivo*), con MAO-B humana y de ratón, se encontró una gran similitud dado que presentaron interacciones con los mismos residuos de aminoácidos. La única diferencia que presenta es que en tres poses de las cuatro reportadas, para ratón, el residuo Cys172 muestra interacción hidrofóbica y solo en una pose la interacción es mediante puente de hidrógeno, esto depende de la cercanía que presente el azufre del aminoácido con el oxígeno de la molécula. Esta diferencia con Cys172 también la presentó el compuesto FCS303.

Las energías de interacción calculadas evidenciaron que se conservó la misma tendencia tanto en humano como en ratón, los valores de energía fueron negativos lo que indica favorabilidad en las interacciones. El sustrato natural especifico de MAO-B, 2-feniletilamina (Finber, 2014), mostró menos favorabilidad de interacción que dopamina (-83,6 kJ/mol), ya que la energía fue más alta (-66,5kJ/mol), lo mismo ocurrió con el compuesto S1 (-74,1 kJ/mol).

Selegilina y rasagilina presentaron energías más bajas que dopamina (-97,1 y -98,8 kJ/mol, respectivamente), esto sugiere que la interacción de estos compuestos con la enzima es más favorable que con el sustrato natural dopamina, lo que coincide con la literatura donde se reporta que selegilina y rasagilina son inhibidores irreversibles de MAO-B (Finberg, 2014; Youdim *et al.*, 2004). Los valores de energía para el compuesto FCS303 son los más bajos (-128,8 kJ/mol), en comparación con los sustratos naturales y con los IMAO-B de referencia. El compuesto FCS005 (-113,4 kJ/mol) presenta valores cercanos, lo que sugiere que existe una interacción más estable entre estos compuestos y MAO-B, en comparación con los demás sustratos estudiados. Lo anterior es interesante dado que es consistente con los resultados obtenidos en los modelos *in vivo*.

4. Estudios *in vitro*

4.1 Metodología

4.1.1 Cultivo celular

Para los ensayos *in vitro* se emplearon células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, obtenidas del American Type Culture Collection (ATCC) que se encontraban en stock en el laboratorio de neurobioquímica de la Pontificia Universidad Javeriana. Las células se mantuvieron en DMEM-F12 (medio mínimo esencial modificado por Dubelco, con mezcla de nutrientes F12), suplementado con 10% de SFB (suero fetal bovino), en cajas de cultivo estériles de 75 cm^2, e incubadas en condiciones estándar (5% CO_2 en el aire, 37°C y 100% de humedad relativa).

Los cultivos con 90% de confluencia se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y luego se trataron con solución de tripsina al 0,025% y EDTA al 0,03%, durante 3 minutos, a 37°C, posteriormente se inactivó la tripsina con un volumen igual de DMEM-F12- SFB10%. Al final se obtuvo una suspensión celular que se contó en cámara de Neubauer mediante el método de exclusión con azul de tripano.

Las células se sembraron en placas de fondo plano de 96 pozos a una densidad de 23000 células/pozo y se incubadas durante 24 horas para permitir la adhesión celular a la superficie del pozo. En estas condiciones, las células se emplearon para evaluar el efecto dosis respuesta de los compuestos cumarínicos sobre la viabilidad, para identificar el efecto citoprotector de las moléculas en un modelo celular de la enfermedad de Parkinson inducido por rotenona y para la cuantificación de radicales superóxido.

4.1.2 Tratamientos

Los compuestos a evaluar se disolvieron en DMSO (dimetilsulfóxido) y luego en DMEM-F12 hasta alcanzar las concentraciones necesarias para cada ensayo, teniendo en cuenta que el contenido final de DMSO en el medio nunca superó 0.15%. Adicionalmente, se tuvieron en cuenta los siguientes controles: control de vehículo, control de rotenona (50 µM) y control de selegilina (200 µM).

4.1.3 Determinación del efecto dosis respuesta de los IMAO-B sobre la viabilidad

Se evaluaron los tratamientos S1, S3, S11, FCS005 y FCS303 en concentraciones de 12, 25, 50, 100 y 200 µM por triplicado durante 24 h. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se extrajo el medio de cultivo con el tratamiento y se lavaron los pozos con PBS, al final se determinó el porcentaje de viabilidad celular en cada tratamiento mediante la técnica de resazurina. Para lo cual se adicionaron 100 µL por pozo de medio DMEM-F12 sin suplementar con resazurina al 25% v/v (partiendo de una solución inicial de 44 µM) y se incubó durante 4 horas en condiciones estándar. Cumplido el tiempo de incubación las placas se leyeron a una longitud de onda de excitación 535 nm y 595 nm de emisión en un lector de placas Dynex.

4.1.4 Evaluación de efectos protectores en citotoxicidad inducida por rotenona

Para evaluar los efectos protectores de los compuestos cumarínicos en las células SHSY5Y, se estableció primero la concentración de rotenona a emplear. Para lo cual se evaluó la viabilidad celular a las siguientes concentraciones 10, 20, 30, 40 y 50 µM. Posteriormente, se evaluaron *in vitro* los compuestos S1, FCS303 y FCS005 los cuales presentaron buena respuesta en el modelo *in vivo* de reserpina. Se procedió a tratar previamente por 24h con los compuestos en las siguientes concentraciones: S1 y FCS005 (25, 50 y 100 µM) y FCS303 (5, 25, 50 y 100 µM). Transcurrido este tiempo se retiraron los tratamientos, se lavaron los pozos con PBS y se incubaron con rotenona 50 µM por 24 h. Al final se procedió a evaluar la viabilidad mediante el método de resazurina descrito anteriormente.

4.1.5 Cuantificación de la producción de anión superóxido mediante citometría de flujo

La rotenona estimula la producción del radical superóxido en las células SH-SY5Y, dicho radical con la dihidroxietidina (DHE), forma un producto rojo fosforescente que es cuantificado (Seetapun et al., 2013).

Para este ensayo las células SH-SY5Y se sembraron en placas de 24 pozos, a una densidad de 100000 células pozo. Las placas se incubaron 24 horas en condiciones estándar para permitir la adhesión celular. Posteriormente se trataron con FCS005 (50 y 100 µM) y FCS303 (5 y 25µM) y trascurridas 24 horas se lavaron con PBS y se agregó solución de tripsina al 0,025% y EDTA al 0,03% por 3 minutos, luego se neutralizó el efecto de la enzima con DMEM/F12 suplementado con 10% de SFB. El volumen de cada pozo se llevó a un microtubo y se adicionó dihidroetidina (marcador que identificó la producción de anión O2), para llegar a una concentración final de 2,5 µM y se llevó a la incubadora por 30 minutos. Por último se adicionó rotenona hasta alcanzar una concentración final de 50µM y se incubó por una hora, luego se centrifugaron los microtubos a 5000 rpm durante 5 minutos, posteriormente se desechó el sobrenadante y se resuspendió en 300 µL de DMEM/F12 + 10% de SFB. Cada microtubo se llevó al vortex para conseguir una solución homogénea de células y se leyó la fluorescencia mediante citometría de flujo utilizando filtro de excitación 488nm y 630nm de emisión.

4.1.6 Análisis de datos

Los resultados de los estudios *in vitro* se expresaron en términos de promedio $\pm$ el error medio estándar (ems) y se analizaron por medio de un análisis de varianza de una vía o de dos dependiendo del caso. Para determinar el o los tratamientos responsables de las diferencias significativas se aplicó la prueba de diferencias múltiples de Tukey. 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 los programas: Excel^{R}, GraphPad Prism (V 5.0) y Stata 12. El nivel de significancia estadística adoptado fue $P<0.05$

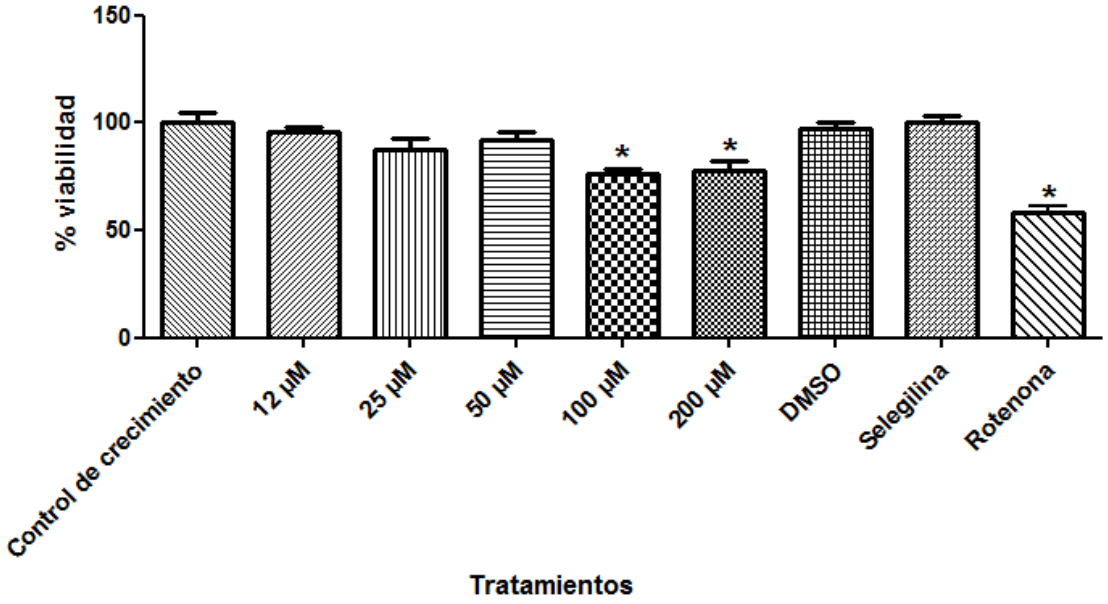
4.2 Resultados

4.2.1 Citotoxicidad

Para estudiar la citotoxicidad de los análogos cumarinicos IMAO-B en la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y por 24 horas, se empleó el método de resazurina, el cual evaluó la viabilidad celular y la integridad mitocondrial por la actividad de oxidoreductasas presentes en las mitocondrias de las células viables, después de someter las células a los diferentes tratamientos en concentraciones de 12; 25; 50; 100 y 200 µM. Como control positivo se utilizó rotenona (50µM) un potente inhibidor del complejo I mitocondrial (Li, 2003) evidenciándose una diminución de la viabilidad celular en un 42% aproximadamente. Otros controles empleados fueron los tratamientos con selegilina (patrón de referencia IMAO-B), el control de vehículo (DMSO) y el control sin tratamiento.

Los resultados obtenidos para el compuesto S3 (Figura 4-1) muestran un pequeño efecto dosis-respuesta, acentuado especialmente a las concentraciones de 100 y 200 µM, en las que se disminuyó la viabilidad en un 24% y 22%, respectivamente siendo significativamente diferentes al control de crecimiento celular.

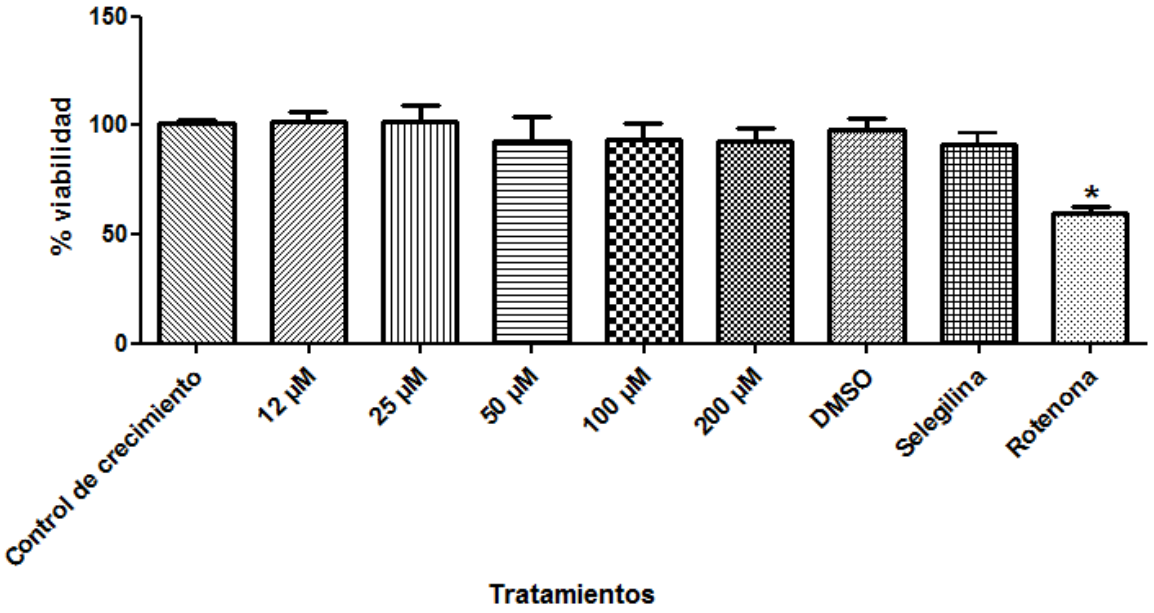
Figura 4-1: Citotoxicidad de S3 en células SH-SY5Y



Efecto sobre la viabilidad de células SH-SY5Y expuestas por 24 h a S3 (12; 25; 50; 100 y 200 µM), DMSO (0,05%) y selegilina (200 µM). * Diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control ($p<0,05$) ($n=9$).

Por otra parte, el compuesto S11 no presentó disminución de la viabilidad en ninguna de las concentraciones evaluadas (Figura 4-2).

