

Posible actividad estimulante y ansiógena de un extracto de alcaloides quinolínicos de *A. diversifolia* en ratonas.

Aguilar, Efraín¹, González-Esquinca, Alma Rosa¹
de la Cruz, Iván¹, Riley, Christian¹, Vidal, Dolores²

¹Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal, Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. aguilar01@gmail.com

²Bioterio, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas.

Resumen

La ingestión de frutos y tés de guanábana (*A. muricata*) parece causar parkinsonismo atípico en humanos y esto ha sido atribuido a las acetogeninas y a las quinolinas. La administración de acetogeninas en animales de experimentación causa degeneración de neuronas dopaminérgicas y no dopaminérgicas en las mismas estructuras cerebrales que en el parkinsonismo atípico; esta neurodegeneración se atribuye a inhibición selectiva del Complejo I mitocondrial. Los alcaloides quinolínicos también son neurotóxicos y lo hacen por el mismo proceso inhibitorio de energía en mitocondrias, sin embargo aún se duda que sean causantes de la enfermedad. Para reafirmar si los alcaloides

quinolínicos generan signos de parkinsonismo en ratones, se les inyectó un extracto rico en estos compuestos obtenido de la raíz de *A. diversifolia*. Fueron utilizadas ratonas de la cepa Balb C. El grupo experimental recibió por vía intraperitoneal 30 mg/kg/día del extracto durante dos periodos de 5 días, con 2 días de intervalo entre cada uno. Para medir el retardo en la actividad motora se usó la prueba de la pértiga. Ésta fue aplicada antes y después de las inyecciones. Al grupo control se le inyectó DMSO -disolvente del extracto- con el mismo esquema. Contrario al esperado, el grupo experimental redujo significativamente el tiempo de la prueba y además mostró signos de ansiedad tales como desarrollo de calvicie e hiperreactividad a la manipulación, al ser comparado con los controles. Se concluye, a manera de hipótesis, que los alcaloides quinolínicos de la raíz de *A. diversifolia* en este modelo experimental tienen propiedades ansiógenas y estimulantes a través de activar los sistemas dopaminérgicos mesolímbico y mesoestriado.

Palabras clave: *alcaloides quinolínicos, hipercinesia, ansiedad*

Introducción

La ingestión crónica de frutos y tés de hojas de guanábana (*A. muricata*) parece causar parkinsonismo atípico en humanos y esto ha sido atribuido a la presencia de acetogeninas y alcaloides quinolínicos (Caparros-Lefebvre *et al.*, 2002). En animales de experimentación la administración crónica de acetogeninas causa degeneración de neuronas dopaminérgicas y no dopaminérgicas en las mismas estructuras cerebrales que presentan muerte celular en el parkinsonismo atípico (Höglinder *et al.*, 2003); esta neurodegeneración se atribuye a inhibición selectiva del Complejo I mitocondrial (Sherer *et al.*, 2002; Champy *et al.*, 2004). A su vez, los alcaloides quinolínicos también son neurotóxicos y al parecer esto sucede por el mismo proceso inhibitorio de energía en mitocondrias *in vitro* (Lannuzel *et al.*, 2002; Kotake *et al.*, 2004). Por otro lado, existen quinolinas endógenas en mamíferos y su administración experimental produce parkinsonismo en muridos y monos (Kotake *et al.*, 1996; Kawai *et al.*, 1998) a través de sus metabolitos tóxicos (Booth

et al., 1989; Nagatsu, 1997) y mediante inhibición del Complejo I mitocondrial (McNaught *et al.*, 1995; Kawai *et al.*, 2000).

Para determinar si los alcaloides quinolínicos vegetales pueden generar signos de parkinsonismo en ratones, se les inyectó un extracto rico en estos compuestos obtenido a partir de la raíz de *A. diversifolia*.

Método

Fueron utilizados ratones hembras jóvenes de la cepa Balb C. El grupo experimental recibió por vía intraperitoneal 30 mg/kg/día del extracto durante dos periodos de 5 días, con 2 días de intervalo entre cada uno. Para medir el probable retardo en la actividad motora (bradicinesia) se usó la prueba de la pértiga (Ogawa *et al.*, 1987). Ésta fue aplicada dos veces antes de iniciar y después de concluir las inyecciones. Al grupo control se le inyectó DMSO, el disolvente usado como vehículo del extracto y con el mismo esquema de los controles.

