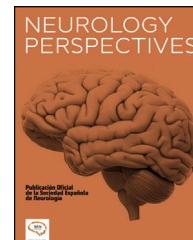




NEUROLOGY PERSPECTIVES

www.journals.elsevier.com/neurology-perspectives



ORIGINAL

Disminución de las discinesias en un modelo de Parkinson en ratas Wistar, mediada por el fitofármaco *Mucuna pruriens*



Phytopharmaceutical *Mucuna pruriens* reduces dyskinesia in a Parkinson's disease model in Wistar rats

J.C. Guzman*, C.A. Otalora, P. Caro, E.L. Mayorga, J.P. Alcazar y L.F. Turner

Universidad del Tolima, Tolima, Colombia

Recibido el 14 de enero de 2021; aceptado el 2 de marzo de 2021
 Disponible en Internet el 5 de marzo de 2021

PALABRAS CLAVE

Enfermedad de Parkinson;
 Discinesias;
 L-Dopa;
 Movimientos involuntarios anormales;
Mucuna pruriens

Resumen La enfermedad de Parkinson (EP) es una enfermedad neurodegenerativa cuyo tratamiento sintomático más eficaz es la L-dopa, sin embargo, puede inducir discinesias (DIL). La *Mucuna pruriens* (Mp) ha demostrado propiedades efectivas para el tratamiento de la EP reduciendo la DIL. Se comprobó la disminución de las discinesias en un modelo de Parkinson y discinesia en ratas Wistar tratadas con Mp. Se manipularon 28 machos, distribuidos en 4 grupos: Control, DIL, L-MP1 (Mp 75 mg/kg) y L-MP2 (Mp 150 mg/kg). La EP se indujo con 6-hidroxidopamina y la discinesia se provocó mediante inyección de L-Dopa y benserazida.

Se analizaron 4 tipos de movimientos involuntarios anormales (MIA); axial, miembro anterior, orolingual y locomotor, que disminuyeron significativamente en los grupos tratados con Mp: discinesia axial L-Mp1 $x=0,05$ y DIL $x=1,60$; miembro anterior L-Mp1 $x=1,28$ y DIL $x=2,06$; orolingual L-Mp1 $x=0,18$ y DIL $x=1,34$; locomotor L-Mp1 $x=0,17$ y DIL $x=1,17$. Se puede concluir que la Mp disminuye la frecuencia de las discinesias dependiendo de la topografía y dosis administrada.

© 2021 Sociedad Española de Neurología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

KEYWORDS

Parkinson's disease;
 Dyskinesia;
 Levodopa;
 Abnormal involuntary movements;
Mucuna pruriens

Abstract Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disease for which the most effective symptomatic treatment is levodopa; however, the drug can induce dyskinesia (levodopa-induced dyskinesia; LID). *Mucuna pruriens* (Mp) has shown to be effective for the treatment of PD by reducing the rate of LID. We tested this reduction in dyskinesia in a model of PD and dyskinesia in Wistar rats treated with Mp. We manipulated 28 male animals, distributed in 4 groups: control, LID, L-MP1 (Mp at 75 mg/kg), and L-MP2 (Mp at 150 mg/kg). PD was induced

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: juliancamiloguzman@gmail.com (J.C. Guzman).

with 6-hydroxydopamine, and dyskinesia was induced with injection of levodopa and benserazide. We analysed 4 types of abnormal involuntary movements: axial, forelimb, orolingual, and locomotor. All 4 types of movements decreased significantly in the groups treated with Mp: axial dyskinesia (L-Mp1, $x=0.05$, vs LID, $x=1.60$); forelimb (L-Mp1, $x=1.28$, vs LID, $x=2.06$); orolingual (L-Mp1, $x=0.18$, vs LID, $x=1.34$); locomotor (L-Mp1, $x=0.17$, vs LID, $x=1.17$). We may conclude that Mp reduces the frequency of dyskinesia depending on the topography dose administered.

© 2021 Sociedad Española de Neurología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Introducción

La enfermedad de Parkinson (EP) es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común en el mundo después de la enfermedad de Alzheimer; normalmente la EP es más usual en hombres que en mujeres y el riesgo aumenta con la edad^{1,2}. Esta patología se caracteriza por la pérdida progresiva y selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra (SN)^{3,4}.

Actualmente el tratamiento más utilizado y eficaz en la EP es la administración del precursor de dopamina L-Dopa^{5,6}. En las primeras etapas, este tratamiento alivia la mayoría de los déficits motores que caracterizan la EP, pero está asociado con efectos secundarios como son las complicaciones motoras (fluctuaciones motoras y discinesias)^{6,7}. La discinesia inducida por L-Dopa (DIL) se produce durante el tratamiento en pacientes con EP y se determina por la frecuencia de movimientos involuntarios anormales (MIA) tales como corea (movimientos hiperkinéticos, sin propósito) o distonía (contracciones sostenidas, anormales musculares)⁸.

En vista de los efectos adversos (discinesia) ocasionados por el L-Dopa, se han realizado investigaciones acerca de nuevos tratamientos basados en la etnomedicina, en donde el polvo de semilla de *Mucuna pruriens* (Mp) se ha utilizado como un agente anti-inflamatorio⁹ y como un tratamiento para diferentes enfermedades mediadas por radicales libres como el envejecimiento, artritis reumatoide, diabetes y enfermedades neurodegenerativas¹⁰, en cuyo caso el uso de Mp no genera discinesia¹¹, por lo que se quiere comprobar con el presente estudio, si la *Mucuna pruriens* no genera discinesias durante el tratamiento para la EP y posiblemente surja como una alternativa viable para mejorar la calidad de vida de los pacientes con EP.

Materiales y métodos

Animales de experimentación

Se utilizaron 28 ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) macho de 250 a 350 g de peso corporal, las cuales fueron mantenidas en condiciones estandarizadas en el Bioterio de experimentación animal de la Universidad del Tolima. Los experimentos fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad del Tolima y cumplieron con las normas dictadas

por el National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 80-23).

Diseño experimental

Los animales fueron distribuidos homogéneamente en 4 grupos: Control intacto, DIL (lesionados unilateralmente con 6-OHDA y posterior tratamiento de L-Dopa/benserazida) (Sigma-Aldrich® Lote #BCBL4153 V), L-MP1 (lesionados unilateralmente con 6-OHDA y posterior tratamiento con Mp 75 mg/kg) y L-MP2 (lesionados unilateralmente con 6-OHDA y posterior tratamiento con Mp 150 mg/kg) (BONUSAN España). A los 3 meses de edad los animales fueron anestesiados con una dosis conjunta de ketamina y xilacina (Ketamina 50 µg/kg/ Xilacina 20 µg/kg de peso corporal) y posteriormente fueron sometidas a una inyección con 6-OHDA en la sustancia nigra pars compacta (SNpc) (3 µl de una solución de 6-OHDA- HCl-8ug/3 µl de solución salina (Sigma, Chemical Co. EE. UU., H-4381)) con el fin de lograr una lesión de la vía nigroestriatal en las coordenadas estereotáxicas: AP = -4,4, ML = +1,2 mm DV = -7,8 mm¹².