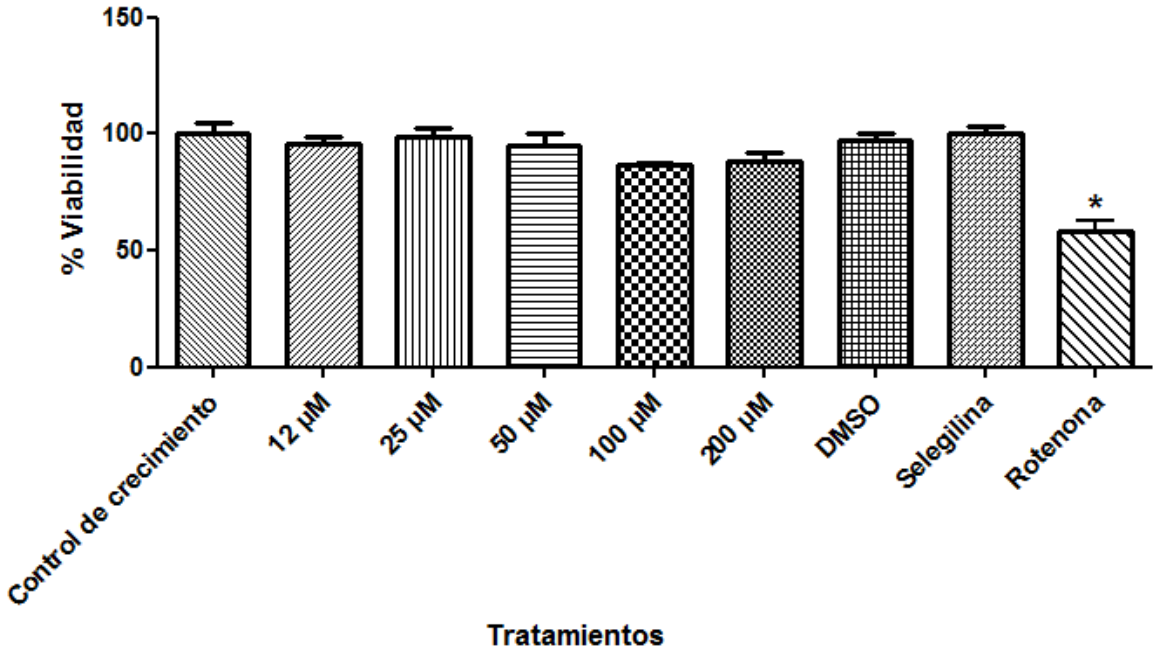
Figura 4-2: Citotoxicidad de S11 en células SH-SY5Y



Efecto sobre la viabilidad de células SH-SY5Y expuestas por 24 h a S11 (12; 25; 50; 100 y 200 µM), DMSO (0,05%), selegilina (200 µM) y rotenona (50µM). * Diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control ($p<0,05$) (n=9).

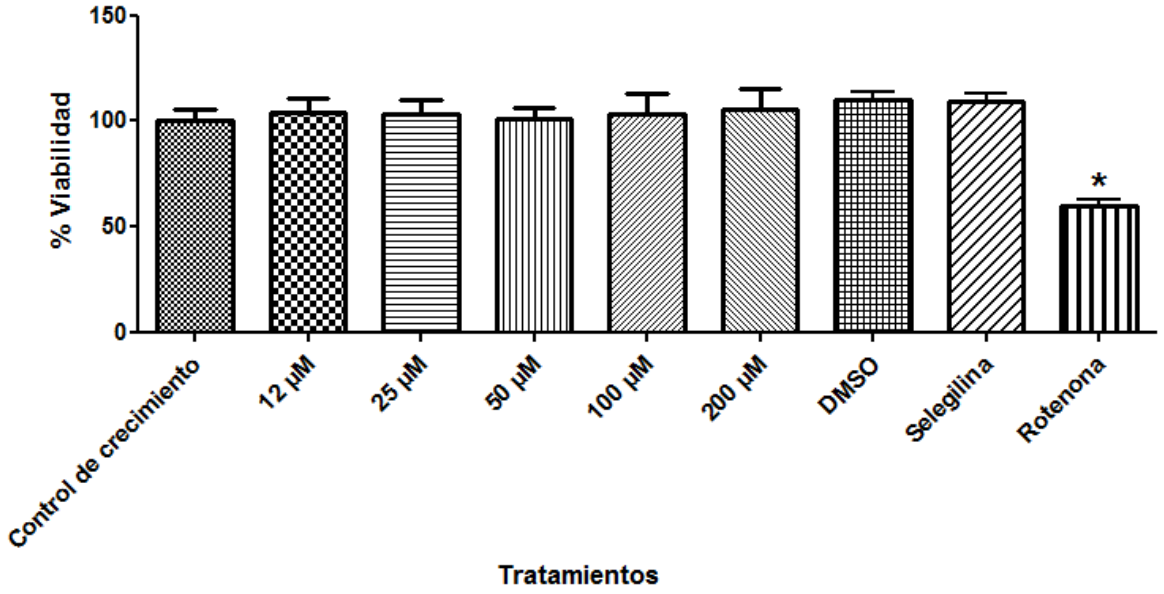
De manera interesante, los compuestos S1, FCS005 y FCS303 que fueron evaluados *in vivo* y presentaron diferencias significativas en el modelo de reserpina, no mostraron diferencia significativa con el control de crecimiento celular (Figuras 4-3, 4-4 y 4-5, respectivamente). Aunque se observaron algunas tendencias no significativas para el compuesto S1, que presentó una ligera disminución en la viabilidad en las concentraciones 100 y 200 µM y el compuesto FCS303 mostró una ligera tendencia al aumento de la viabilidad para la concentración 12 µM. Lo anterior sugiere que los compuestos S1, FCS005 y FCS303 no disminuyen la viabilidad celular a ninguna de las concentraciones evaluadas.

Figura 4-3: Citotoxicidad de S1 en células SH-SY5Y



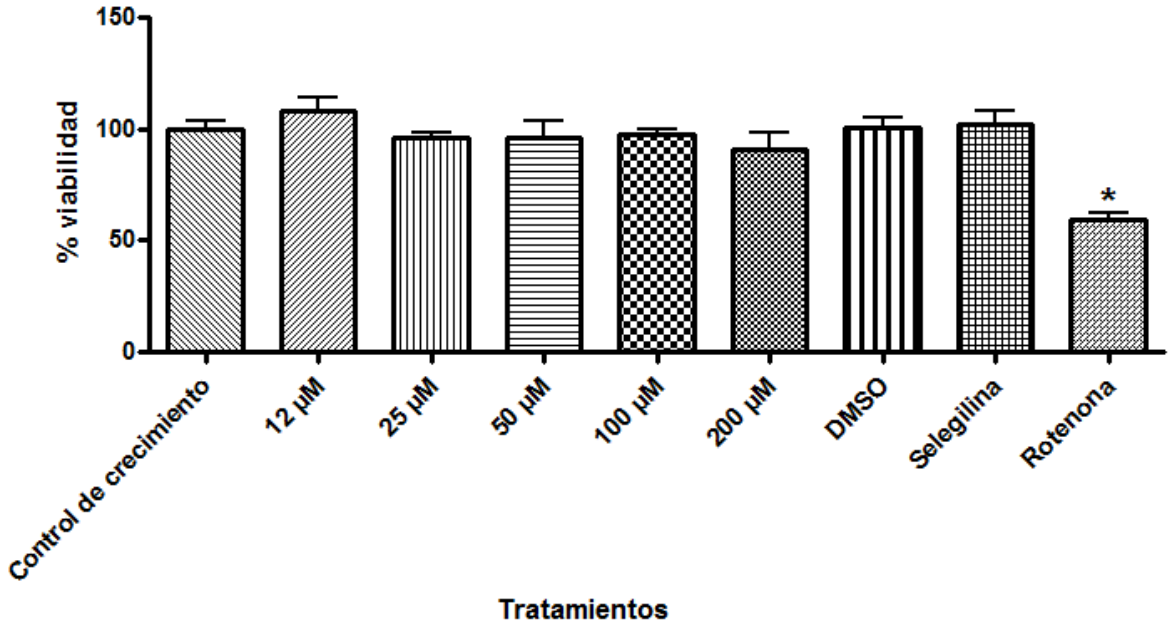
Efecto sobre la viabilidad de células SH-SY5Y expuestas por 24 h a S1 (12; 25; 50; 100 y 200 µM), DMSO (0,05%), selegilina (200 µM) y rotenona (50µM). * Diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control ($p<0,05$) (n=9)

Figura 4-4: Citotoxicidad de FCS005 en células SH-SY5Y



Efecto sobre la viabilidad de células SH-SY5Y expuestas por 24 h a FCS005 (12; 25; 50; 100 y 200 µM), DMSO (0,15%), selegilina (200 µM) y rotenona (50µM). * Diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control ($p<0,05$) (n=9)

Figura 4-5: Citotoxicidad de FCS303 en células SH-SY5Y



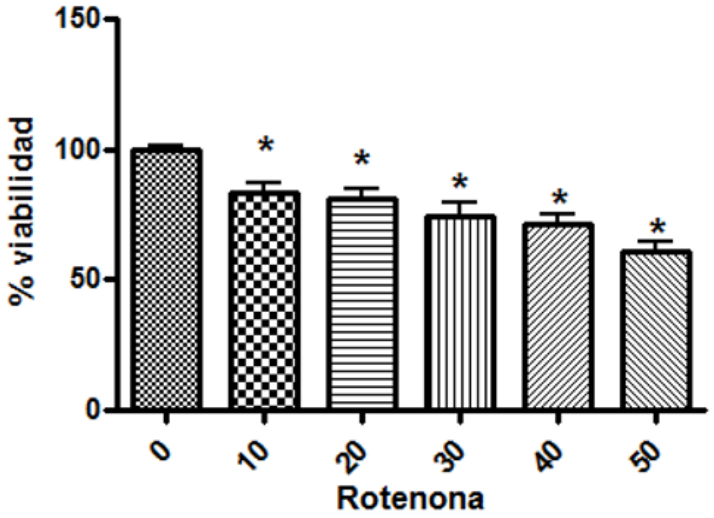
Efecto sobre la viabilidad de células SH-SY5Y expuestas por 24 h a FCS303 (12; 25; 50; 100 y 200 µM), DMSO (0,1%), selegilina (200 µM) y rotenona (50µM). * Diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control ($p<0,05$) (n=9)

4.2.2 Evaluación de efectos protectores en sobre la citotoxicidad inducida por rotenona

Se evaluaron los efectos protectores de los análogos cumarinicos sobre la toxicidad inducida por rotenona en células SH-SY5Y. Para lo cual se desarrolló un ensayo a varias concentraciones que permitió determinar la concentración de rotenona que disminuyó aproximadamente en un 42 % la viabilidad de las células (50 µM por 24 h) (Figura 4-6). Una vez establecida esta concentración las células fueron pre-tratadas con los compuestos por 24 h y luego fueron sometidas a un insulto con rotenona 50 µM por 24 h más. En las células pre-tratadas con el compuesto S1 no se observaron efectos protectores en ninguna de las dosis ensayadas (Figura 4-7). Sin embargo, en las células pre-tratadas con los compuestos FCS005 y FCS303 (Figura 4-8 y 4-9) en las mismas condiciones, se vio favorecido el mantenimiento del porcentaje de viabilidad especialmente en las concentraciones de 50 y 100 µM. Adicionalmente, no se observaron diferencias significativas en todas las concentraciones evaluadas, lo que sugiere un efecto citoprotector de estos compuestos frente al insulto con rotenona. Las células que fueron

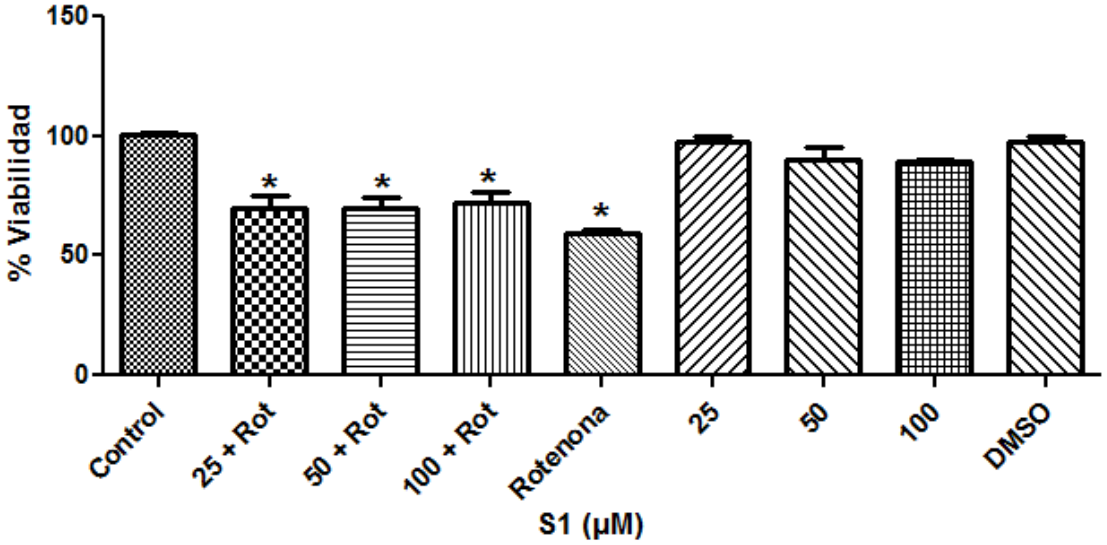
tratadas solo con las diferentes dosis de los compuestos (blancos de los compuestos) tampoco mostraron diferencias significativas frente al control, lo que evidencia que no hay efecto de los compuestos sobre la viabilidad.

Figura 4-6: Citotoxicidad de rotenona sobre células SH-SY5Y



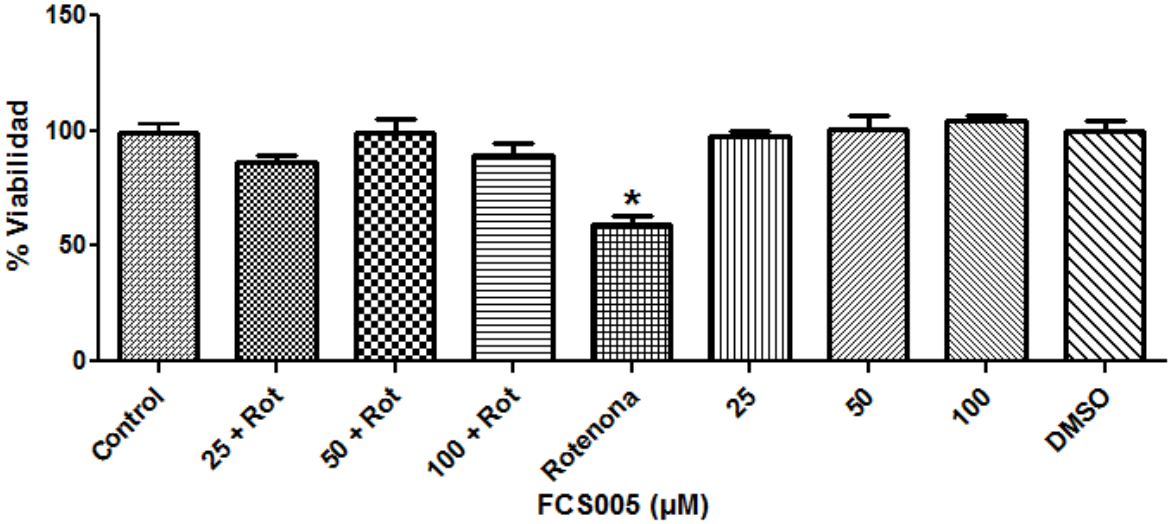
Efectos citotóxicos de rotenona (10, 20, 30, 40 y 50 µM), sobre células SH-SY5Y. Control de crecimiento celular. * Diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control ($p<0,05$).