La prueba de la pértiga fue usada con modificaciones del método original descrito por Ogawa *et al.* (1987). Los ratones fueron colocados en la punta de una varilla de metal rugoso (8 mm de diámetro y 55 cm de largo) y se les midió el tiempo de giro (Tg) y el tiempo de arribo a la base (Ta). Tg es el tiempo que tarda el ratón para voltearse en dirección hacia abajo, y el Ta es el tiempo que tarda en ubicar las cuatro patas en la base. La prolongación de esos parámetros refleja bradiquinesia (Okuda *et al.*, 2006). Los experimentos se llevaron a cabo en un cuarto aislado y poco iluminado.

Resultados y discusión

Contrario a lo esperado, los animales del grupo experimental redujeron significativamente el tiempo de la prueba (hipercinesia) (cuadros 1 y 2) y además mostraron signos de ansiedad tales como desarrollo de calvicie (figura 1) e hiperreactividad a la manipulación, al ser comparados con los controles.

Cuadro 1. Tiempos de giro y arribo antes y después de administrar las sustancias

		Tiempo de giro (seg.)			<i>p</i>	Tiempo de giro (seg.)			<i>p</i>
		Pre	vs	Post		Pre	vs	Post	
30 mg/kg	1a	2.4		1.4	0.0002	10.5		7.7	0.01
"	2a	1.5		1.3	0.006	10		7.8	0.0008
DMSO	1a	4.8		4.0		14.7		13.6	
"	2a	3.1		1.8	0.03	10.9		10.4	

Cuadro 2. Comparación de los tiempos entre alcaloides quinolínicos y DMSO

		Tiempo de giro		Tiempo de arribo	
		<i>p</i>		<i>p</i>	
30 mg/kg vs DMSO	1a.	0.0006		0.00008	
"	2a.	0.05		0.02	



Figura 1. Calvicie por ansiedad en animales tratados con quinolinas vegetales

Haber obtenido un resultado inesperado requiere discutir por qué se obtuvo ese dato y no el ideado. Comenzaremos por esto último.

Los experimentos con alcaloides quinolínicos vegetales y su toxicidad sobre neuronas dopaminérgicas de mamíferos han sido hechos *in vitro* (Goto *et al.*, 1997; Lannuzel *et al.*, 2002; Kotake *et al.*, 2004) o mediante aplicación directa intracerebral *in vivo* (Koshimura *et al.*, 1997). Nosotros dimos quinolinas vegetales por vía intraperitoneal durante 10 días y no registramos signos de parkinsonismo en ese lapso. Sin embargo, las isoquinolinas de mamíferos administradas por vía intraperitoneal en ratones (Kawai *et al.*, 1998) y subcutánea en monos (Kotake *et al.*, 1996) producen lesiones neuronales y signos parkinsónicos; e *in vitro* bloquean la captura de dopamina (Johnson *et al.*, 1989; Okada *et al.*, 1998), son capturadas e introducidas en la neurona por el transportador de dopamina y luego convertidas en citotóxicas (Booth *et al.*, 1989; Nagatsu, 1997; Kawai *et al.*, 2000), para inhibir así el Complejo I mitocondrial (McNaught *et al.*, 1995) y reducir el contenido de dopamina en mesencéfalo (Kotake *et al.*, 2002). Es posible que los alcaloides quinolínicos vegetales no sean introducidos en la neurona y/o no sean transformados en compuestos neurotóxicos, de ahí la ausencia de signos parkinsónicos en nuestro modelo experimental.