Un mes después de realizada la lesión, los animales realizaron un ensayo de rotación inducido por apomorfina (0,5 mg/kg) (Sigma-Aldrich®). De los 21 animales que presentaron más de 7 vueltas contralaterales a la lesión por minuto, 7 animales se trataron con L-Dopa (6 mg/kg) y benserazida (12 mg/kg). Por vía intraperitoneal i.p. (Sigma-Aldrich®. Lote #BCBL4153 V) diariamente durante 19 días para poder inducir la discinesia y llegar a un nivel estable de MIA¹³ y 14 animales con el fitofármaco *Mucuna pruriens* (BONUSAN España) a 2 dosis diferentes, una a 75 mg/kg y la otra a 150 mg/kg, con una administración i.p. diaria de 19 días, con el fin de observar si los animales tratados con las diferentes dosis mostraban algún o ningún nivel de MIA para cada grupo experimental. Todos los procedimientos de tipo comportamental fueron llevados a cabo en horas de la mañana (8:00-11:00).

Análisis comportamental

Se realizó una batería de pruebas de comportamiento de los MIA, que consiste en la observación y grabación de animales (1 hora con intervalos de descanso de 5 min)¹⁴ en una caja transparente de acrílico circular de 50 cm de diámetro y 30 cm de altura. Los MIA fueron evaluados mediante

la escala de discinesia en ratas descrita por Cenci et al.¹⁵⁻¹⁷ teniendo en cuenta 4 categorías: 1. Axial, incluye torsión distónica o coreiforme del tronco y el cuello hacia el lado contralateral a la lesión; 2. Miembro anterior, caracterizado por movimientos repetitivos y rítmicos o postura distónica de la extremidad anterior en el lado contralateral a la lesión; 3. Orolingual, incluye espasmos de los músculos orofaciales con movimientos masticatorios sin sentido y protrusión de la lengua hacia el lado contralateral a la lesión y 4. Locomotor, caracterizado por el aumento de locomoción con sesgo hacia el lado contralateral a la lesión^{14,15,18,19}.

La gravedad de cada categoría de MIA se evaluó mediante las puntuaciones de 0 a 4 (1: ocasional, es decir, presente menos del 50% del tiempo; 2: frecuente, es decir, presente más del 50% del tiempo; 3: continua, pero interrumpido por un fuerte estímulo sensorial; 4: continuo, no interrumpido por fuertes estímulos sensoriales)^{18,20}.

Inmunofluorescencia

Los animales empleados en el estudio fueron sacrificados después de terminar los tratamientos y evaluaciones comportamentales, con una sobredosis de pentobarbital (50 mg/kg, i.p), inmediatamente fueron perfundidos por el método de gravedad utilizando solución salina al 0,9% y paraformaldehído al 4% (PFA 4% Sigma-Aldrich). Los cerebros extraídos se sometieron a un proceso de deshidratación con sacarosa (Sucrosa Sigma-Aldrich), para ser cortados posteriormente en secciones coronales de 50 µm de grosor en un Micrótopo KEDGE 33-58, y luego para llevar a cabo la inmunofluorescencia, se escogieron los cortes correspondientes a los bregmas: -0,96, -1,8, -3,72 y -4,68¹², se eligieron 4 cortes por placa, correspondientes a cada animal y a cada bregma, con 2 réplicas por animal. Analizando las siguientes áreas: estriado, haz medial del cerebro anterior (CAM) y SNpc, para observar diferencias de inmunoreactividad en los diferentes grupos.

La inmunofluorescencia se realizó en placa, colocando 4 cortes por placa, correspondientes a cada animal y a cada bregma, utilizando triple marcaje con anticuerpos primarios para tirosina hidroxilasa (1:500; Sigma-Aldrich, EE. UU), receptor dopaminérgico D2 (1:800; Abcam, 2015) y DAPI (1:2000; Invitrogen, 2014). Como anticuerpos secundarios se usaron: Alexa flúor 488 anti rabbit polyclonal (1:500; Invitrogen, 2015) y Alexa flúor 594 anti mouse (1:500; Invitrogen, 2015).

Los cortes se fijaron con Fluoromount® (Sigma-Aldrich) para posteriormente capturar imágenes de las células inmunorreactivas con EVOS Floid® Cell Imaging Station #4471136 del Laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad del Tolima. La cuantificación del número de células positivas se hizo mediante el programa Image J Fiji (Versión 2017).

Análisis estadístico

Los resultados se analizaron utilizando el software INFOS-TAT versión 2016. Se realizó estadística descriptiva y la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para establecer el método estadístico que correspondiera a la distribución de los datos. Cuando los datos no tuvieron una distribución normal se realizó la comparación de Kruskal-Wallis. Para

datos con distribución normal se hizo un análisis de varianza ANOVA. El análisis de los MIA se evaluó mediante pruebas paramétricas y no paramétricas, respectivamente (ANOVA y Kruskal-Wallis), con la prueba post-hoc de Tukey para identificar las diferencias significativas específicas entre los grupos. La correlación entre los MIA según su distribución topográfica y el receptor D2 fue ejecutada mediante correlación lineal y coeficiente de correlación de Pearson. Se trabajó con un nivel de significación de 0,05.

Resultados

Validación del modelo 6-OHDA

Los animales lesionados cumplieron con el número mínimo de vueltas (7 vueltas/min) contralaterales a la lesión reportada para el establecimiento de los modelos de 6-OHDA, mostrando un máximo de rotaciones equiparable. Asimismo, la lesión unilateral en el hemisferio derecho por inyección intracerebral de la neurotoxina 6-OHDA produjo una pérdida drástica de cuerpos celulares inmunorreactivos a la enzima TH alrededor del sitio de inyección SNpc, en donde se observó que el grupo control presentó diferencias significativas en el número de células TH+ en las tres zonas de estudio (estriado, CAM y SNpc) especialmente en la SNpc $x = 133,25$ ($p < 0,05$, $F = 86,95$) con una diferencia relevante con los demás grupos: DIL $x = 23,25$, L-Mp1 $x = 29,25$ y L-Mp2 = 18,75 (fig. 5).

Tratamiento crónico con L-Dopa y el fitofármaco *Mucuna pruriens*, evaluado por la prueba conductual de MIA

El tratamiento crónico con L-Dopa y Mp indujo de manera gradual el desarrollo de movimientos involuntarios anormales en los grupos DIL, L-Mp1 y L-Mp2. Observamos y cuantificamos 4 tipos diferentes de MIA: axial, miembro anterior, orofacial y locomotor (fig. 1). Estos movimientos se manifestaron con un patrón repetitivo que tuvo diferencia de un animal a otro. No todos los animales que recibieron el tratamiento desarrollaron discinesia con la misma frecuencia ni al mismo tiempo después de iniciado el tratamiento. Sin embargo, todos los animales que desarrollaron discinesias presentaron los 4 tipos de movimientos involuntarios anormales analizados, aunque con gran variabilidad en la frecuencia.