Figura 4-7: Efectos protectores de S1 en modelo de rotenona 50 µM



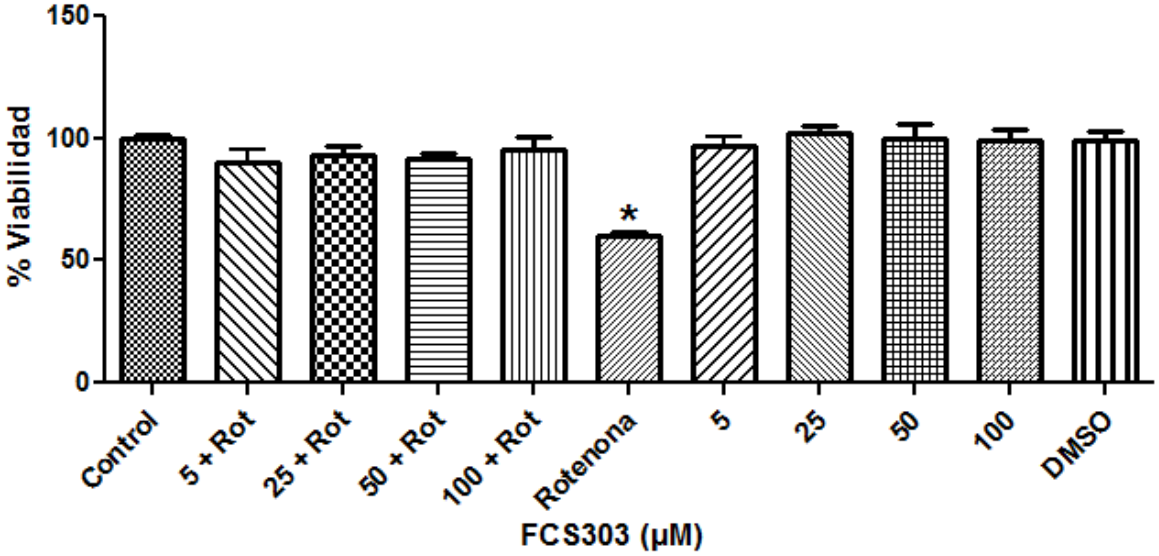
Efectos protectores de S1 (50, 100 y 200 µM), sobre células SH-SY5Y a las cuales se les induce citotoxicidad con rotenona (50 µM). Control de crecimiento celular, control de DMSO (0,15%) y control de rotenona (50 µM). * Diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control ($p<0,05$) ($n=9$)

Figura 4-8: Efectos protectores de FCS005 en modelo de rotenona 50 µM



Efectos protectores de FCS005 (50, 100 y 200 µM), sobre células SH-SY5Y a las cuales se les induce citotoxicidad con rotenona (50 µM). Control de crecimiento celular, control de DMSO (0,15%) y control de rotenona (50 µM). * Diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control (p<0,05) (n=9)

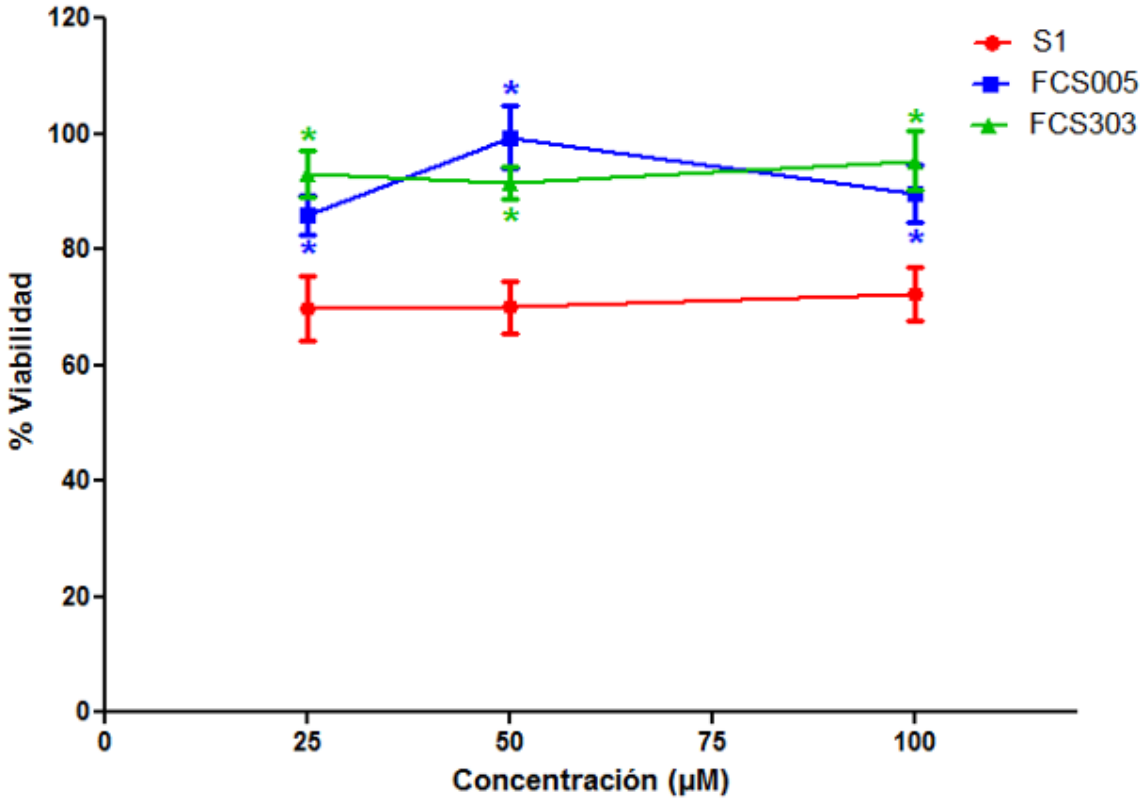
Figura 4-9: Efectos protectores de FCS005 en modelo de rotenona 50 µM



Efectos protectores de FCS303 (50, 100 y 200 µM), sobre células SH-SY5Y a las cuales se les induce citotoxicidad con rotenona (50 µM). Control de crecimiento celular, control de DMSO (0,15%) y control de rotenona (50 µM). * Diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control (p<0,05) (n=9)

Cuando se comparan las respuestas en viabilidad de los análogos cumarinicos a diferentes concentraciones, se observa que los compuestos FCS005 y FCS303 favorecieron la viabilidad celular y no presentaron un efecto dosis respuesta. Mientras que el efecto de S1 es significativamente inferior comparado con los otros dos análogos cumarínicos (Figura 4-10).

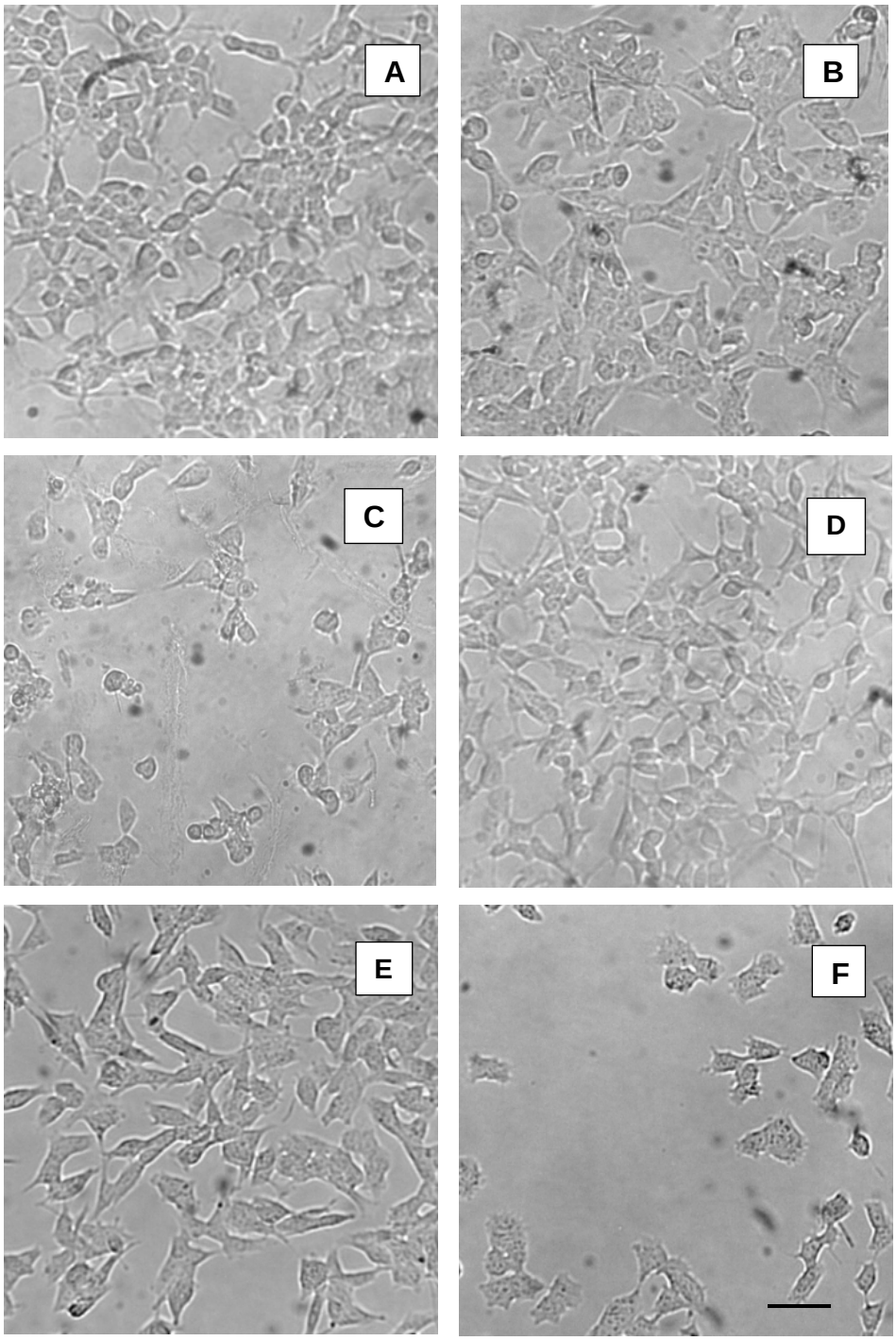
Figura 4-10: Comparación de los efectos protectores de IMAO-B



Comparación entre las respuestas de S1, FCS005 y FCS303 a diferentes concentraciones en modelo de rotenona, sobre células SH-SY5Y * Diferencia estadísticamente significativa con respecto a los tratamientos FCS005 y FCS303 ($p<0,05$)

Las células SH-SY5Y que fueron sometidas a un insulto con rotenona 50 µM observadas por microscopia de luz, previo pre-tratamiento con los análogos cumarínicos S1, FCS005 y FCS303, se presentan en la Figura 4-11. Se aprecia que estos tratamientos preservan la viabilidad, el número y la morfología celular, mientras que en las células tratadas con rotenona se afecta tanto el número de células como la morfología. Adicionalmente, no se observan diferencias en estos parámetros en las células tratadas solo con el vehículo, lo que sugiere que el DMSO no ejerce efectos deletéreos en las células.

Figura 4-11: Células SH-SY5Y pre-tratadas con IMAO-B en modelo de rotenona



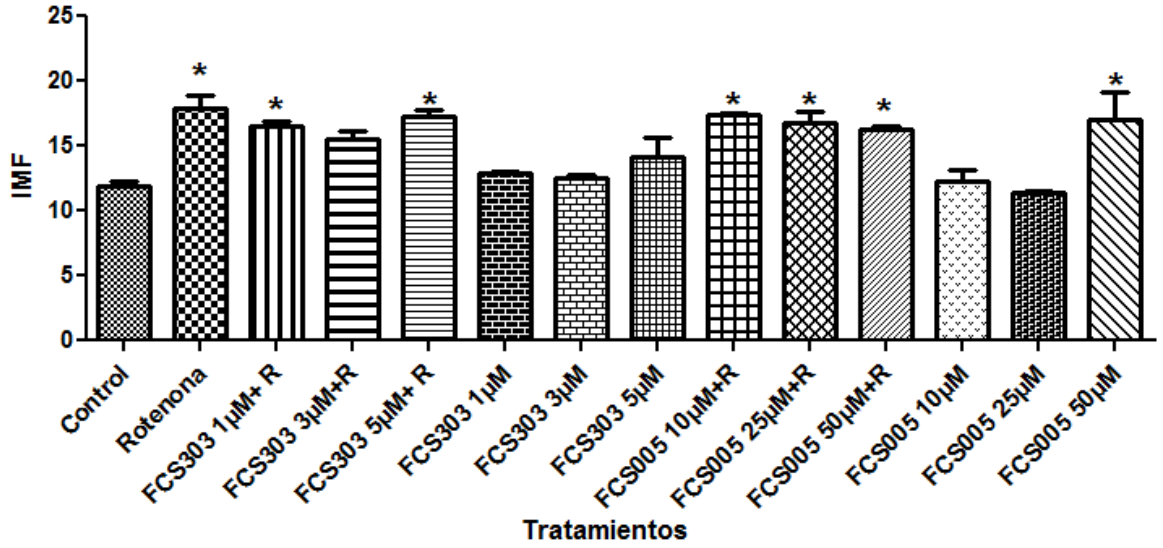
Imágenes de microscopia de luz observadas a 20X. (A) Células sin tratamiento (control). (B) Células tratadas con FCS005 50µM. (C) Células tratadas con S1 50µM. (D) Células tratadas con FCS303 50µM. (E) Células con DMSO 0,15% (control vehículo). (F) Control con rotenona 50µM. Las células se exponen durante 24 horas. Barra 50µm

4.2.3 Cuantificación de la producción de anión superóxido mediante citometría del flujo

La cuantificación de la producción del anión O_2^- se desarrolló para identificar si los compuestos cumarínicos presentan la capacidad de inactivación de estos radicales. Este parámetro se midió mediante determinación de la intensidad media de fluorescencia (IMF) por citometría de flujo, los resultados obtenidos para los diferentes tratamientos se observan en la Figura 4-12.

Los resultados muestran que los compuestos FCS005 (10 y 25 µM) y FCS303 (1, 3 y 5 µM) no aumentan la producción de radicales O_2^- en las células SH-SY5Y por lo que no se observan diferencias estadísticas con el control de células. Sin embargo, en ninguna de las concentraciones evaluadas se observa efecto en la disminución o inactivación de radicales O_2^- cuando las células son sometidas frente al insulto con rotenona.