No obstante, los animales con quinolinas vegetales mostraron hipercinesia en vez de bradicinesia en la prueba de la pértiga, y además presentaron conducta de ansiedad manifestada por hiperreactividad a la manipulación y calvicie. Todo esto no se dio en los controles con DMSO. Este tipo de conducta sugiere que fueron estimulados dos sistemas dopaminérgicos: uno relacionado con el aumento de la actividad motora (mesoestriado) y otro con el incremento de actividad emocional negativa (mesolímbico). La estimulación dopaminérgica de los alcaloides quinolínicos vegetales la basamos en que aumentan la concentración de dopamina al inhibir su captura por el transportador (Lannuzel *et al.*, 2002) y muestran afinidad por los sitios de unión D_1 y D_2 en sinaptosomas del estriado de ratas (Protais *et al.*, 1995). Lo anterior sugiere propiedades estimulantes de los alcaloides quinolínicos en este sistema neuroquímico, similar a lo observado con algunas isoquinolinas animales con afinidad por los ligandos D_1 y D_2 (Cabedo *et al.*, 1998; El Aouad

et al., 2009) y con propiedades que parecen ser antidepresivas en otros modelos experimentales (Berenguer *et al.*, 2009).

Por último, éste sólo es un trabajo preliminar, falta reproducir el estudio en ratones machos y a dosis hasta 50 mg/kg que ya sabemos son subletales.

Conclusión

Se concluye, a manera de hipótesis, que los alcaloides quinolínicos de la raíz de *A. diversifolia* en este modelo experimental tienen propiedades ansiógenas y estimulantes a través de activar los sistemas dopaminérgicos mesolímbico y mesoestriado.

Referencias

- Berenguer, I., El Aouad, N., Andujar, S., Romero, V., Suvire, F., Freret, T., Bermejo, A., Ivorra, M.D., Enriz, R.D., Boulouard, M., Cabedo, N. and Cortes, D. 2009. Tetrahydroisoquinolines as dopaminergic ligands: 1-Butyl-7-chloro-6-hydroxy-tetrahydroisoquinoline, a new compound with antidepressant-like activity in mice. *Bioorg Med Chem.* 17 (14): 4968-80.
- Booth, R.G., Castagnoli, N.J. and Rollema, H. 1989. Intracerebral microdialysis neurotoxicity studies of quinoline and isoquinoline derivatives to MPTP/MPP⁺. *Neurosci Lett.* 100: 306-312.
- Cabedo, N., Protais, Ph., Cassels, B.K. and Cortes, D. 1998 Synthesis and dopamine receptor selectivity of the benzyltetrahydroisoquinoline, (R)-(+)-nor-roefractine. *J Nat Prod.* 61 (6): 709-712.
- Caparros-Lefebvre, D., Sergeant, N., Lees, A., Camuzat, A., Daniel, S., Lannuzel, A., Brice, A., Tolosa, E., Delacourte, A. and Duyckaerts, Ch. 2002. Guadeloupean parkinsonism: a cluster of progressive supranuclear palsy-like tauopathy. *Brain.* 125 (4): 801-811.
- Champy, P., Höglinger, G., Féger, J., Gleye, Ch., Hocquemiller, R., Laurens, A., Guérineau, V., Laprévote, O., Medja, F., Lombes, A., Michel, P.P., Lannuzel, A., Hirsch, E.C. and Ruberg, M. 2004. Annonacin, a lipophilic inhibitor of mitochondrial Complex I, induces

nigral and striatal neurodegeneration in rats: possible relevance for atypical parkinsonism in Guadeloupe. *J Neurochem.* 88: 63–69.

El Aouad, N., Berenguer, I., Romero, V., Marín, P., Serrano, A., Andujar, S., Suvire, F., Bermejo, A., Ivorra, M.D., Enriz, R.D., Cabedo, N. and Cortes, D. 2009. Structure-activity relationship of dopaminergic halogenated 1-benzyl-tetrahydroisoquinoline derivatives. *Eur J Med Chem.* 44 (11): 4616-21.

Goto, K., Mochizuki, H., Hattori, T., Nakamura, N. and Mizuno, Y. 1997. Neurotoxic effects of papaverine, tetrahydropapaverine and imethoxyphenylethylamine on dopaminergic neurons in ventral mesencephalic-striatal co-culture. *Brain Res.* 754 (1-2): 260-68.

Höglinger, G., Feger, J., Prigent, A., Michel, P.P., Parain, K., Champy, P., Ruberg, M., Oertel, W.H. and Hirsch, E.C. 2003. Chronic systemic complex I inhibition induces a hypokinetic multisystem degeneration in rats. *J Neurochem.* 84: 491–502.