Los 4 grupos de tratamientos mostraron diferencias relevantes para cada tipo de MIA, en donde la discinesia axial fue la más frecuente, resaltando primordialmente las diferencias significativas que arrojó la prueba de Kruskal-Wallis y ANOVA junto con la prueba post-hoc de Tukey, $p < 0,0001$, entre los grupos L-Mp1 y DIL para cada tipo de MIA con los siguientes valores: discinesia axial L-Mp1 $x = 0,05$ y DIL $x = 1,60$; miembro anterior L-Mp1 $x = 1,28$ y DIL $x = 2,06$; orolingual L-Mp1 $x = 0,18$ y DIL $x = 1,34$; locomotor L-Mp1 $x = 0,17$ y DIL $x = 1,17$ (fig. 2). Con respecto al tiempo, todos los MIA fueron evidentes a partir del día 5 y se estabilizaron en el día 11 en el grupo DIL, el cual tuvo diferencias significativas durante cada día de tratamiento evaluado y en cada tipo de MIA a excepción del miembro anterior con el grupo

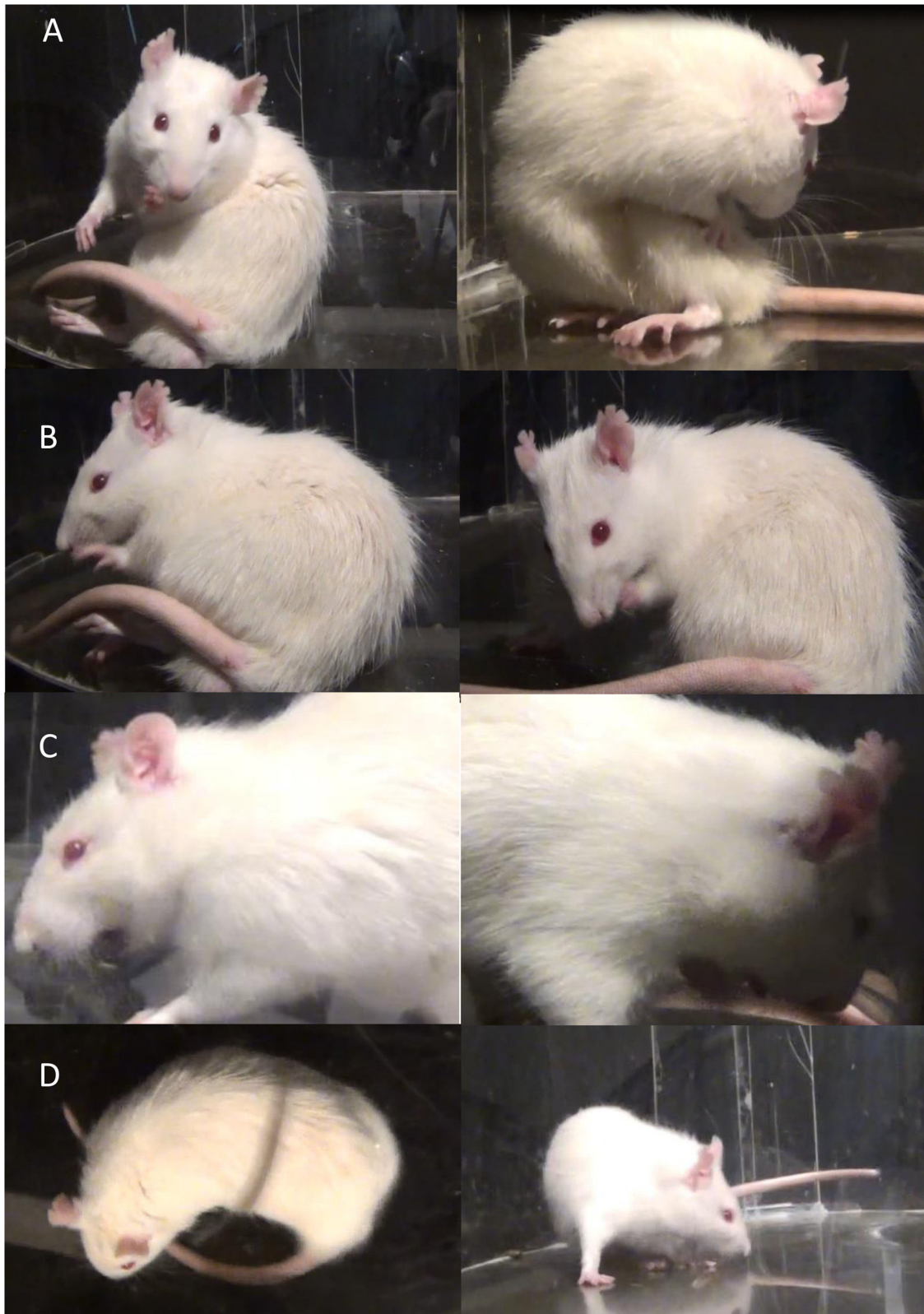


Figura 1 Movimientos involuntarios anormales estudiados en ratas Wistar, según la distribución topográfica. A. Discinesia axial. B. Discinesia de miembro anterior. C. Discinesia orolingual. D. Discinesia locomotora.

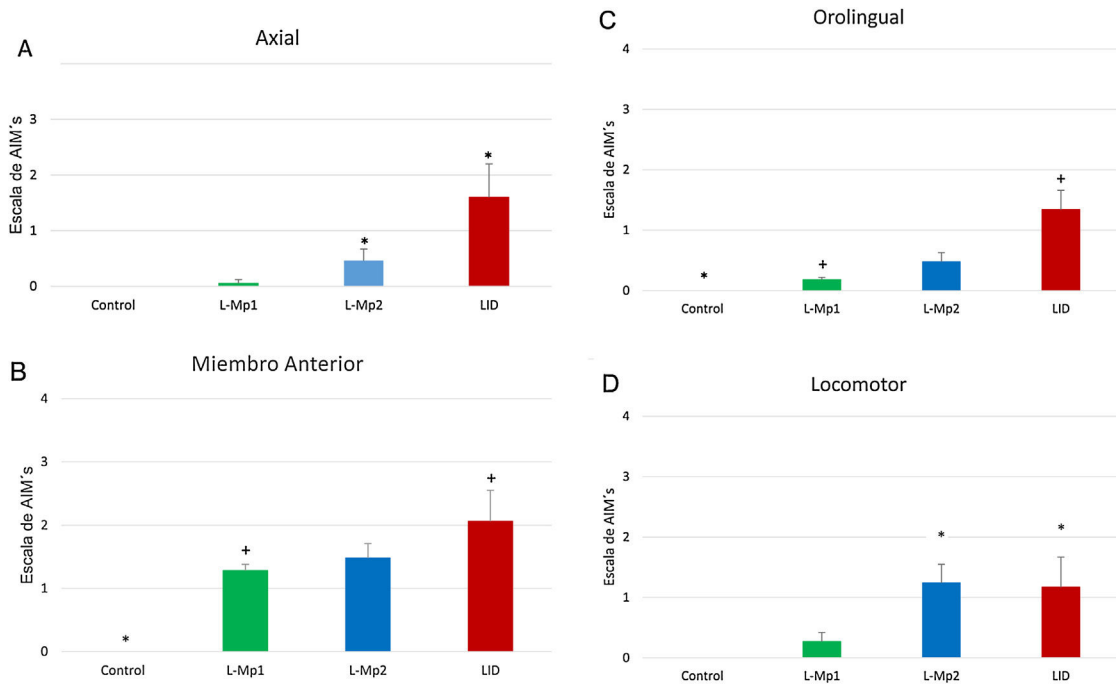


Figura 2 Evaluación de la frecuencia de los MIA en los cuatro grupos de estudio. **A.** Discinesia axial (Kruskal Wallis $p < 0,0001$). **B.** Discinesia de miembro anterior (Kruskal Wallis $p < 0,0001$). **C.** Discinesia orolingual (Prueba de Kruskal Wallis $p < 0,0001$). **D.** Discinesia locomotora (ANOVA $p < 0,0001$). *Diferencia significativa con los grupos Control y L-Mp1. Las columnas y símbolos representan la media \pm SD (n=7).