Figura 4-12: Producción radical superóxido



Efectos de FCS005 (10, 25, 50 µM) y de FCS303 (1, 3, 5 µM) sobre la producción de radicales superóxido *Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control de crecimiento ($p<0,05$) (n=6)

4.3 Discusión

Los ensayos *in vitro* buscaron identificar otras posibles actividades para los compuestos cumarínicos inhibidores selectivos de MAO-B, obtenidos por síntesis: 3-metil-7H-furo[3,2-g]cromen-7-ona (FCS005), 8-propil-6H-[1,3]dioxolo[4,5-g]cromen-6-ona (FCS303), 7-metoxicumarina (S_3) y 6-metilcumarina (S_{11}) y de la cumarina (S_1)). Específicamente se evaluaron efectos protectores y si los compuestos presentaban citotoxicidad. Para esto se realizaron ensayos a diferentes concentraciones de las moléculas, a fin de identificar posibles efectos citotóxicos y las concentraciones de trabajo en los ensayos de neuroprotección.

En estos ensayos se demostró que los compuestos que presentaron efectos en los modelos *in vivo*, no tienen un efecto significativo sobre la viabilidad de las células SH-SY5Y en las concentraciones ensayadas, lo cual es importante porque las concentraciones a las cuales los compuestos mostraron inhibición selectiva de MAO-B, e incluso concentraciones mayores, fueron inocuas para el modelo celular.

Una vez se comprobó que los compuestos no fueron citotóxicos se buscó identificar los posibles efectos neuroprotectores de S1, FCS303 y FCS005 frente a la toxicidad inducida por rotenona. Para este ensayo se empleó el modelo rotenona de EP que en los últimos años se ha usado para identificar potenciales agentes neuroprotectores (Greenamyre *et al.*, 2010). La rotenona, es uno de los agentes que se emplean para inducir parkinsonismo *in vitro* e *in vivo* (Halperin, 2009; Song et. al., 2012), dado que atraviesa fácilmente la membrana para inducir la inhibición específica del complejo I mitocondrial y causar la degeneración selectiva dopaminérgica nigroestriatal (Molina-Jimenez *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2012). Por otra parte, SH-SY5Y es una de las líneas celulares de neuroblastoma que se usa comúnmente en el modelo de Parkinson, porque comparten muchas propiedades con las neuronas dopaminérgicas tales como la expresión de tirosina hidroxilasa y síntesis de dopamina (Song *et al.*, 2012). Un estudio que evaluó los efectos de rotenona en células no dopaminérgicas y células dopaminérgicas SH-SY5Y, reportó que ésta últimas fueron más sensibles a la rotenona que las células MCF-7 (línea celular de carcinoma mamario) y las células HepG2 (hepatocarcinoma), en dicho estudio se sugiere que la dopamina intracelular podría ser un factor que hace a las células más vulnerables a la rotenona (Watabe & Nakaki, 2007).

En este modelo FCS005 y FCS303 presentaron efectos protectores que se podrían dar porque intervienen en el metabolismo de la dopamina mediado por MAO, donde se produce peróxido de hidrogeno que reacciona con metales en transición para formar el radical hidroxilo y si éste no es reducido por los antioxidantes celulares, reaccionaría con lípidos, aminoácidos y DNA, causando daño celular (Tadaiesky *et al.*, 2006). Sin embargo, las neuronas dopaminérgicas expresan principalmente MAO-A (Goldstein *et al.*, 2014; Jenner, 2012), por tanto se podría pensar que el mecanismo de inhibición de MAO-B aportaría poco al efecto neuroprotector observado. Esto último concuerda con la literatura, ya que se ha reportado que tanto compuestos que poseen actividad inhibidora de MAO-B como los que no la poseen, han mostrado propiedades neuroprotectoras similares en cultivos de células neuronales, en respuesta a diversas neurotoxinas y en varios modelos *in vivo* (isquemia global, neurotrauma, lesión en la cabeza, anoxia, etc.), lo que indica que la inhibición de la MAO no es un pre-requisito para la neuroprotección (Mandel *et al.*, 2005; Weinreb *et al.*, 2010). Lo que sugiere que pueden estar involucrados otros mecanismos que favorecen este efecto protector.

La disminución en la actividad del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, que causa la rotenona, así como el estrés oxidativo derivado de la mitocondria se han implicado en enfermedades neurodegenerativas (Molina-Jimenez *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2012). Adicionalmente, se ha demostrado que la rotenona es capaz de inducir apoptosis a través de la generación mitocondrial de especies reactivas de oxígeno (Watabe *et al.*, 2007; Molina-Jimenez *et al.*, 2003).

Los antioxidantes, captadores de radicales libres y fármacos similares se han utilizado potencialmente en el desarrollo terapéutico para prevenir la enfermedad de Parkinson. Los resultados de algunos autores sugieren que flavonoides y cumarinas pueden captar directamente las especies reactivas del oxígeno (Molina-Jimenez *et al.*, 2003). Teniendo en cuenta esto y comenzando a explorar posibles mecanismos de acción mediante los cuales se produce el efecto neuroprotector, se realizó el ensayo de cuantificación de radical superoxido en el cual se observó que los compuestos no tienen efecto antioxidante significativo. Sin embargo, en estudios previos de actividad antioxidante *in vitro* en el sistema xantina/xantino oxidasa, se observó que FCS005 y FCS303 mostraron efecto

antioxidante frente a superóxido del 50%. La diferencia podría deberse a que en el modelo celular la cadena respiratoria mitocondrial es una de las fuentes más importantes en la producción de ROS en condiciones fisiológicas. Dos sitios de la cadena respiratoria, complejo I y complejo III, se han sugerido como la principal fuente de ROS (Li *et al.*, 2003).

No obstante, esto no descarta que los IMAO-B puedan tener efecto sobre la producción de otros radicales. La rotenona estimula la producción de superoxido pero éste puede reaccionar con peróxido de hidrógeno para generar oxígeno singlete y radicales hidroxilo, que son más tóxicos (Li *et al.*, 2003). Teniendo en cuenta lo anterior, se podría pensar en la posibilidad de que los compuestos presenten mejores respuestas frente a otros radicales. El estudio de Vergel demostró que el porcentaje de captación del radical hidroxilo por parte de FCS005 fue 92±1% y de 83±5% para FCS303; en el caso de peroxilo FCS005 mostró un porcentaje de captación de 96% y FCS303 presentó interferencia en el ensayo (Vergel, 2010a).

Es importante no ignorar la actividad antioxidante de estos compuestos, por lo expuesto anteriormente y porque también mostraron actividad protectora frente a peroxidación lipídica y oxidación de grupos carbonilo de las proteínas, en homogenados cerebrales de ratones previamente tratados con FCS005 y FCS303 (Vergel, 2010).

5. Estudios de toxicidad

5.1 Metodología

5.1.1 Animales

Para el estudio de toxicidad aguda se emplearon ratones albinos ICR hembras y machos, 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° ± 1° C, con ciclos sucesivos de 12 horas de luz y oscuridad y consumo de agua y alimento a libre demanda.

5.1.2 Estudio de toxicidad aguda

Se evaluó la toxicidad aguda de los compuestos que mostraron ser más interesantes en el modelo de reserpina. El estudio se desarrolló en dos etapas, en la primera se distribuyeron aleatoriamente tres ratones ICR hembras y machos por cada grupo. El grupo control recibió vehículo y los grupos de tratamiento (S1, FCS005 y FCS005) una dosis de 2000 mg/kg de peso (OECD, 2001). Se observaron durante 14 días y posteriormente se inició el desarrollo de la segunda etapa de la misma forma que la primera.

La administración del tratamiento o del vehículo, según el caso, se llevó a cabo por medio de una sonda orogástrica, en dosis única. El vehículo utilizado para la dilución del extracto etanólico estaba compuesto por: 10% de propilenglicol, 10% de glicerina, 1% de polisorbato-80 y agua destilada en cantidad suficiente para completar a 100%.

Las variables dependientes fueron: Examen físico y examen anatomopatológico.

- Examen físico: En las dos etapas los ratones se observaron durante las primeras horas después de la administración y luego diariamente durante dos semanas. Se evaluaron parámetros fisiológicos y de comportamiento, siguiendo los lineamientos del test de Irwin y del formulario FOB (funcional observation battery), (ver anexos A y B).

- Examen anatomopatológico: Al finalizar cada etapa del estudio se realizó la necropsia de todos los animales, o antes en caso de muerte del animal. Se tomaron muestras de: hígado, riñón, cerebro, bazo, pulmones, corazón, intestinos y órganos sexuales y se enviaron al Laboratorio de Patología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional.

5.1.3 Análisis de datos

Los resultados del examen físico se estudiaron mediante un análisis de datos longitudinales dicotómicos (prueba GEE) (Jos, 2005). Los resultados de patología se analizaron con la prueba estadística Kruskal-Wallis. Los datos se procesaron con los programas: Excel^{R}, GraphPad Prism (V 5.0) y Stata 12. El nivel de significancia estadística adoptado fue $P<0.05$.

5.1.4 Aspectos éticos

Se tuvieron en cuenta consideraciones éticas tales como: las fijadas por el Consejo Internacional de Organizaciones Médicas para la investigación biomédica en animales, las establecidas en la Ley número 84 de 1989, capítulo sexto (en la cual se hace referencia al uso de animales vivos en experimentos e investigación en nuestro país) y la Resolución 8430 de 1993, titulo V, en el cual se dan pautas para la investigación biomédica con animales.

Por otra parte, 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 esto, el comité tuvo en cuenta que en esta investigación se contó con un

diseño metodológico apropiado, en el cual se redujo el número de animales y el investigador contaba con la habilidad necesaria para el cuidado y manejo de los mismos.

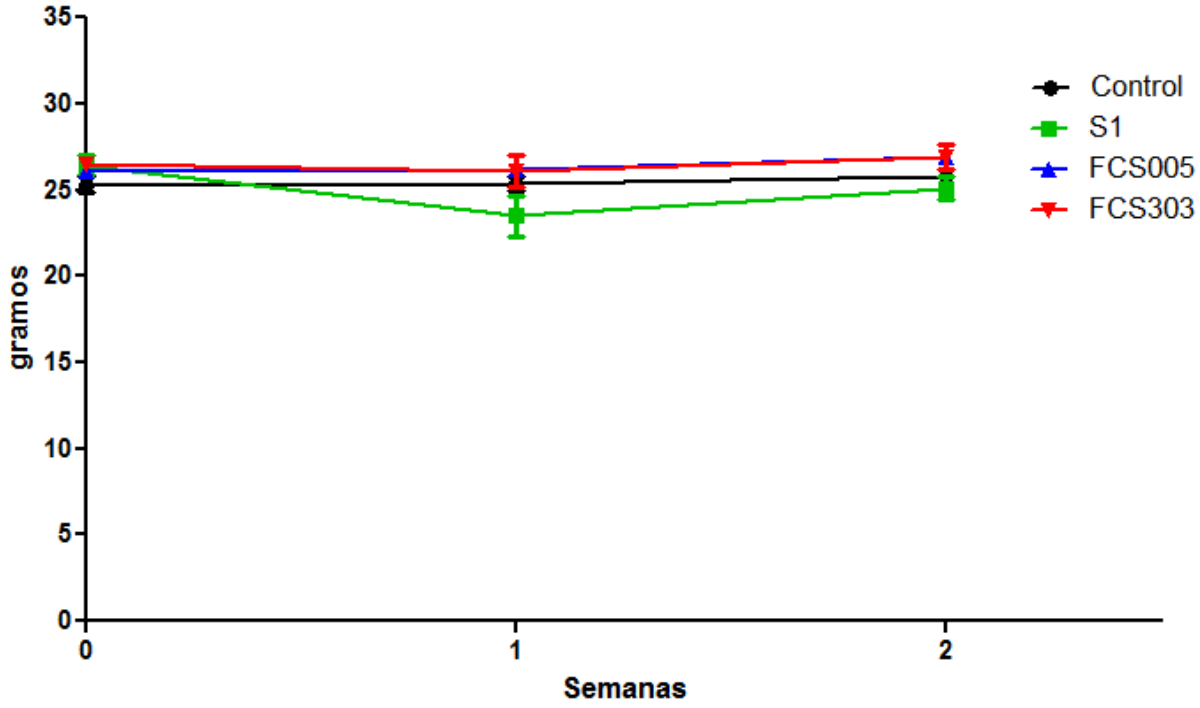
5.2 Resultados

5.2.1 Examen físico

- **Peso corporal y de órganos**

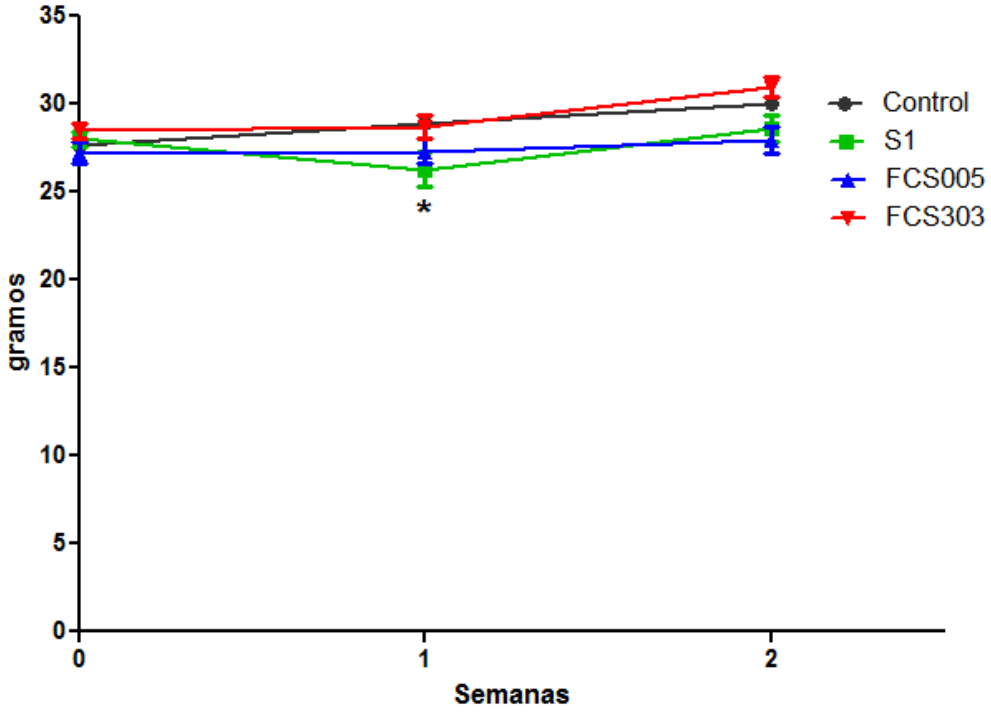
En el control de peso llevado a cabo durante el estudio se observó que, para hembras no hubo diferencia significativa entre los grupos de tratamiento y el grupo control, mientras que para machos se observó, en la primera semana, disminución significativa del peso en el grupo dosificado con el compuesto S1 (Figuras 5-1 y 5-2).