Johnson, E.A., Wu, E.Y., Rollema, H., Booth, R.G., Trevor, A.J. and Castagnoli, N. Jr. 1989. 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) analogs: in vivo neurotoxicity and inhibition of striatal synaptosomal dopamine uptake. *Eur J Pharmacol.* 166 (1): 65-74.

Kawai, H., Makino, Y., Hirobe, M. and Ohta, S. 1998. Novel endogenous 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline derivatives: uptake by dopamine transporter and activity to induce parkinsonism. *J Neurochem.* 70: 745-751.

Kawai, H. and Ohta, S. 2000. Dopamine transporter and catechol-O-methyltransferase activities are required for the toxicity of 1-(3', 4'-dihydroxybenzyl)-1, 2, 3, 4-tetrahydroisoquinoline. *Chem Res Toxicol.* 13 (12): 1294-301.

- Koshimura, I., Imai, H., Hidano, T., Endo, K., Mochizuki, H., Kondo, T. and Mizuno, Y. 1997. Dimethoxyphenylethylamine and tetrahydroapapaverine are toxic to the nigrostriatal system. *Brain Res.* 773 (1-2): 108-116.
- Kotake, Y., Yoshida, M., Ogawa, M., Tasaki, Y., Hirobe, M. and Ohta, S. 1996. Chronic administration of 1-benzyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline, an endogenous amine in the brain, induces parkinsonism in a primate. *Neurosci Lett.* 217: 69-71.
- Kotake, Y., Okuda, K., Kamizono, M., Matsumoto, N., Tanahashi, T., Hara, H., Caparros-Lefebvre, D. and Ohta, S. 2004. Detection and determination of reticuline and N-methylcoclaurine in the Annonaceae family using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatography B.* 806: 75-78.
- Lannuzel, A., Michel, P.P., Caparros-Lefebvre, D., Abaul, J., Hocquemiller, R. and Ruberg, M. 2002. Toxicity of Annonaceae for dopaminergic neurons: potential role in atypical parkinsonism in Guadeloupe. *Mov Disord.* 17 (1): 84-90.
- McNaught, K., Thull, U., Carrupt, P.-A., Altomare, C., Cellamare, S., Carotti, A., Testa, B. and Marsden, C.D. 1995. Inhibition of complex I by isoquinoline derivatives structurally related to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Biochem Pharmacol.* 50 (11): 1903-1911.
- Nagatsu, T. 1997. Isoquinoline neurotoxins in the brain and Parkinson's disease. *Neurosci Res.* 29: 99-111.
- Ogawa, N., Mizukawa, K., Hirose, Y., Kajita, S., Ohara, S. and Watanabe, Y. 1987. MPTP-induced parkinsonian model in mice: biochemistry, pharmacology and behavior. *Eur Neurol.* 26:16-23.

- Okada, T., Shimada, S., Sato, K., Kotake, Y., Kawai, H., Ohta, S., Toyama, M. and Nishimura, T. 1998. Tetrahydropapaveroline and its derivatives inhibit dopamine uptake through dopamine transporter expressed in HEK293 cells. *Neurosci Res.* 30 (1): 87-90.
- Okuda, K., Kotake, Y. and Ohta, S. 2006. Parkinsonism-preventing activity of 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline derivatives in C57BL mouse *in vivo*. *Biol Pharm Bull.* 29 (7): 1401-1403.
- Protais, P., Arbaoui, J., Bakkali, E.H., Bermejo, A. and Cortes, D. 1995. Effects of various isoquinoline alkaloids on *in vitro* 3H-dopamine uptake by rat striatal synaptosomes. *J Nat Prod.* 58 (10): 1475-84.
- Sherer, T.B., Betarbet, R., Stout, A.K., Lund, S., Baptista, M., Panov, A.V., Cookson, M.R. and Greenamyre, J.T. 2002. An *in vitro* model of Parkinson's disease: linking mitochondrial impairment to altered-synuclein metabolism and oxidative damage. *J Neurosci.* 22: 7006-7015.