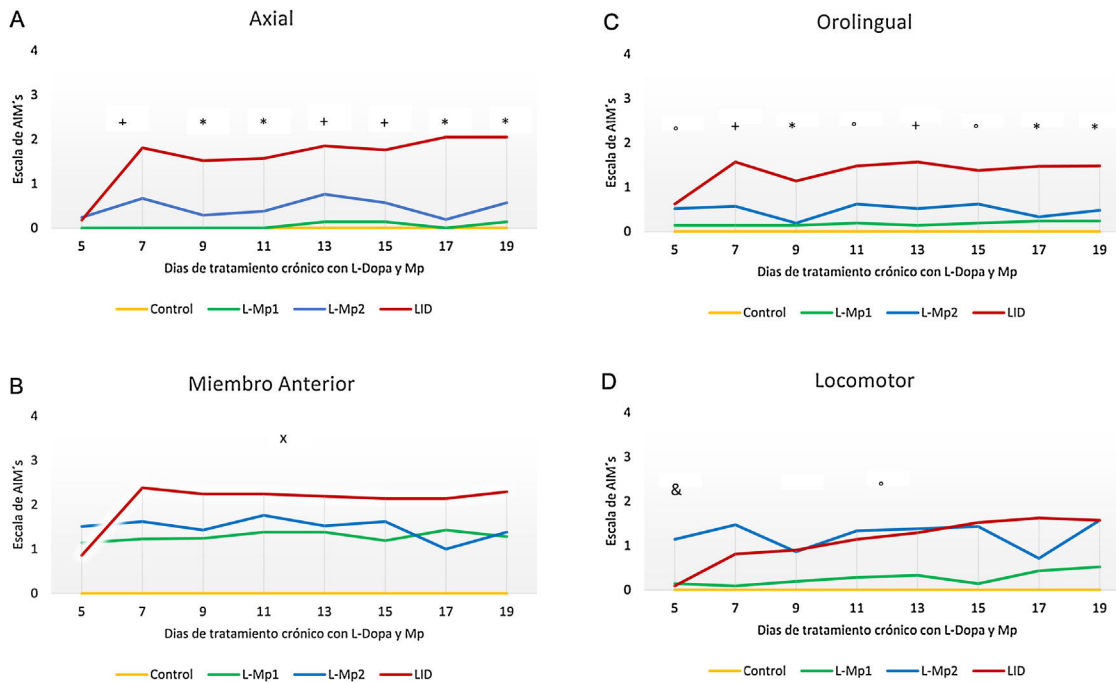


Figura 3 Evolución en el tiempo de la presencia de MIA inducidos por tratamiento crónico con L-Dopa y Mp en ratas parkinsonizadas. **A.** Discinesia axial (Kruska Wallis $P < 0,05$). **B.** Discinesia de miembro anterior (Kruska Wallis $P < 0,05$). **C.** Discinesia orolingual (Kruska Wallis $P < 0,05$). **D.** Discinesia locomotora (ANOVA $P < 0,05$). *Diferencia significativa entre el grupo LID vs L-Mp1, L-Mp2 y Control. +Diferencia significativa del grupo DIL con el Control y L-Mp1. xDiferencia significativa entre el grupo Control y L-Mp1, L-Mp2, LID. °Diferencia significativa del grupo Control con L-Mp2 y Mp1 con LID. &Diferencia significativa entre el grupo Control y L-Mp2. Los puntos y símbolos representan la media \pm SD (n=7).

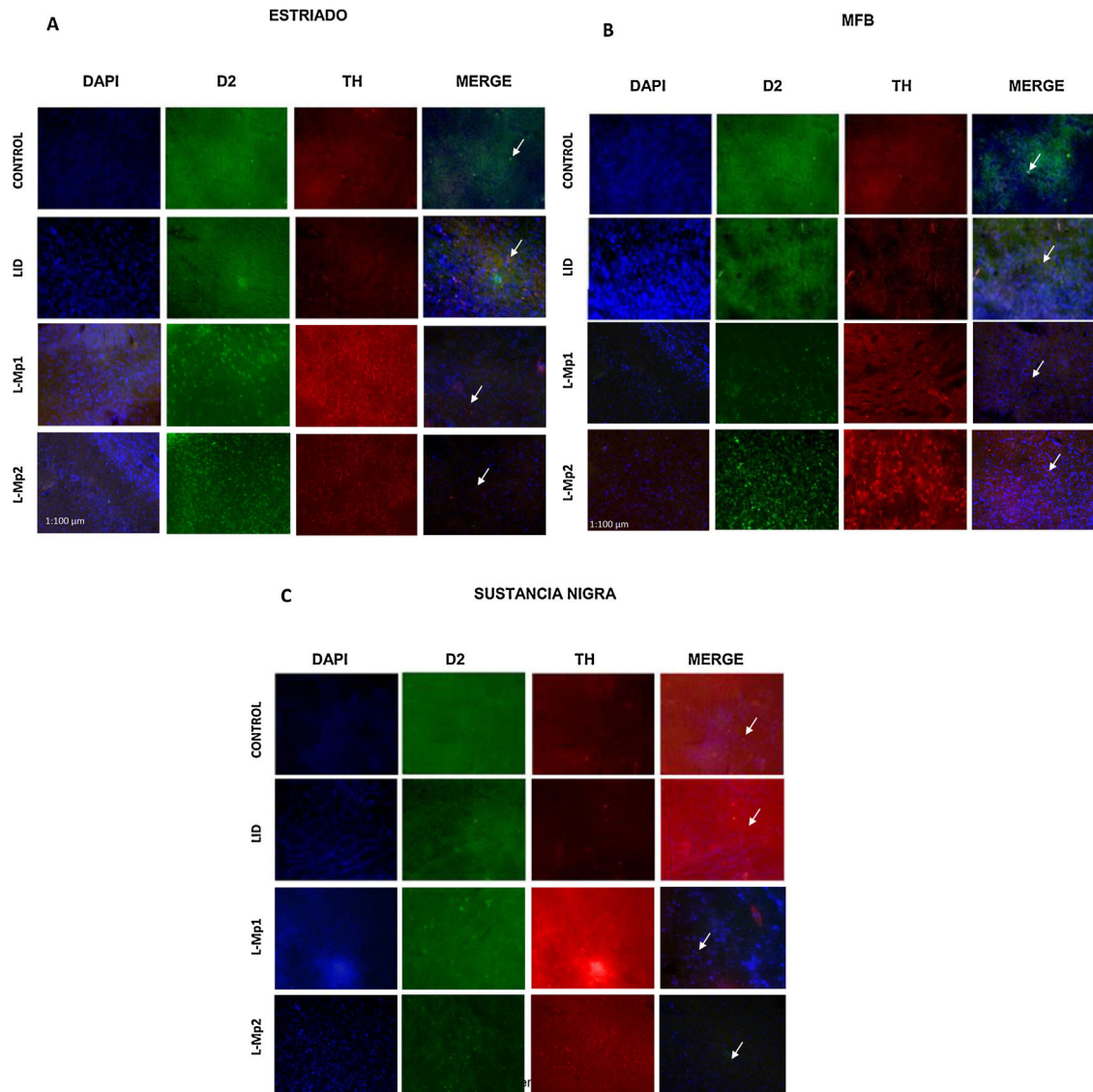


Figura 4 Inmunofluorescencia de cada grupo con triple marcaje: DAPI, tirosina hidroxilasa (TH) y el marcador RD2 para cada una de las zonas de estudio. A. Estriado (ST) B. Haz medial del cerebro anterior (CAM). C. Sustancia nigra pars compacta (SNpc). *Las flechas indican las células con triple marcaje (neuronas dopaminérgicas con la expresión del receptor D2).