Figura 5-1: Variación de peso corporal de hembras



Promedio de peso corporal de ratones ICR hembras, que recibieron análogos cumarinicos IMAO-B (2000 mg/kg vía oral) administrados en dosis única. Control 0mg/kg

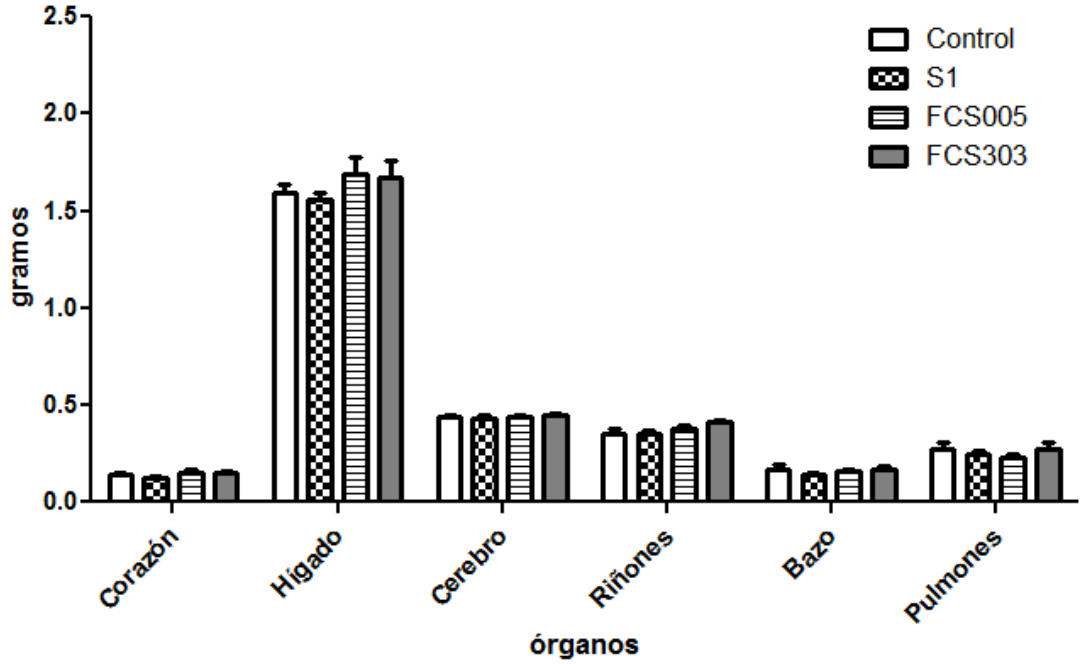
Figura 5-2: Variación de peso corporal de machos



Promedio de peso corporal de ratones ICR machos, que recibieron análogos cumarínicos IMAO-B (2000 mg/kg vía oral) administrados en dosis única. Control 0mg/kg. *Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control de crecimiento ($p<0,05$)

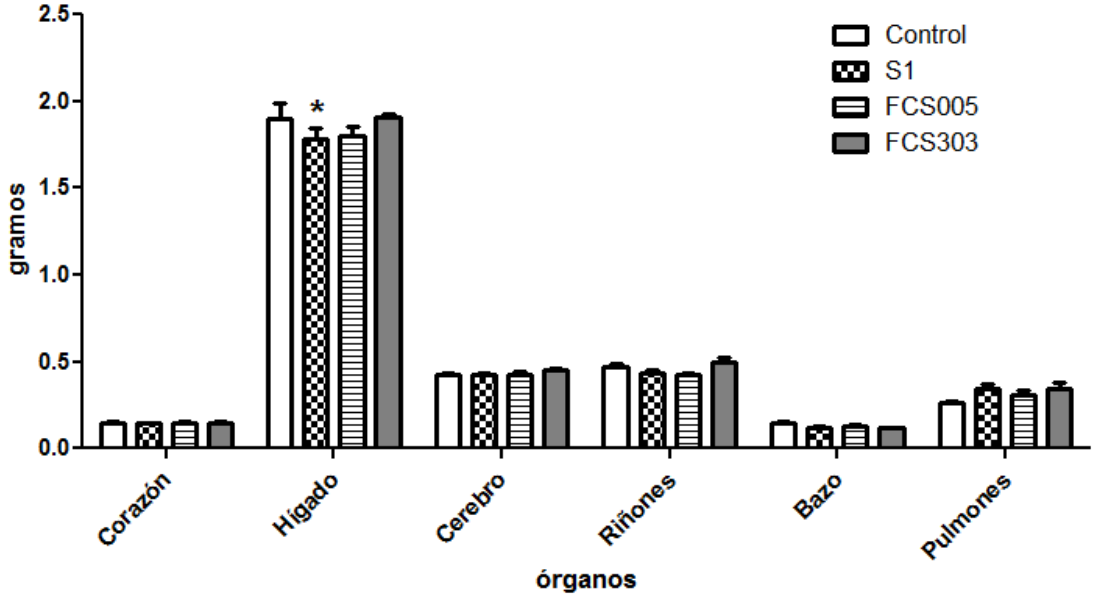
Por otra parte, en las figuras 5-3 y 5-4 se presentan los pesos de los órganos obtenidos en la necropsia, no se evidenció diferencias significativas entre los grupos controles y los tratados, excepto para los ratones macho que se les administró S1, los cuales mostraron diferencia en hígado.

Figura 5-3: Peso de órganos de hembras



Promedio del peso de los órganos de ratones ICR hembras, que recibieron análogos cumarínicos IMAO-B (2000 mg/kg vía oral) administrados en dosis única. Control 0mg/kg. *Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control de crecimiento (p<0,05)

Figura 5-4: Peso de órganos de machos



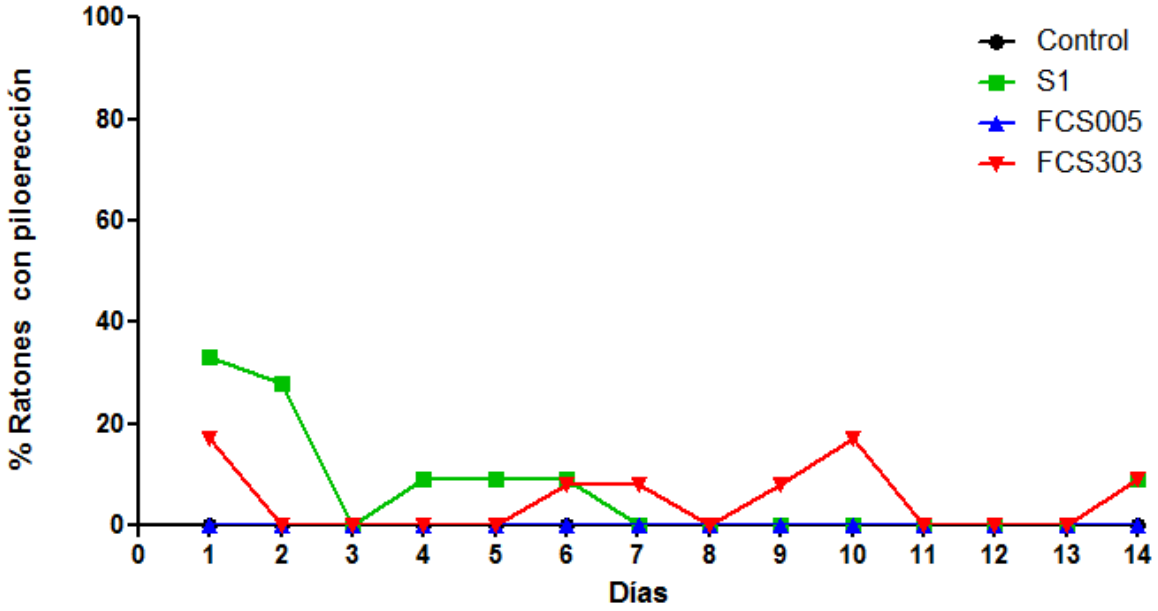
Promedio del peso de los órganos de ratones ICR machos, que recibieron análogos cumarínicos IMAO-B (2000 mg/kg vía oral) administrados en dosis única. Control 0mg/kg. *Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control de crecimiento (p<0,05)

- **Examen físico**

Los parámetros del examen físico que presentaron diferencias estadísticamente significativas comparados con el grupo control fueron: aumento actividad motora 26,9%, pasividad 6,0%, piloerección 3,0%, perdida de reacción de alarma 14,0% y disnea 4,6%, los porcentajes se presentan sobre el total de los animales del estudio.

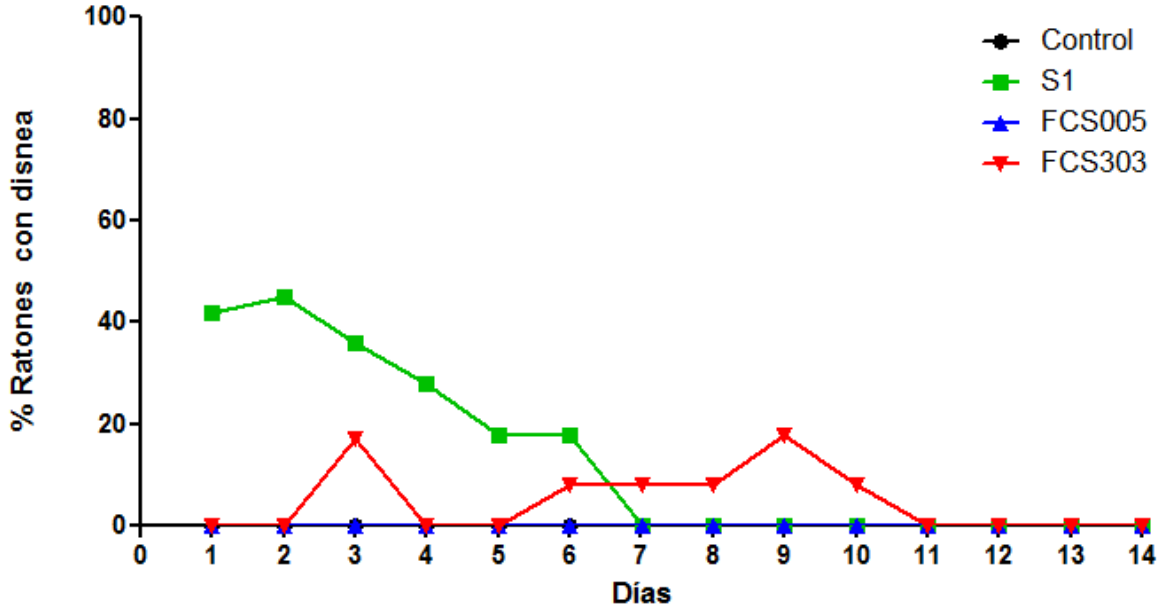
Piloerección y disnea presentaron diferencia significativa a través del tiempo, el tratamiento S1 mostró los más altos porcentajes en los primeros días y fue disminuyendo, seguido por el grupo que recibió FCS303, donde el porcentaje de ratones que presentó estos dos parámetros no superó el 25% (Figuras 5-5 y 5-6).

Figura 5-5: Piloerección



Comportamiento del parámetro piloerección a través del tiempo en ratones ICR, que recibieron análogos cumarinicos IMAO-B (2000 mg/kg vía oral) administrados en dosis única. Control 0mg/kg

Figura 5-6: Disnea



Comportamiento del parámetro disnea a través del tiempo en ratones ICR, que recibieron análogos cumarinicos IMAO-B (2000 mg/kg vía oral) administrados en dosis única. Control 0mg/kg

El grupo de ratones a los que se les administró S1, fue el único que presentó diferencia significativa en los parámetros de pasividad, reacción de alarma y aumento en la actividad motora. Los porcentajes fueron: 43,6%, 49,0% y 4,6% del total de animales que presentaron pasividad, disminución en la reacción de alarma y aumento de la actividad motora, respectivamente.

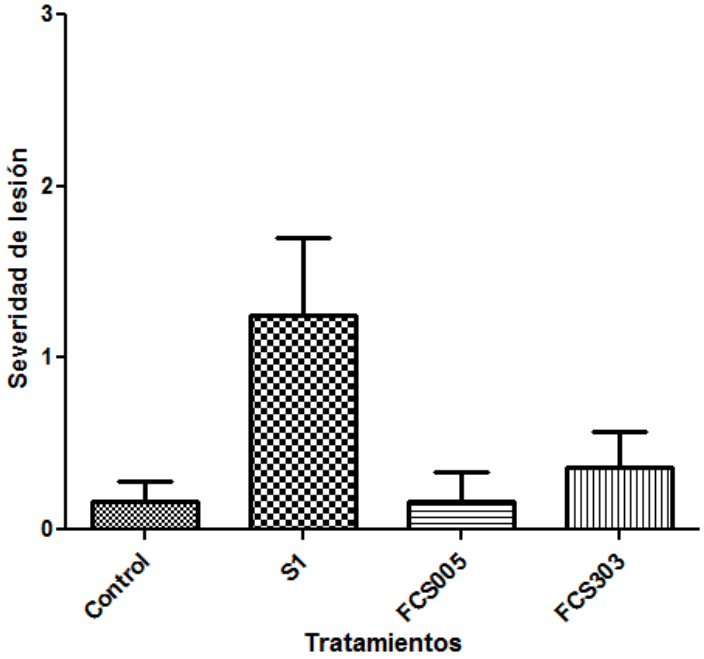
La variable género no presentó diferencia. La distribución de esta variable en los parámetros fue: del total de animales que presentaron piloerección, 67% eran machos y 33% hembras; en disnea 53% machos y 47% hembras; en pasividad 33% machos y 67% hembras; en perdida de la reacción de alarma 50% cada género y en aumento en la actividad motora 51% machos y 49% hembras.

5.2.2 Estudio anatomopatológico

A lo largo del estudio se presentó la muerte de una hembra al segundo día, la necropsia demostró cuadro hemorrágico severo. Macroscópicamente se evidenciaron casos de hemorragia hepática (dos ratones) y algunas áreas blanquecinas en pulmón (7 ratones).