L-Mp1 (fig. 3). Cabe resaltar la frecuencia elevada del MIA locomotor ($x=1,24$) en el grupo L-Mp2 a partir del día 11 (fig. 3).

Inmunofluorescencia

Determinación y distribución de la enzima tirosina hidroxilasa (TH). Los cortes de las 3 zonas de estudio (estriado, CAM y SNpc) en los animales de experimentación mostraron un número menor de células TH+ (figs. 4 y 5); en comparación, el grupo control fue el que mostró el mayor número de células TH+ en cada área (estriado $x=55,25$, CAM $x=62,5$ y SNpc $x=133,25$). El ANOVA reveló que solo existen diferencias significativas de las 3 zonas del grupo control, con respecto a los demás grupos de experimentación ($p < 0,05$, estriado $F=19,99$, CAM $F=46,19$, SNpc $F=86,95$).

Determinación y distribución del receptor D2. La zona con la expresión más baja de RD2 fue la SNpc; con

respecto a los grupos, el control expresó la mayor cantidad de RD2 $x=50$ con diferencias significativas con L-Mp1 $x=30,75$, L-Mp2 $x=31,75$ y DIL $x=34,5$ ($p < 0,05$ $F=4,74$), a diferencia del estriado y la CAM con la mayor expresión del RD2 en los grupos L-Mp1 $x=212,5$ L-Mp2 $x=241,25$ DIL $x=241$, L-Mp1 $x=235,75$ L-Mp2 $x=253,25$ DIL $x=256,5$ respectivamente, demostraron con la prueba de Tukey, diferencias significativas frente al grupo control $x=110,25$ y $x=128,5$ en el estriado y la CAM ($p < 0,05$, $F=86,86$ y $F=36,26$ respectivamente) (figs. 4 y 5).

Correlación entre la expresión del receptor dopaminérgico D2 y manifestación de MIA

El MIA axial tuvo una correlación positiva en los grupos DIL ($r^2=0,97$), L-Mp1 ($r^2=0,98$) y L-Mp2 ($r^2=0,97$) con el estriado, y además el grupo L-Mp1 ($r^2=0,95$) presentó correlación con la zona CAM; para el MIA de miembro anterior no

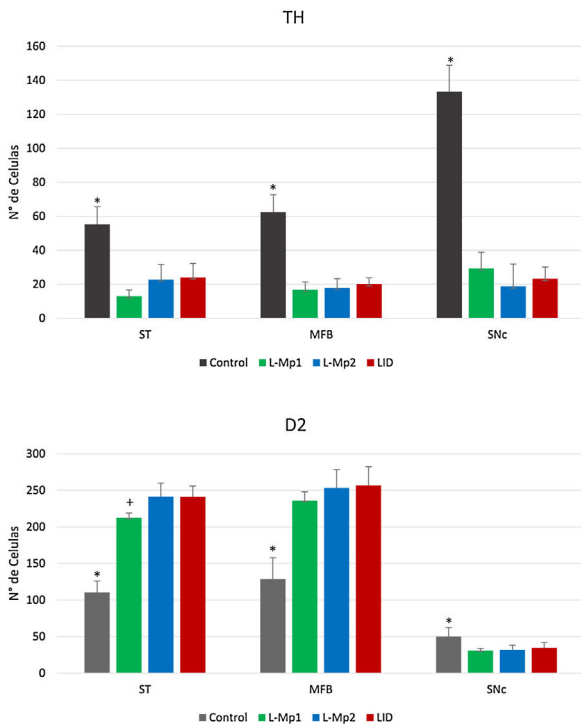


Figura 5 Comparación del número de células marcadas con tirosina hidroxilasa (TH) y receptores D2, en los grupos Control, L-Mp1, L-Mp2 y LID en el Estriado, haz medial del cerebro anterior y sustancia nigra pars compacta. (ANOVA $p < 0,05$). *Diferencia significativa presente con el grupo control. +Diferencia significativa con el grupo L-Mp1). Las columnas y símbolos representan la media \pm SD.

se evidenció una correlación en el grupo DIL, pero sí se evidenció una correlación entre el grupo L-Mp1 ($r^2 = 0,99$) con la SNpc y del grupo L-Mp2 con el estriado ($r^2 = 0,95$) y la SNpc ($r^2 = 0,99$). En el caso del MIA orolingual solo se encontró correlación entre el grupo L-Mp2 ($r^2 = 0,96$) con la SNpc y el grupo DIL con el estriado ($r^2 = 0,97$) y la CAM ($r^2 = 0,96$). Finalmente el MIA locomotor exhibió una correlación positiva para el grupo L-Mp2 con el estriado ($r^2 = 0,99$) y el grupo DIL con la zona estriada ($r^2 = 0,98$) y CAM ($r^2 = 0,96$) (fig. 6).

Discusión

La EP se caracteriza por la destrucción progresiva y selectiva de las neuronas dopaminérgicas de la SNpc, lo que ocasiona fallas motoras^{3,4}. La alternativa más eficaz en disminuir los déficits motores de la EP hasta el momento es el precursor dopaminérgico L-Dopa. Sin embargo, la L-Dopa ocasiona a largo plazo MIA conocidos como DIL⁸. Dependiendo del grado de degeneración de las neuronas dopaminérgicas²¹, la DIL puede aparecer en un 30% de los pacientes con EP a los 5 años de tratamiento y en el 59% tras 10 años con el fármaco²²⁻²⁴.

Por lo tanto, la DIL es un reto científico que surge a raíz del tratamiento para la EP, por esta razón en el presente estudio se realizó un tratamiento crónico con Mp y L-Dopa en uno de los modelos de rata parkinsonizada más usado, evaluado y estandarizado. El modelo de lesión con 6-OHDA en SNpc induce una lesión más grave y rápida²⁵⁻²⁹, reproduciendo muchas de las características fisiológicas desde

el punto de vista experimental, por lo cual es muy valioso para la evaluación del efecto fisiológico de determinadas sustancias que puedan ser una alternativa para mejorar los síntomas parkinsonianos sin generar efectos secundarios. El modelo de parkinson con 6-OHDA induce cambios neuroquímicos y electrofisiológicos en el sistema nigroestriado que intentan compensar el déficit de DA inducido por la pérdida de neuronas dopaminérgicas. De hecho, se ha descrito un aumento en la cantidad de DA liberada en el estriado por las terminales dopaminérgicas existentes y un incremento en el número de receptores dopaminérgicos estriatales postsinápticos³⁰. Este incremento aparece únicamente cuando la pérdida de neuronas dopaminérgicas es superior al 90% y tiene lugar 4 semanas tras la denervación dopaminérgica^{31,32}. En general, la mayoría de los trabajos publicados demuestran que el fenómeno de hipersensibilidad por denervación, o «up-regulation», afecta preferentemente a los receptores dopaminérgicos estriatales D2^{30,33}, como se observa en los resultados obtenidos en este estudio (figs. 4 y 5), lo cual indica que los animales que fueron lesionados con 6-OHDA mostraron un deterioro motor severo que se comprobó mediante la prueba de rotación con apomorfina, presentando un número mayor a 7 vueltas/min, esta rotación se relaciona con el incremento del número de receptores dopaminérgicos que existe en el estriado homolateral a la lesión como consecuencia de la denervación³⁴. Además, las zonas (SNpc, CAM y ST) analizadas evidencian una muerte del 80 al 90% en los cuerpos neuronales, de todos los grupos evaluados a excepción del grupo control. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos DIL, Mp1 y Mp2 en relación con la restauración de las fibras neuronales.

Nuestros resultados evidencian que el tratamiento crónico con L-Dopa y Mp induce la aparición de una serie de MIA que afectaron cabeza, tronco y extremidades³⁵. En esta investigación los MIA aparecieron en el momento de máxima efectividad del tratamiento (pico de dosis); en comparación los animales tratados con Mp también mostraron MIA pero con una frecuencia más baja, lo cual cambió según las dosis de Mp utilizadas en este estudio y la distribución topográfica de MIA³⁶.

Es evidente en nuestros resultados que el tratamiento crónico con Mp induce discinesia más leve que L-Dopa^{11,36-38}, pero no sabemos cuál es el efecto sobre la movilidad del animal, o si las dosis de L-Dopa más bajas tendrían un efecto similar. Las dosis son críticas para el desarrollo de discinesias. Debemos tener una equivalencia de dosis entre Mp y L-Dopa y correlacionarlos con el peso del animal. Sin embargo, otras hipótesis como la planteada por Lieu et al., 2010, proponen que la adición de benserazida a la Mp induce DIL severa. La explicación más probable para estos hallazgos es que el efecto inhibitor de benserazida en la enzima dopa Descarboxilasa (DDC) periférica permite el aumento del transporte brusco y rápido de L-Dopa natural contenida en el extracto de *Mucuna pruriens* (EMP) a través de la barrera hematoencefálica, sin ser inactivado en la sangre periférica. Este aumento de la disponibilidad de L-Dopa para el cerebro es la causa más probable de la gravedad de DIL en animales tratados con Mp + benserazida. Una explicación alternativa es que la forma natural de L-Dopa contenida en Mp en combinación con uno o más agentes naturales protege la rápida descarboxilación por DDC y permite el

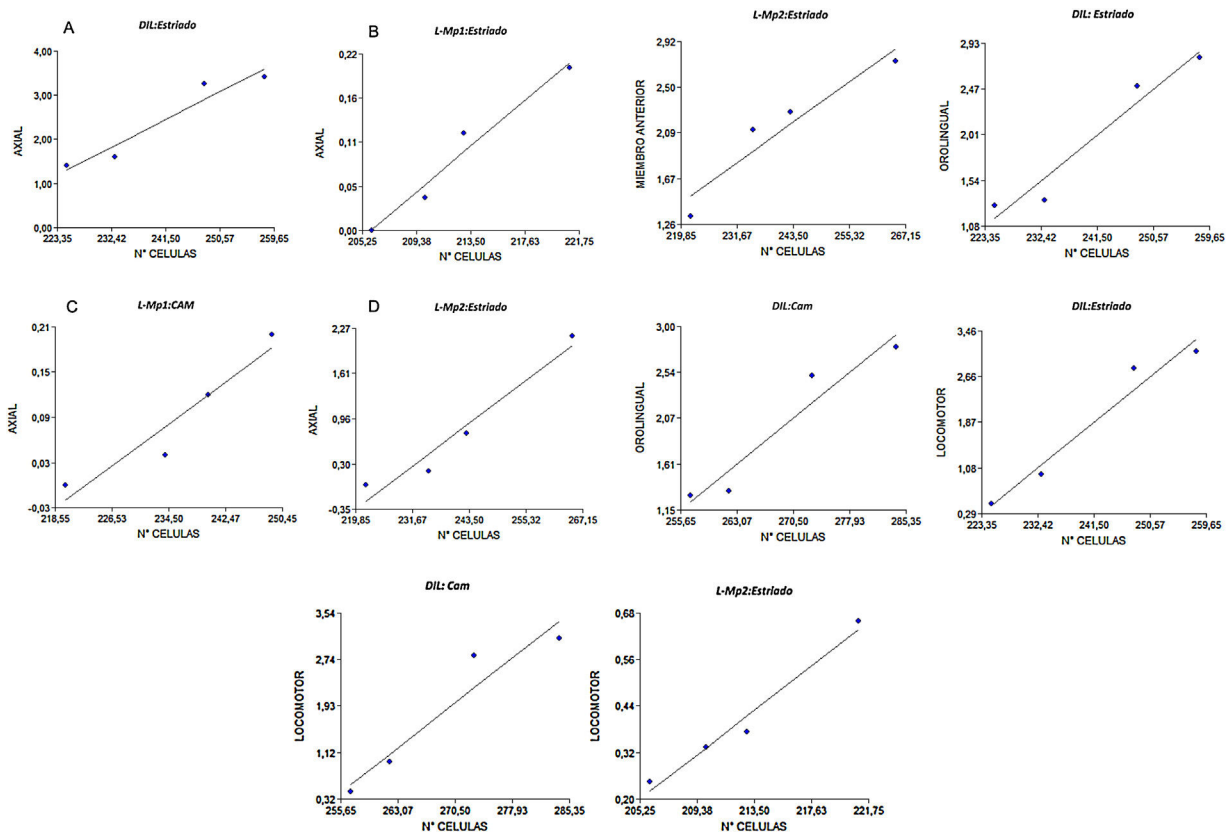


Figura 6 Coeficiente de correlación de Pearson entre los resultados histológicos y los movimientos involuntarios anormales según la distribución topográfica.

transporte gradual a través de la barrera hematoencefálica. Una tercera posibilidad es que la Mp puede tener agentes antidiscinéticos naturales para evitar o mitigar DIL y que la adición de benserazida a la Mp niega estos compuestos anti-DIL beneficiosos. Sin embargo, otros estudios sugieren que el tratamiento crónico con Mp no tiene ningún efecto significativo sobre el contenido de L-Dopa o dopamina y sus metabolitos en el cuerpo estriado o SN³⁹.

Adicionalmente se ha sugerido que el mecanismo de acción de Mp no se puede atribuir solo a la L-Dopa natural que contiene y que Mp tiene un mecanismo de acción único en la electrofisiología de los ganglios basales que es diferente de la L-Dopa cuando se prueba a dosis equivalentes⁴⁰. En la actualidad se conoce que la Mp tiene más de 50 componentes identificados hasta la fecha³⁹; no obstante, es muy complejo, largo y costoso identificar el componente individual, cantidad exacta o combinación de componentes de Mp responsable por la reducción de las discinesias⁴⁰.

En el presente estudio, se confirma que la *Mucuna pruriens* en dosis específicas presenta una discinesia significativamente más baja en frecuencia; este efecto posiblemente se debe no solo al 5% de L-Dopa natural contenido en Mp sino a la sinergia de todos los metabolitos presentes en Mp; también podemos reafirmar que el efecto reductor de las discinesias por parte de la Mp se puede dar fácilmente sin el uso de inhibidores de la Dopa descarboxilasa^{11,36–38,41,42}.