Microscópicamente se presentaron lesiones en pulmón y en hígado, las cuales no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre el control y los grupos de tratamiento. Sin embargo, al graficar los diferentes grados de las lesiones hepáticas (Normal=0; leve=1; moderado=2; severo=3), se observa que el grupo tratado con S1 presentó las lesiones más severas, mientras que los otros tratamientos fueron similares al control (Figura 5-7).

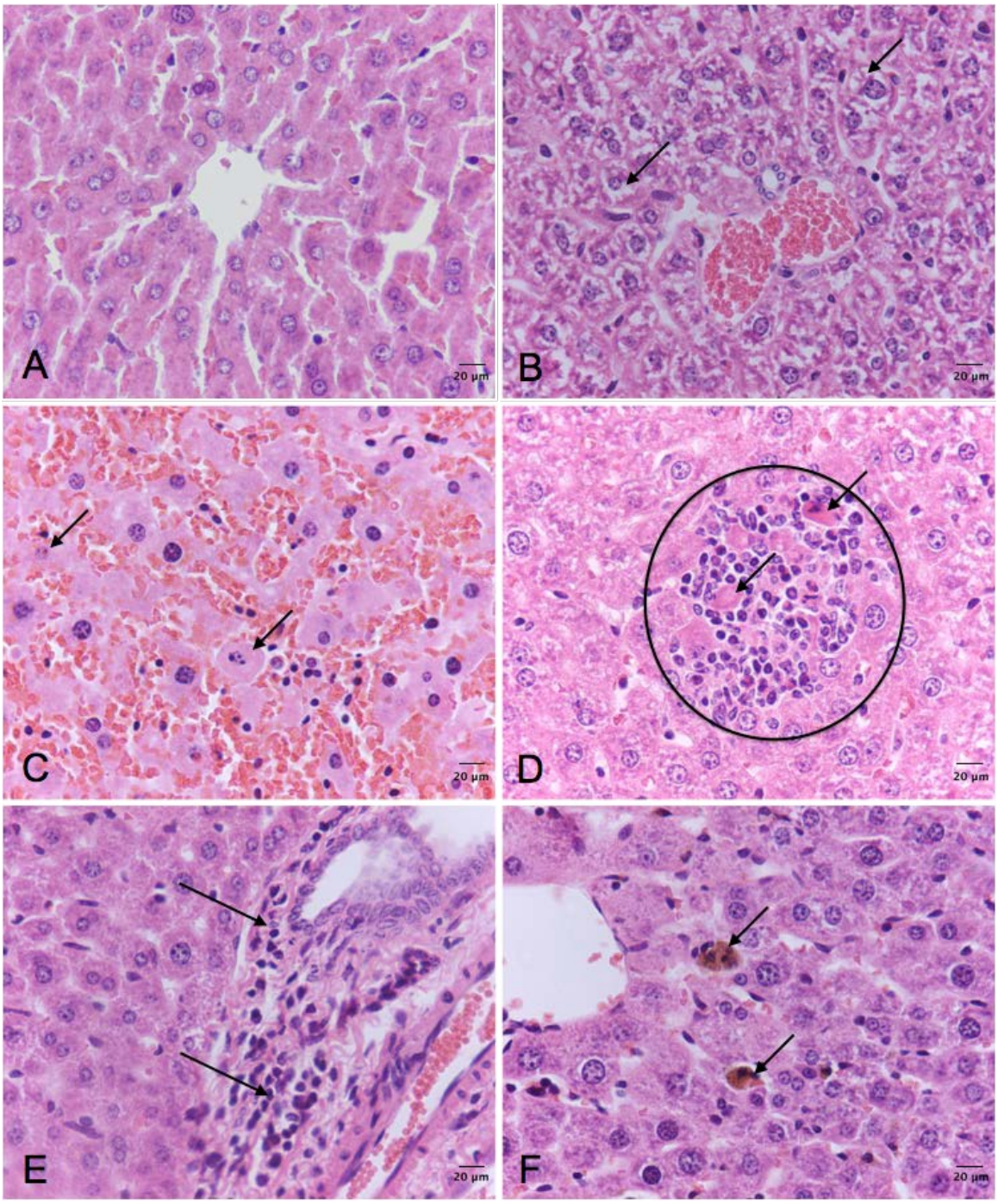
Figura 5-7: Lesiones hepáticas



Puntuación de las diferentes lesiones hepáticas en ratones ICR, que recibieron análogos cumarínicos IMAO-B (2000 mg/kg vía oral) administrados en dosis única. Control 0mg/kg

Las lesiones hepáticas que se presentaron fueron degeneración de hepatocitos, focos de necrosis y focos de hepatitis, el grupo tratado con S1 fue el que presentó casos severos (Figura 5-8). Focos necróticos hepáticos leves a moderados se presentaron en un ratón de cada uno de los grupos tratados con FCS005 (8%) y FCS303 (9%) y también en los controles (8%). En pulmón se observaron algunos focos bronconeumónicos leves, no significativos.

Figura 5-8: Lesiones histopatológicas en hígado



Lesiones histopatológicas hígado. A) Hígado de animal control, observe la arquitectura y morfología normal de los hepatocitos. B-F) Hígado de animales tratados con S1). B) Degeneración de hepatocitos, es evidente el cambio degenerativo citoplasmático (flechas). C) Necrosis de hepatocitos, se observan los cambios nucleares de necrosis (flechas). D) Focos de hepatitis necrótica, es evidente el foco de infiltrado mixto (círculo) y presencia de hepatocitos necróticos (flechas). E) Focos de infiltrado periportal MN (flechas). F) Presencia de pigmentos intracitoplasmáticos en macrófagos (flechas).

5.3 Discusión

En el estudio de toxicidad aguda de los análogos cumarínicos IMAO-B, FCS005 y FCS303 no se presentaron muertes ni signos de toxicidad atribuibles a la administración de los mismos. Por tanto, de acuerdo con el protocolo de la OECD para evaluar toxicidad aguda oral (método de clases) (OECD, 2001), se podría afirmar que la dosis letal 50 de estas moléculas es superior a 2000 mg/kg de peso corporal.

Las anteriores afirmaciones se hacen teniendo en cuenta que, cuando hay efectos importantes se debe mirar individualmente el animal afectado y evaluar todo su contexto (Suckow *et al.*, 2006). Para esto se evaluó si había correlación entre los resultados del examen físico y los hallazgos de lesiones histopatológicas, encontrándose que existe relación para el caso del tratamiento S1.

En el grupo tratado con cumarina (S1) se presentó una muerte por hemorragia severa, esto puede estar asociado con los efectos anticoagulantes que se le atribuyen a la cumarina (Carretero, 2000). Además, estos animales, en el estudio anatomopatológico, mostraron lesiones severas en hígado, esto coincide con lo reportado en la literatura donde se indica que dosis altas de cumarina por vía oral están asociados con la toxicidad del hígado en los roedores (Felter *et al.*, 2006).

Focos necróticos hepáticos moderados a leves se presentaron en un ratón de cada uno de los grupos tratados con FCS005, FCS303 y vehículo (control). La necrosis hepática se ha encontrado en estudios de toxicidad en diferentes circunstancias, puede ocurrir espontáneamente en animales de laboratorio (como en el caso de los controles), puede desarrollarse siguiendo un tratamiento en altas dosis como resultado de mecanismos indirectos que pueden no ser relevantes para humanos a dosis terapéuticas (Greave, 2007). La ubicación de dichos focos es centrolobular, este tipo de necrosis es particularmente propensa a ocurrir después de la administración de sustancias químicas. Los hepatocitos centrolobulares poseen sistemas enzimáticos que podrían generar metabolitos responsables de un daño tisular directo por unión covalente directa con organelos o indirectamente por promoción de peroxidación lipídica de membranas (Greave, 2007).

Histológicamente la necrosis centrolobular se encuentra acompañada de procesos inflamatorios (Greave, 2007), lo que explicaría la presencia de focos de hepatitis dentro de las lesiones hepáticas.

Los hallazgos histopatológicos muestran lesiones en pulmón, lo cual puede estar relacionado con neumonía por agentes infecciosos o con neumonía por inhalación, que se favorece con la administración oral por cánula intragástrica (Rang *et al.*, 2008; Arai, *et al.*, 1995). Esto es importante dado que por las características de los compuestos la administración de una dosis tan elevada por vía oral no fue fácil.

El grupo de animales tratado con S1, fue el único que registró pérdida significativa de peso corporal (en la primera semana) y del peso del hígado, lo cual es importante tenerlo en cuenta porque si un animal pierde peso puede ser indicativo de algún proceso de enfermedad (Velazquez *et al.*, 2008), además el hígado fue el órgano blanco del compuesto S1.

Los parámetros del examen físico que presentaron diferencia significativa a través del tiempo fueron: la piloerección que es una de las manifestaciones de estrés del animal (Rang *et al*., 2008), probablemente por la manipulación y la administración del compuesto, este parámetro con el tiempo disminuyó puede ser por habituación de los animales. La disnea presentada por algunos animales se puede atribuir a la administración por vía oral que está asociada con complicaciones tales como aspiración y daño de vías aéreas (Rang *et al*, 2008).

El tratamiento S1 (cumarina), mostró diferencia significativa en los parámetros de pasividad y perdida de la reacción de alarma, esto parece responder a efectos sedantes que se le han atribuido a la cumarina. Un estudio en el cual se evaluó la cumarina, obtenida de la especie *Hygrophila tyttha* Leonard, indicó que esta molécula es responsable, cuando menos en parte, de los efectos de tipo ansiolítico, anticonvulsivante y sedante descritos para esta especie (Ariza *et al*., 2007). A este efecto parecen ser ligeramente más susceptibles las hembras.

6. Conclusiones

Los análogos cumarínicos inhibidores selectivos sobre MAO-B con potenciales efectos antiparkinsonianos son FCS005 y FCS303, dado que controlaron signos en los modelos de reserpina y L-dopa, en ratones.

Los análogos cumarínicos inhibidores selectivos sobre MAO-B con potenciales efectos protectores son FCS005 y FCS303, dado que protegieron frente de la citotoxicidad causada por rotenona en células SH-SY5Y.

Los compuestos FCS005 y FCS303 presentan inhibición de MAO-B *in vivo*, dado que causaron potenciación de los efectos producidos por 2-feniletilamina (sustrato natural específico de MAO-B).

El perfil toxicológico inicial de los compuestos FCS005 y FCS303 se considera seguro dado que en los estudios de toxicidad aguda oral no causaron ninguna muerte, presentando una dosis letal 50 mayor a 2000 mg/kg. Además, en la evaluación de citotoxicidad no disminuyeron significativamente la viabilidad de las células SH-SY5Y.

La cumarina (S1) no se considera una alternativa muy interesante para la enfermedad de Parkinson porque, aunque controló síntomas en modelo de reserpina, su respuesta no fue relevante en modelo de L-dopa y no presentó efectos protectores. Además, fue el único compuesto que causó una muerte y mostró lesiones hepáticas severas en el estudio de toxicidad.

Los compuestos S3 y S11 no se consideran una alternativa muy interesante para la enfermedad de Parkinson, porque no controlaron significativamente signos en modelo de reserpina.

7. Recomendaciones

Continuar con el estudio de las moléculas FCS005 y FCS303 evaluándolas en otros modelos *in vivo*, como 6-hidroxidopamina y MPTP.

Evaluar los posibles mecanismos por los cuales las moléculas FCS005 y FCS303 ejercen los efectos protectores *in vitro*.

Realizar estudios de toxicidad a largo plazo para seguir construyendo el perfil toxicológico de las moléculas FCS005 y FCS303.

A. Anexo: Formato examen físico toxicidad aguda

TOXICIDAD AGUDA ORAL

EVALUACIÓN EXAMEN FÍSICO

Identificación de individuo: _____ Sexo: _____

Semana: _____ Peso: _____

		dia 1		dia 2		dia 3		dia 4		dia 5		dia 6		dia 7	
		Si	No	Si	No	Si	No	Si	No	Si	No	Si	No	Si	No
SNC	Aumento Actividad motora														
	Disminución Actividad motora														
	Temblores														
	Fasciculaciones														
	Convulsiones														
	Ataxia														
	Analgésia														
	Anestesia														
	Parálisis patas														
	Actividad prensil														
	Reacción de alarma														
	Perdida reflejo enderezamiento														
	Perdida reflejo corneal														
	Perdida reflejo pineal														
Ojos	Enoftalmo														
	Nistagmus														
	Lagrimación														
	Miosis														
	Midriasis														
	Exoftalmo														
	Ptosis														
	Cromodacriorrea														
	Relajación memb. Nictitantes														
	Opacidad corneal														
Apariencia piel (orejas, patas, cola)	Palidez														
	Hiperemia														
	Cianosis														
Efectos generales	Sialorrea														
	Erección de la cola														
	Piloerección														
	Diarrea														
	Priapismo														
	Signo de Robichaud														
	Disnea														
	Cromodacriorrinocriorrea														
	Descarga nasal														
Efectos subjetivos	Temeroso														
	Pasivo														
	Agresivo														
Respiración t(seg.) para 20 respiraciones															

OBSERVACIONES

B. Anexo: Aspectos complentarios de FBO

A. Observaciones realizadas en una jaula individual (2 minutos)

1. Postura inicial:
a) sentado o de pie a cuatro patas, dos patas (“rearing”) o dormido.
b) tumbado boca abajo o boca arriba

2. Estado de vigilancia:
a) Normal
b) Anormal: deprimido o excitado

B. Observaciones al manipular el animal (2 minutos)

1. Respuesta inicial al coger el animal de su jaula y depositarlo en la caja de experimentación.
a) Facil manejo
b) Difícil manejo

2. Reacción a la mano del experimentador
a) Normal
b) Agresivo

C. Observaciones en el campo abierto (“open field”)

1. Vocalizaciones
a) Presencia
b) Ausencia

D. Respuestas a la manipulación (evaluación sensorial y motora)

1. Respuesta a la aproximación de un objeto
a) Ausencia de reacción.
b) Presencia de reacción: se acerca lentamente o lo huele o se gira.

C. Anexo: Modelamiento de la estructura 3D de la enzima MAO-B de ratón

Debido a que no existe estructura 3D resuelta por cristalografía de rayos X o modelamientos *in silico* para la enzima MAO-B de ratón, se procedió a efectuar la predicción de la estructura utilizando el reporte de la MAO-B humana como molde. Esto debido a que la estructura terciaria de la MAO-B en H*omo sapiens* ha sido cristalizada y descrita en estudios anteriores. La estructura de MAO B de ratón obtenida mediante I-Tasser fue comparada con la estructura de MAO-B humana con el código 4A79 obtenida de la base de datos PDB. Los parámetros a tener en cuenta para evaluar la calidad de los modelos fueron RMSD (calcula la calidad estructural del alineamiento) y ángulos diédricos Phi y Psi (Figura C1).

El análisis se realizó mediante el programa YASARA realizando un alineamiento de las estructuras con el algoritmo MUSTANG (MUltiple STructural AligNment AlGorithm), el cual construye el alineamiento usando la información espacial de los átomos Carbonos alfa de las moléculas (Konagurthu, A. S., Whisstock, J. C., 2006; Krieger E. and Vriend G. 2014). El alineamiento estructural entre los dos objetos tuvo un RMSD de 0,305 Å (dato también obtenido usando el programa PYMOL), comparando 499 residuos (secuencia 4A79 con 501 aminoácidos y la de ratón con 520 aminoácidos), con una identidad de secuencias del 88,98%.

Al observar las combinaciones de ángulos diedrícos de la MAO-B de ratón a través de la estructura generada por i-Tasser utilizando el test Ramachandran plot (Gráfico de Ramachandran), se observa un 81% de aminoácidos en las zonas más favorables.

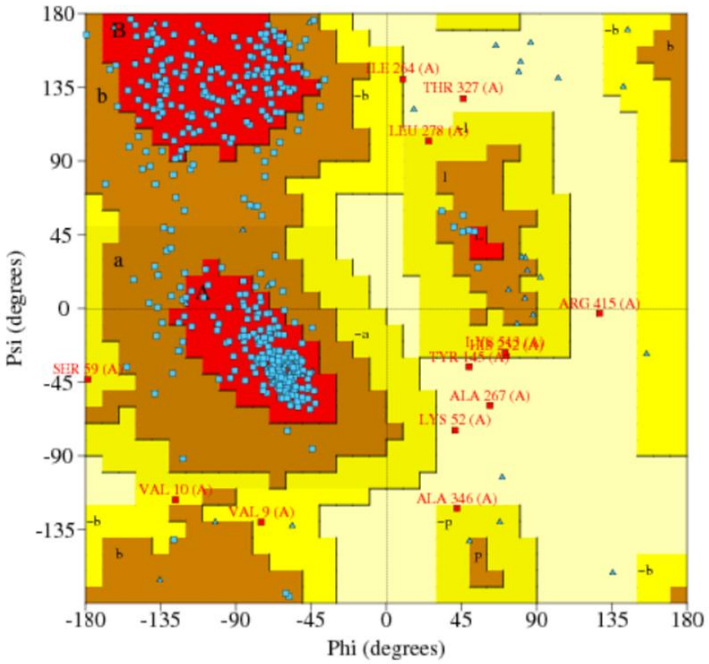


Figura C1. Gráfico de Ramachandran. Se evidencian cuatro cuadrantes en los que se muestran los enlaces del esqueleto de la estructura 3D. Zonas en rojo muestran regiones permitidas que adoptan conformación de hélices alfa (A) y beta pliegues (B), las zonas en amarillo muestran las regiones fuera del límite de los ángulos fi y si para las conformaciones estructuradas y las zonas en blanco muestran regiones no favorables.

El detalle de las estructuras secundarias se observa en la Figura C2. Lo que es coherente con los porcentajes de ángulos diedrícos de estructuras cristalizadas para MAO-B humana. Estos porcentajes son menores a 90% debido a que la estructura 3D fue modelada con el cofactor FAD, sin embargo, se considera que el 81% obtenido genera un buen criterio de calidad y confiabilidad en el modelaje de la estructura 3D. Lo anterior, se hace evidente cuando se comparan las estructuras 3D para la enzima resuelta por cristalografía y la MAO-B modelada para este trabajo (Figura C3).

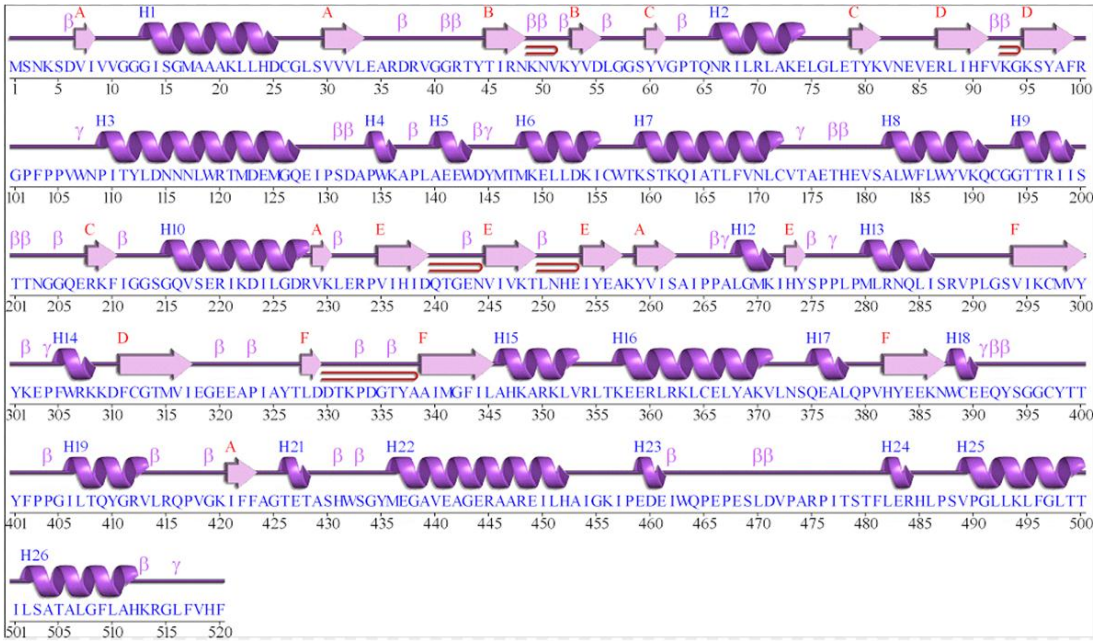


Figura C2. Detalle de las estructuras secundarias de la enzima MAO-B de ratón. Se observan las estructuras típicas de hélice alfa, beta pliegues, los enrrollamientos al azar y los conectores que forman la estructura 3D de la enzima. Adicionalmente, se observa la secuencia de aminoácidos que forma dichas estructuras.

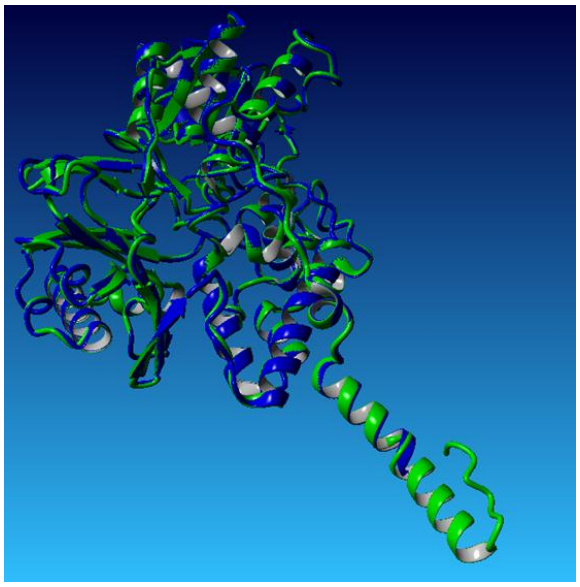


Figura C3. Comparación de las estructuras 3D de las enzimas MAO-B de ratón y humana. Se observan superpuestas las estructuras de las enzimas para las dos especies. En verde se muestra la estructura predicha de MAO-B de ratón y en azul MAO-B 4A79 resuelta por cristalografia de Rayos X.

Bibliografía

Abílio VC, Araujo CCS, Bergamo M, Calvente PRV, Almeida VD, Ribeiro R de A, et al. Vitamin E attenuates reserpineinduced oral dyskinesia and striatal oxidized glutathione/reduced glutathione ratio (GSSG/GSH) enhancement in rats. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry*. 2003; 27: 109–14.

Abraham K, Wöhrlin F, Lindtner O, Heinemeyer G, Lampen A. Toxicology and risk assessment of coumarin: focus on human data. *Mol Nutr Food Res*. 2010; 54:228-39.

Alexi T, Borlongan C, Faull R, Williams C, Clark R, Gluckman P, et al. Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's diseases. *Prog Neurobiol*. 2000; 60: 409-70.

Alonso V. Evaluación de los efectos de la exposición a BDE-99 sobre la función cognitiva y reproductiva en ratas macho adultas. Tesis doctoral. Universitat Rovira I Virgili. 2009.

Alvarez S. Cumarinas en la prevención del estrés oxidativo dependiente de la edad. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. 1994

Antkiewicz-michaluk L, Romañska I, Papla I, Michaluk J, Bakalarz M, Vetulani J, et al. Neurochemical changes induced by acute and chronic administration of 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline and salsolinol in dopaminergic structures of rat brain. *Neuroscience*. 2000; 96: 59–64

Arai R, Karasawa N, Nagatsu T, Nagatsu I. Exogenous L-5-hydroxytryptophan is decarboxylated in neurons of the substantia nigra pars compacta and lócus coeruleus of the rat. *Brain Res*. 1995; 669: 145-9.

Arboleda G, Cárdenas Y, Rodríguez Y, Morales L, Matheus L, Arboleda H. Differential regulation of AKT, MAPK and GSK3β during C2-ceramide-induced neuronal death. *Neurotoxicology*. In press, 2010.

Ariza S, Rueda D, Rincón J, Linares E, Guerrero M. Efectos farmacológicos sobre el sistema nervioso central inducidos por cumarina aislada de *Hygrophila tyttha* Leonard. *Vitae*. 2007; 14: 51-8.

Bahena-Trujillo R, Flores G, Arias-Montaño JA. Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central. *Rev Biomed*. 2000; 11: 39-60.

Barnéoud P, Mazadier M, Miquet J, Parmentier S, Dubédat P, Doble A, et al. Neuroprotective effects of riluzole on a model of Parkinson´s disease in the rat. *Neuroscience*. 1996; 74: 971-83.

Bilska A, Dubiel M, Sokolowska-jezewicz M, Lorenc-koci E, Wlodek L. Alpha-lipoic acid differently affects the reserpine-induced oxidative stress in the striatum and prefrontal cortex of rat brain. *Neuroscience*. 2007; 146: 1758–71.

Binda C, Newton-Vinson P, Hubalek F, Edmondson D, Mattevi A. Structure of human monoamine oxidase B, a drug target for the treatment of neurological disorders. *Nat Struct Biol*. 2002; 9: 22-6.

Brenes JC, Padilla M, Fornaquera J. A detailed analysis of open-field habituation and behavioral and neurochemical antidepressant-like effects in postweaning enriched rats. *Behav Brain Res*. 2009; 197: 125-37

Cameán A, Repetto M. Toxicología Alimentaria. Madrid: Diaz de Santos; 2006.

Carretero M. Compuestos fenólicos: Sikimatos (II). *Panorama Actual. Med*. 2000; 24: 432-5.

Chen Y, Kong L, Xia X, Kung H, Zhang L. Behavioral and biochemical studies of total furocoumarins from seeds of Psoralea corylifolia in the forced swimming test in mice. *J Ethnophrmacol*. 2005; 96: 451-9.

Chimenti F, Secci D, Bolasco A, Chimenti P, Granese A, Befani O, et al. Inhibition of monoamine oxidases by coumarin-3-acyl derivatives: biological activity and computational study. *Bioorg Med Chem Lett*. 2004; 14: 3697–703.

Clark D. *In silico* prediction of blood-brain barrier permeation. *Drug Discov Today*. 2003; 8: 927-33.

Cutillas B, Ambrosio S, Unzeta M. Neuroprotective effect of the monoamine oxidase inhibitor PF 9601N [N-(2-propynyl)-2-(5-benzyloxy-indolyl) methylamine] on rat nigral neurons after 6-hydroxydopamine-striatal lesion. *Neurosci Lett*. 2002; 329: 165–8.

CYTED. Manual de técnicas de Investigación. Subprograma X, Proyecto x.1. Búsqueda de Principios Bioactivos en la región. España, 1995.

Datki Z, Juhász A, Gálfi M, Sóos K, Papp R, Zádori D, et al. Method for measuring neurotoxicity of aggregating polypeptides with the MTT assay on differentiated neuroblastoma cells. *Brain Res Bull*. 2003; 62: 223–9.

Dauer W, Przedborski S. Parkinson´s disease: mechanisms and models. *Neuron*. 2003; 39: 889-909.

Deacon RM, Koros E, Bornemann KD, Rawlins JN. Aged Tg2576 mice are impaired on social memory and open field habituation tests. *Behav Brain Res*. 2009; 197: 466-8

Dourish CT. A pharmacological analysis of the hyperactivity síndrome induce by beta-phenyethylamine in the mouse. Br J Pharmacol. 1982; 77: 129-39

Emborg M. Evaluation of animal models of Parkinson's disease for neuroprotective strategies. *J Neurosci Methods*. 2004; 139: 121-43.

Epifano F, Molinaro G, Genovese S, Ngomba R, Nicoletti F, Curini M. Neuroprotective effect of prenyloxycoumarins from edible vegetables. *Neurosci Lett*. 2008; 443: 57-60.

Escobar L, Alfonso P, Aristizabal F. Assessing two staining methods for cytotoxicity test on tumor cell lines. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 2009; 11: 49-56

Escobar L, Aristizabal F. Aplicación de un método fluorométrico para evaluar la proliferación celular en líneas celulares tumorales. *Vitae*. 2010; 17: 173-80

Escobar L, Rivera A, Aristizabal F. Comparison of resazurin and MTT methods on studies of citotoxicity in human tumor cell lines. *Vitae*. 2010; 17: 67-74

Felter SP, Vassallo JD, Carlton BD, Daston GP. A safety assessment of coumarin taking into account species-specificity of toxicokinetics. Food Chem Toxicol. 2006; 44: 462-75.

Finberg J, Update on the pharmacology of selective inhibitors of MAO-A and MAO-B; focus on modulation of CNS monoamine neurotransmitter release. *Pharmacol Ther*. 2014; 143: 133-52.

Finberg J, Youdim M. Pharmacological propierties of the anti-Parkinson drug rasagiline; modification of endogenous brain amines, reserpine reversal, serotonergic and dopaminergic behaviours. *Neuropharmacology*. 2002; 43: 1110–8.

Fisher A, Biggs CS, Eradiri O, Starr MS. Dual effects of L-3,4-dihydroxyphenylalanine on aromatic L-amino acid decarboxylase, dopamine release and motor stimulation in the reserpine-trated rat: evidence that behavior is dopamine independent. *Neuroscience*. 2000; 1: 97-111.