Ahora bien, y a pesar de que los MIA son la consecuencia más evidente del tratamiento tanto con la L-Dopa como con la Mp, no es claro el mecanismo fisiológico que permita

explicarlos; sin embargo, se cree que está relacionado con la estimulación no fisiológica de receptores dopaminérgicos crónicamente denervados, donde los receptores D1 (RD1) han sido más asociados; no obstante, se ha demostrado que los receptores D2 (RD2) cumplen un papel fundamental en el fenómeno discinético⁴³.

Con base en lo planteado anteriormente y lo observado en los resultados obtenidos, podemos inferir que a pesar de que la Mp contiene L-Dopa de origen natural genera un efecto similar al causado por la L-Dopa de origen sintético en los RD2, ya que se observa una baja expresión en la SNpc y una elevada expresión del RD2 en el estriado y CAM. Lo cual se debe posiblemente a los bajos niveles de dopamina circundantes causados por la lesión, por ende, los receptores están hipersensibilizados para poder captar la poca dopamina disponible. Esta investigación soporta la idea de que agonistas de RD2 induzcan MIA en ratas, y el hecho de que los antagonistas disminuyan los MIA tiene que ver posiblemente con prevención de la estimulación de DA en un estriado denervado con receptores supersensibilizados a cualquier estimulación de DA⁴⁴. Posiblemente esta sea la razón por la cual la Mp también está generando discinesia, pero en menor medida que la causada por L-Dopa (fig. 5).

Cabe mencionar que la densidad del RD2 aumenta en animales lesionados y discinéticos⁴⁵ como se evidenció en este estudio. El RD2 está relacionado con movimientos estereotipados como la masticación en vacío y MIA orolinguales como mencionan Taylor et al.⁴⁶ Recientemente, Caro et al.⁴³ encontraron una relación del receptor D2 con movimientos

de tipo locomotor, durante el uso de L-Dopa. En tanto que, en el presente estudio, el grupo L-mp2 evidenció correlación con el MIA locomotor, al igual que el grupo DIL, y no existe diferencia en la frecuencia del MIA locomotor para estos 2 grupos. Por tal razón se podría sugerir que RD2 podría estar involucrado en el desarrollo topográfico de las discinesias.

Conclusiones

Es posible confirmar que la *Mucuna pruriens* sí disminuye la frecuencia de los MIA dependiendo de la dosis, ya que estas son críticas para el desarrollo de las discinesias; por tal motivo es importante realizar una curva dosis respuesta para poder confirmar si es este el factor principal que determina la presencia de los MIA en menor frecuencia que la generada por el tratamiento crónico con L-Dopa; pero aun así sigue siendo desconocido su mecanismo de acción, que posiblemente se debe no solo al 5% de L-Dopa natural contenido en Mp sino a la sinergia de todos los metabolitos presentes en Mp. También podemos reafirmar que el efecto de Mp se puede dar fácilmente sin el uso de inhibidores de la Dopa descarboxilasa.

Se encontró una correlación positiva entre los MIA y el RD2 en algunas zonas de estudio, por lo tanto, se puede afirmar que la aparición, frecuencia y distribución somatotópica de MIA inducidos por el tratamiento con L-Dopa y Mp también está determinada por la estimulación del RD2. De igual forma se requiere conocer el papel específico de cada uno de los receptores en la generación de discinesias inducidas por L-Dopa y Mp.

Financiación

El presente trabajo fue financiado por la Oficina de Investigaciones y Desarrollo de la Universidad del Tolima, Proyecto de código 250113.

Conflicto de intereses

Los autores señalan que no tienen conflicto de intereses.

Agradecimientos

A la Universidad del Tolima y su Oficina de Investigaciones y Desarrollo científico y al Grupo de Modelos Experimentales para las Ciencias Zoohumanas por permitir el desarrollo del presente proyecto de investigación.

Bibliografía

- Baldereschi M, Di Carlo A, Rocca W, Vanni P, Maggi S, Perissinotto E, Grigoletto F, Amaducci L, Inzitari D. Parkinson's disease and Parkinsonism in a longitudinal study: two-fold higher incidence in men. *Neurology* 2000;55:1358-63.
- Van Den Eeden SK, Tanner CM, Bernstein AL, Fross RD, Leimpe A, Bloch DA, Nelson LM. Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity. *Am J Epidemiol* 2003;157:1015-22.
- Seniuk NA, Tatton WG, Greenwood CE. Dose-dependent destruction of the coeruleus-cortical and nigral-striatal projections by MPTP. *Brain Res* 1990;527:7-20.

- McNaught KS, Perl DP, Brownell AL, Olanow CW. Systemic exposure to proteasome inhibitors causes a progressive model of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2004;56:2565-7.
- Katzung B, Masters S, Trevor A. *Farmacología básica y clínica*. 11th ed. Hill MG, editor; 2010.
- Farreras P, Rozman C. *Medicina interna* 17 2012;vol 2.:1362-4.
- Stowe R, Ives N, Clarke C, van Hilten J, Ferreira J, Hawker R. Dopamine agonist therapy in early Parkinson's disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2008;2. CD006564. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD006564.pub2>.
- Blanchet PJ, Allard P, Gregoire L, Tardif F, Bedard PJ. Risk factors for peak dose dyskinesia in 100 levodopa-treated parkinsonian patients. *Can J Neurol Sci* 1996;23:189-93.
- Hishika R, Shastry S, Shinde S, Guptal SS. Preliminary, phytochemical and anti-inflammatory activity of seeds of *Mucuna pruriens*. *Indian J Pharmacol* 1981;13:97.
- Yadav SK, Prakash J, Chouhan S, Singh SP. *Mucuna pruriens* seed extract reduces oxidative stress in nigrostriatal tissue and improves neurobehavioral activity in paraquat-induced Parkinsonian mouse model. *Neurochem Int* 2013;62:1039-47.
- Katzenschlager R, Evans A, Manson A, Patsalos PN, Ratnaraj N, Watt H, et al. *Mucuna pruriens* in Parkinson's disease: a double blind clinical and pharmacological study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry [Internet]* 2004;75:1672-7 [consultado 12u Ago 2015]. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1738871&tool=pmcentrez&rendertype=Abstract>.
- Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press; 1998.
- Pinna A, Pontis S, Morelli M. Expression of dyskinetic movements and turning behaviour in subchronic L-DOPA 6-hydroxydopamine-treated rats is influenced by the testing environment. *Behav Brain Res [Internet]* 2006;171:175-8 [consultado 2 Abr 2014]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16621048>.
- Dekundy A, Lundblad M, Danysz W, Cenci MA. Modulation of L-DOPA induced abnormal involuntary movements by clinically tested compounds: further validation of the rat dyskinesia model. *Behav Brain Res* 2007;179:76-89.
- Cenci MA, Whishaw IQ, Schallert T. Animal models of neurological deficits: how relevant is the rat? *Nat Rev Neurosci* 2002;3:574-9.
- Lundblad M, Andersson M, Winkler C, Kirik D, Wierup N, Cenci MA. Pharmacological validation of behavioural measures of akinesia and dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* 2002;15:120-32.
- Muñoz A, Li Q, Gardoni F, Marcello E, Qin C, Carlsson T, et al. Combined 5-HT1A and 5-HT1B receptor agonists for the treatment of L-DOPA-induced dyskinesia. *Brain* 2008;131:3380-94.
- Bézar E, Muñoz A, Tronci E, Pioli EY, Li Q, Porras G, et al. Anti-dyskinetic effect of amipirtoline in animal models of L-DOPA-induced dyskinesia. *Neurosci Res [Internet]* 2013;77:242-6 [consultado 24 Mar 2014]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24135129>.
- Winkler C, Kirik D, Björklund A, Cenci M. L-DOPA-induced dyskinesia in the intrastriatal 6-hydroxydopamine model of parkinson's disease: relation to motor and cellular parameters of nigrostriatal function. *Neurobiol Dis* 2002;10:165-86.
- Kumar R, Riddle L, Griffin SA, Grundt P, Newman AH, Luedtke RR. Evaluation of the D3 dopamine receptor selective antagonist PG01037 on L-dopa-dependent abnormal involuntary movements in rats. *Neuropharmacology [Internet]* 2009;56:944-55 [consultado 28 Mar 2014]. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3820009&tool=pmcentrez&rendertype=Abstract>.
- Di Monte DA, McCormack A, Petzinger G, Janson AM, Quirk MLW. Relationship among nigrostriatal denervation Parkinsonism,