Flicek P, Ahmed I, Amode MR, Barrell D, Beal K, Brent S, *et al*. Ensembl 2013.. *Nucleic Acids Research*. 2013; 41(Database issue): D48–D55. doi:10.1093/nar/gks1236

Foley P, Gerlach M, Youdim M, Riederer P. MAO-B inhibitors: multiple roles in the therapy of neurodegenerative disorders?. *Parkinsonism Relat Disord*. 2000; 6: 25–47

Franco JL, Posser T, Dunkley PR, Dickson PW, Mattos JJ, Martins R, et al. Methylmercury neurotoxicity is associated with inhibition of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase. *Free Radic Biol Med*. 2009; 47: 449-57

Goldstein DS, Kopin IJ, Sharabi Y. Catecholamine autotoxicity. Implications for pharmacology and therapeutics of Parkinson disease and related disorders. Pharmacol Ther. 2014; 144: 268-82.

Greave P. Histopathology of Preclinical Toxicity Studies. 3a. Ed. London: Elsevier; 2007

Greenamyre JT, Cannon JR, Drolet R, Mastroberardino PG. Lessons from the rotenone model of Parkinson's disease. *Trends Pharmacol Sci*. 2010; 31: 141-2.

Haleem DJ, Inam QU, Haleem MA. Effects of clinically relevant doses of methyphenidate on spatial memory, behavioral sensitization and open field habituation: A time related study. *Behav Brain Res*. 2015; 281: 208-14.

Hall, T. BioEdit. Ibis Therapeutics, Carlsbad, CA, 92008, USA. 2004. Disponible en: (http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html).

Halperin I, Morelli M, Korczyn A, Youdim M, Mandel S. Biomarkers for Evaluation of Clinical Efficacy of Multipotential Neuroprotective Drugs for Alzheimer's and Parkinson's Diseases. *Neurotherapeutics*. 2009; 6: 128-40.

Howes, M., Perry, N. and Houghton, P. Plants with traditional uses and activities relevant to the management of Alzheimer's disease and other cognitive disorders. *Phytother Res*. 2003; 17: 1-18.

Jamil MF, Subki MF, Lan TM, Majid MI, Adenan MI. The effect of mitragynine on cAMP formation and mRNA expression of mu-opioid receptors mediated by chronic morphine treatment in SK–N–SH neuroblastoma cell*. J Ethnopharmacol* 2013; 148: 135-43.

Jenner P. Mitochondria, monoamine oxidase B and Parkinson's disease. Basal ganglial. 2012; 2: S3-S7.

Jos W., Twish R. Applied longitudinal data analysis for epidemiology: A practical Guide. UK: Cambridge University Press; 2005.

Kang S, Lee K, Sung S, Kim Y. Four new neuroprotective dihydropyranocoumarins from Angelica gigas. *J Nat Prod*. 2005; 68: 56-9.

Kannari K, Tanaka H, Maeda T, Tomiyama M, Suda T, Matsunaga M. Reserpine pretreatment prevents increases in extracellular striatal dopamine following L-DOPA administration in rats with nigrostriatal denervation. *J Neurochem*. 2000; 74: 263-9

Kato M, Katayama T, Iwata H, Yamamura M, Matsuoka Y, Narita H. In vivo characterization of T-794, a novel reversible inhibitor of monoamine oxidase-A, as an antidepressant with a wide safety magin. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998; 284: 983-90.

Kienhuis AS, van de Poll MC, Dejong CH, Gottschalk R, van Herwijnen M, Boorsma A, et al. A toxicogenomics-based parallelogram approach to evaluate the relevance of coumarin-induced responses in primary human hepatocytes in vitro for humans in vivo. *Toxicol In Vitro*. 2009; 23:1163-9.

Kitanaka J, Kitanaka N, Tatsuta T, Takemura M. 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*. 2005; 82: 488-94.

Kitanaka N, Kitanaka J, Takemura M. Inhibition of methamphetamine-induced hyperlocomotion in mice by clorgyline, a monoamine oxidase-A inhibitor, through alteration of the 5-hydroxytriptamine turnover in the striatum. Neuroscience. 2005; 130:295-308.

Klaassen D y Watkins J. Manual de Toxicología. 5 ed. McGraw Hill Interamericana editores, S.A. de C.V. México, 2001.

Klaassen D. Casarett and Doull's Toxicology The Basic Science of Poisons. 7 ed. New York: McGraw Hill; 2008.

Lake BG. Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: relevance for human risk assessment. *Food Chem Toxicol*. 1999; 37:423-53.

Laskowski RA, Chistyakov VV, Thornton JM. PDBsum more: new summaries and analyses of the known 3D structures of proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res*. 2005; 1;33(Database issue):D266-8.

Li N, raqheb K, Lawler G, Sturgis J, Rajwa B, Melendez J, Robinson J. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitocondrial reactive oxygen species production. J Biol Chem. 2003; 278: 8516-25.

Li WB, Zhou J, P Y, Li X, CT Lu, Xie KL, et al. Neuroprotective effect of osthole on MPP+ -induced cytotoxicity in PC12 cells via inhibition of mitochondrial dysfunction and ROS production. *Neurochem Int*. 2010; 57: 206-15

Lipinski A. Lead and drug like compounds: the rule of five revolution. *Drug Discov Today Technol*. 2004; 4: 337-41

M Cheminformatics, Bratislava, SlovakRepublic, Disponible en : http://www.molinspiration.com/services/properties.html (accessed Jun 2012).

Magnani E, Bettini E. Resazurin detection of energy metabolism changes in serum-starved PC12 cells and of neuroprotective agent effect. *Brain Res Protoc*. 2000; 5: 266-72

Mandel S, Weinreb O, Amit T, Youdim MB. Mechanism of neuroprotective action of the anti-Parkinson drug rasagiline and its derivatives. *Brain Res Rev*. 2005; 48: 379-87.

Matos M, Viña D, Janeiro P, Borges F, Santana L, Uriarte E. New halogenated 3-phenylcoumarins as potent and selective MAO-B inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*. 2010; 20: 5157–60.

Matos M, Viña D, Picciau C, Orallo F, Santana L, Uriarte E. Synthesis and evaluation of 6-methyl-3-phenylcoumarins as potent and selective MAO-B inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*. 2004; 19: 5053–5.

Matos M, Viña D, Quezada E, Picciau C, Delogu G. Orallo F, et al. A new series of 3-phenylcoumarins as potent and selective MAO-B inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*. 2009; 19: 3268-70

Matos MJ, Rodríguez-Enríquez F, Vilar S, Santana L, Uriarte E, Hripcsak G, et al. Potent and selective MAO-B inhibitory activity: amino-versus nitro-3-arylcoumarin derivates. Bioorg Med Chem Lett. 2015; 25: 642-8

Matos MJ, Vilar S, Gonzalez-Franco RM, Uriarte E, Santana L, Friedman C, et al. 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*. 2013; 63: 151-61.

Mazzio E, Soliman KF. Whole genome expression profile in neuroblastoma cells exposed to 1-methyl-4-phenylpyridine. *Neurotoxicology*. 2012; 33: 1156-69

Mendoza N. Farmacología médica. México: Ed. Médica Panamericana; 2008.

Meotti F, Ardenghi J, Pretto J, Souza M, Ávila M, Janaína J, et al. Antinociceptive properties of coumarins, steroid and dihydrostyryl-2-pyrones from Polygala sabulosa (Polygalaceae) in mice. *J Pharm Pharmacol*. 2006; 58: 107-12.

Molina-Jimenez MF, Sánchez-Reuz MI, Andres D, Cascales M, Benedi J. Neuroprotective effect of fraxetin and myricetin against rotenone-induced apoptosis in neuroblastoma cells. *Brain Res*. 2004; 1009: 9-16.

Molina-Jimenez MF, Sánchez-Reuz MI, Benedi J. Effect of fraxetin and myricetin on rotenone-induced cytotoxicity in SH-SY5Y cells: comparison with N-acetylcysteine. *Eur J Pharmacol*. 2003; 472: 81-7

Montaner J. Fisiopatología de la isquemia cerebral. Barcelona: Marge Medica Books; 2007

Norris B, Neumann V, Gonzalez C, Quevedo L. Neurofisiología. Chile: Universidad de Concepción; 1997

OECD. Guideline for testing of chemicals. Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method, 2001.

Palhagen S, Heinonen E, Hagglund J, Kaugesaar T, Maki-Ikola O, Palm R, et al. Selegiline slows the progression of the symptoms of Parkinson disease. *Neurology*. 2006; 66: 1200-6.

Pereira E, Lucetti D, Barbosa-Filho J, de Brito E, Monteiro V, Patrocínio M. et al. Coumarin effects on amino acid levels in mice prefrontal cortex and hippocampus. *Neurosci Lett*. 2009; 454: 139-42.

Pérez J. Manual de Patología General. 6 ed. Barcelona: Masson, S.A.; 2006.

Philippens I. Non-human primate models for Parkinson's disease. *Drug Discov Today Dis Models*. 2008; 5: 105-11.

Rang H, Dale M, Ritter J, Flower R. Farmacología. 6 ed. Barcelona: Elsevier; 2008.

Rehman S, Chohan Z, Gulnaz F, Supuran C. In-vitro antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of some coumarins and their metal complexes. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2005; 20: 333-40.

Rojo A. Terapias neurotróficas en modelos de parkinsonismo en roedores y primates no humanos. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. 2001

Sánchez-Reuz MI, Iglesias I, Molina-Jimenez MF. Fraxetin prevents rotenone-induced apoptosis by induction of endogenous glutathione in human neuroblastoma cells. *Neurosci Res*. 2005; 53: 48-56.

Santana L, Gonzalez-Diaz H, Quezada E, Uriarte E, Yañez M, Viña D, et al. Quantitative structure-activity relationship and complex network approach to monoamine oxidease A and B inhibitors. J Med Chem. 2008; 51: 6740-51.

Seetapun S, Yaoling J, Wang Y, Zhu Y. Neuroprotective effect of Danshensu derivatives as anti-ischaemia agents on SH-SY5Y cells and rat brain. Biosci Rep. 2013; 33: 677-88.

Segura T, Galindo M, Rallo-Gutierrez B, Ceña V, Jordan J. Dianas farmacológicas en las enfermedades neurodegenerativas. *Rev Neurol*. 2003; 36: 1047-57.

Shimazu S, Tamashiro A, Yoneda F, Knoll J. The L-DOPA-sparing effect of R-(–)-1-(benzofuran-2-yl)-2-propylaminopentane hydrochloride [(–)-BPAP] in reserpine-pretreated rats. *Life Sci.* 2003; 72: 1413-9

Smeyne M, Smeyne RJ. Glutathione metabolism and Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med*. 2013; 62: 13-25.

Song JX, Choi MY, Wong KC, Chung WW, Sze SC, Ng TB, et al. Baicalein antagonizes rotenone-induced apoptosis in dopaminergic SH-SY5Y cells related to Parkinsonism*. Chin Med*. 2012; 7:1-9.

Song JX, Sze SC, Ng TB, Lee CK, Leung GP, Shaw PC, et al. Anti-Parkinsonian drug Discovery from herbal medicines: what have we got from neurotoxic models?. *J Ethnopharmacol*. 2012; 139: 168-711

Sotnikova TD, Budygin EA, Jones SR, Dykstra LA, Caron MG, Gainetdinov RR. Dopamine transporter-dependent and -independent actions of trace amine β-phenylethylamine. *J Neurochem*. 2004; 91: 362-73.

Stephenson AP, Schneider JA, Nelson BC, Atha DH, Jain A, Soliman KF, et al. Manganese-induced oxidative DNA damage in neuronal SH-SY5Y cells: Attenuation of thymine base lesions by glutathione and N-acetylcysteine. *Toxicol Lett*. 2013; 218: 299-307

Subhas-Bose D, Rudradas AP, Hari-Babu M. The indium (III) chloride-catalyzed von Pechmann reaction: a simple and effective procedure for the synthesis of 4-substituted coumarins. *Tetrahedron Lett*. 2002; 43: 9195-7.

Suckow M., Weisbroth S. y Franklin C. The Laboratory Rat. 2ª ed. London: Elsevier Academic Press, 2006.

Tadaiesky MT, Andreatini R, Vital MA. Different effects of 7-nitroindazole in reserpine-induced hypolocomotion in two strains of mice. *Eur J Pharmacol.* 2006; 535: 199-207

Teixeira AM, Trevizol F, Colpo G, Garcia SC, Charao M,Pereira RP, et al. Influence of chronic exercise on reserpine-induced oxidative stress in rats: Behavioral and antioxidant evaluations. *Pharmacol Biochem Behav*. 2008; 88: 465-72.

Thomsen R, Christensen MH. MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking. *J Med Chem*. 2006; 1;49(11):3315-21.

Velasquez L, Lorenzo P, Moreno A, Lizasoain I, Leza J, Moro M Portolés A. Farmacologia básica y clínica. 18 ed. Madrid: Ed. Médica Panamericana; 2008.

Vergel N. Estudio de la actividad anticonvulsivante de metabolitos secundarios tipo cumarina. Tesis doctoral. Universidad de Nacional de Colombia, 2010a.

Vergel N, López J, Viña D, Buitrago D, Guerrero M. Síntesis de cumarinas com actividad inhibitoria sobre monoamino-oxidasa. XXIX Congreso latinoamericano de química XVI Congreso colombiano de química – VI Congreso colombiano de cromatografía. 2010b.

Vergel N, López J, Orallo F, Viña D, Buitrago D, Olmo E, et al. Antidepressant-like profile and MAO-A inhibitory activity of 4-propyl-2H-benzo[h]- chromen-2-one. *Life Sciences*. 2010c; 86: 819–24

Vogel H G. Drug Discovery and evaluation. 2 ed. Alemania: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2002.

Wallace A C, Laskowski R A, Thornton J M. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Eng*. 1996; 8: 127-134

Watabe M, Nakaki T. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone-elicited dopamine redistribution from vesicles to cytosol in human dopaminergic SH-SY5Y cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007; 323: 499-507.

Weinreb O, Amit T, Bar-Am O, Youdim M. Rasagiline: A novel anti-Parkinsonian monoamineoxidase-B inhibitor with neuroprotective activity. *Prog Neurobiol*. 2010; 92: 330-44.

World Health Organization. Neurological disorders: public health challenges. Geneva: World Health Organization; 2006.

Youdim MB, Fridkin M, Zheng H. 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*. 2005; 126: 317-26.

Youdim MB, Tipton KF. 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. 2002; 8: 247-53.

Zhang Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*. 2008; 9: 40.