- and dyskinesias in the MPTP primate model. *Mov Disord* 2000;15.:459–66.
22. Jenner P. Preventing and controlling dyskinesia in Parkinson's disease—a view of current knowledge and future opportunities. *Mov Disord* 2008;23(S 3.):S585–98.
 23. Van Garpen JA, Kumar N, Bower JH, Wegland SAJ. Levodopa associated dyskinesia risk among Parkinson disease patients in Olmstead County Minnesota, 1976 e 1990. *Arch Neurol* 2006;63:205–9.
 24. Kumar S, Prakash J, Chouhan S, Westfall S, Verma S, Deo Singh T, et al. Comparison of the neuroprotective potential of *Mucuna pruriens* seed extract with estrogen in 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced PD mice model. *Neurochem Int* 2014;65:1–13.
 25. Sachs C, Jonsson G. Mechanisms of action of 6-hydroxydopamine. *Biochem Pharmacol* 1975;24:1–8.
 26. Ungerstedt U. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol* 1968;5:107–10.
 27. Jin BK, Lacovitti L. Dopamine differentiations factors produce partial motor recovery in 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Neurobiol Dis* 1995;2:1–12.
 28. Kandel E, Schwartz J, Jessell T. *Principios de Neurociencia. 4 ed.*, 854. Madrid: ESPAÑA M-H DE, S.A.U; 2001. p. 856–7.
 29. Reum T, Olshausen F, Mazel T, Vorisek I, Morgenstern R, Syková E. Diffusion parameters in the striatum of rats with 6-hydroxydopamine-induced lesions and with fetal mesencephalic grafts. *J Neurosci Res* 2002;70:680–93.
 30. Adriana AA, Santamaría A, Königsberg MF. Modelos neurotóxicos de la enfermedad de Parkinson y disfunción mitocondrial. *Rev Educ Bioquímica* 2013;29:92–100.
 31. Blum D, Torch S, Lambeng N, Nissou M, Benabid AL, Sadoul R, et al. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP?: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 2001;65:135–72.
 32. Nussbarum R, Ellis CE. Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Engl J Med* 2003;348:1356–64.
 33. Pavón N, Bergado A, Moratalla R. Efecto de la inactivación de los receptores dopaminérgicos D2 y de la manipulación del núcleo subtalámico sobre la conducta motora en modelos de hemiparinsonismo en roedores. *Centro Internacional de Restauración Neurológica* 2006. Disponible en: <http://tesis.repo.sld.cu/443/> [tesis en internet] [Cuba].
 34. O'Keefe G, Barker RA, Caldwell MA. Dopaminergic modulation of neurogenesis in the subventricular zone of the adult brain. *Cell Cycle* 2009;15:2888–94.
 35. Astradsson A, Jenkins BG, Choi J-K, Penelope J, Halletta MAL, McDowella JS, et al. The blood–brain barrier is intact after levodopa-induced dyskinesias in parkinsonian primates—Evidence from in vivo neuroimaging studies. *Neurobiol Dis* 2009;35:348–51.
 36. Amjadkhan A, Pathan MM, Kasture AS, Kasture SB. *Mucuna pruriens* attenuates haloperidol-induced orofacial dyskinesia in rats. *Nat Prod Res Former Nat Prod Lett* 2011;25:764–71.
 37. Lieu CA, Kunselman AR, Manyam BV, Venkiteswaran K, Subramanian T. A water extract of *Mucuna pruriens* provides long-term amelioration of parkinsonism with reduced risk for dyskinesias. *Parkinsonism Relat Disord [Internet]* 2010;16:458–65 [consultado 21 Jun 2016]. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2909380&tool=pmcentrez&rendertype=Abstract>.
 38. Yasuhiro N, Tomoyoshi K, Sakata M, Koh J, Ito H. Effects of soybean ingestion on pharmacokinetics of levodopa and motor symptoms of Parkinson's disease — In relation to the effects of *Mucuna pruriens*. *J Neurol Sci* 2016;365:229–34.
 39. Manyam B, Dhanasekaran M, Hare T. Effect of antiparkinson drug HP-200 (*Mucuna pruriens*) on the central monoaminergic neurotransmitters. *Phytother Res* 2004;18:97–101.
 40. Lieu CA, Venkiteswaran K, Gilmour TP, Rao AN, Petticoffer AC, Gilbert EV, et al. The Antiparkinsonian and Antidyskinetic Mechanisms of *Mucuna pruriens* in the MPTP-Treated Nonhuman Primate. *Evid Based Complement Alternat Med [Internet]* 2012;2012:840247 [consultado 22 Nov 2014]. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3445014&tool=pmcentrez&rendertype=Abstract>.
 41. Arulkumar S, Sabesan M. The behavioral performance tests of *Mucuna pruriens* gold nanoparticles in the 1-methyl 4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine treated mouse model of Parkinsonism. *Asian Pacific J Trop Dis [Internet]* 2012;2:S499–502 [consultado 21 Jun 2016]. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2222180812602102>.
 42. Christopher A, Lieua, Milind Deogaonkarc, Roy AE, Bakay T, Subramanian. Dyskinesias Do Not Develop after Chronic Intermittent Levodopa Therapy in Clinically Hemiparkinsonian Rhesus Monkeys. *Park Relat Disord* 2012;17:34–9.
 43. Caro Aponte PA, Otálora CA, Guzmán JC, Turner LF, Alcázar JP, Mayorga EL. Correlación entre la expresión del receptor dopaminérgico D2 y presencia de movimientos involuntarios anormales (MIA) en un modelo de disquinesia en ratas Wistar hemiparinsonizadas. *Neurología [Internet]* 2018. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2017.12.005>.
 44. Velasco A. *Análisis de la interacción Dopamina-antidepresivos en conducto deferente de rata in vitro*. Universidad de Valladolid 2012.
 45. Aubert I, Guigoni C, Hakansson K, Li Q, Dovero S, Barthe N. Increased D1 dopamine receptor signaling in levodopa-induced dyskinesia. *Ann Neurol* 2005;57:17–26.
 46. Taylor JL, Bishop C, Walker PD. Dopamine D 1 and D 2 receptor contributions to L-DOPA-induced dyskinesia in the dopamine-depleted rat. *Pharmacol Biochem Behav* 2005;81:887–93.